

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ESTUDO PROTEÔMICO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE
TOUROS**

CAROLINE SCOTT

BOTUCATU - SP

Agosto/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ESTUDO PROTEÔMICO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE
TOUROS**

CAROLINE SCOTT

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Animal, para a obtenção do título de
doutorado

Orientador: Dr. Jose Antonio Dell’Aqua
Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana
Ferreira de Souza

BOTUCATU – SP

Agosto/2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Scott, Caroline.

Estudo proteômico das células espermáticas de touros /
Caroline Scott. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antônio Dell'Aqua Junior

Coorientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Bovino. 2. Touro. 3. Proteômica. 4. Proteínas -
Pesquisa. 5. Sêmen.

Palavras-chave: Bovino; Extração-proteína;
Proteína-sexo-específico.

Nome do autor (a): Caroline Scott

Título: ESTUDO PROTEÔMICO DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ -
UNESP Botucatu /SP

Profª Dra. Fernanda da Cruz Landim Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ -
UNESP Botucatu /SP

Profª Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Membro

Departamento de Doenças Tropicais - FMB - UNESP
Botucatu/SP

Profº Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Membro

Departamento de Biotecnologia - IBB - UNESP
Botucatu/SP

Profº Dr. Daniel Martins de Souza

Membro

Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual - IB - Unicamp
Campinas/SP

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, minha base. Sem o apoio de vocês os meus sonhos e as minhas conquistas nunca teriam sido realizados

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela sabedoria, paciência, garra, força e por me guiar durante toda minha caminhada.

Aos meus pais Marcos e Zenaide por me amarem incondicionalmente, acreditarem em mim, pelo total apoio nessa empreitada, e por sempre “segurarem a barra” nos momentos de dificuldades no Brasil e na Austrália.

À minha irmã Cybele, meu cunhado Fernando e minha pequena afilhada Helena, simplesmente por estarem lá, sempre quando precisei.

À todos os meus familiares em especial aos meus avós Amábile e Antônio (in memoriam) que torceram por mim todo o tempo e aguentaram firme a saudade.

Ao meu orientador Zé Dell’Aqua, que meu deu o mais importante que eu poderia ter, a oportunidade, e sem isso eu jamais teria chegado até aqui.

Á minha eterna amiga orientadora, Fabiana, que a muito tempo vêm caminhando comigo e me apoiando nessa jornada.

Aos meus amigos da vida (Franca e Botucatu) e de laboratório, que são tantos que não caberiam nesta página, meus sinceros agradecimentos pelo apoio que sempre me deram, a ajuda sempre necessária, o ombro amigo nos momentos de desespero e as boas risadas nas atrapalhadas cotidianas e nas confusões da pesquisa!

Aos meus companheiros de casa Colômbia, principalmenteminha amiga Vivi Vallejo que me deu total apoio sempre que eu precisei durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários do departamento de Reprodução Animal, em especial a dona Raquel, por serem tão presentes nos auxiliando em tudo que é preciso. Ao meu tão querido supervisor Mark e sua maravilhosa equipe, com quem me diverti muito e aprendi muito mais, com certeza estarão pra sempre no meu coração.

Aos meus adorados amigos da Austrália, principalmente aos meus “pais” Márcio e Pri, vocês fizeram os melhores 6 meses que eu poderia ter, e foram a minha família e alicença na animada jornada australiana.

Aos que me trouxeram desafios, sem vocês eu não teria superado tantos obstáculos.

*A minha pequena Amora, minha filhinha querida que sempre anima meus dias
e me dá a mais pura forma de carinho.*

À todos os animais, sem os quais não conseguiria realizar este trabalho.

*Aos membros da banca, que se dispuseram do seu tempo no auxílio e
aperfeiçoamento deste trabalho*

*À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo
apoio financeiro (2013/23351-3) e (2015/25698-6) sem o qual a realização
deste projeto seria improvável.*

***OBRIGADA PESSOAL, VOCÊS SÃO PARTE FUNDAMENTAL DA
MINHA VIDA E ME AJUDAM A CONSTRUIR DIARIAMENTE O MEU
CARÁTER COMO PESSOA E PROFISSIONAL, SEM VOCÊS NADA
SERIA POSSÍVEL!***

Milhares de velas podem ser acesas de uma única vela, e a vida da vela não será encurtada. Felicidade nunca diminui ao ser compartilhada.

Thousands of candles can be lighted from a single candle, and the life of the candle will not be shortened. Happiness never decreases by being shared.

Buda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A estrutura dos espermatozoides	4
2.2. A formação do espermatozoide	5
2.3. Técnicas de extração de proteínas	8
2.4. Estudo do sêmen sexado	10
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 2	
HIPÓTESE E OBJETIVOS	25
Hipótese.....	25
Objetivo.....	25
ARTIGO 1	26
ABSTRACT	27
1. Introduction	28
2. Materials and methods	29
2.1. <i>Materials</i>	29
2.2. <i>Sample preparation</i>	29
3. Results	31
4. Discussion	33
5. Conclusion	35
References	36
CAPÍTULO 3	
HIPÓTESE E OBJETIVOS	40
Hipótese.....	40
Objetivo.....	40
ARTIGO 2	41
RESUMO	42
Introdução	44
Materiais e Métodos	46
Reagentes	46
Aspectos Éticos	46

Amostras.....	47
Solubilização das proteínas espermáticas e digestão trípica dos peptídeos	47
Espectometria de massas (MS)	48
Bioinformática	49
Análise estatística	50
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75

RESUMO

SCOTT, C. Estudo proteômico das células espermáticas de touros. Botucatu, 2017. 87p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, Brasil.

O estudo proteômico é utilizado como ferramenta na reprodução animal como auxílio para compreensão da fisiologia das células. Neste sentido esta técnica é empregada em espermatozoides na tentativa de elucidar os processos biológicos e assim determinar os mecanismos moleculares envolvidos na separação do sexo. Assim, o objetivo deste estudo foi descrever as proteínas das células espermáticas de bovinos em diferentes aspectos. No estudo 1, investigou-se a influência do tampão de extração, associado ou não ao método mecânico (*flash-frozen*), e da concentração celular sobre a quantidade de proteínas extraídas de espermatozoides de bovinos. Foram utilizados como tampões TRIS contendo Nonidet P-40 (NP), RIPA modificado (RP) e uréia/tiuréia/CHAPS (UT), e as concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 x 10⁶ espermatozoides/mL em grupos submetidos ou não ao *flash-frozen*. As concentrações de proteína total foram quantificadas e gel de eletroforese SDS-1D foi confeccionado. O tratamento UT recuperou maior concentração de proteínas, porém no RP as proteínas apresentaram melhor resolução no gel de eletroforese. A concentração proteica aumentou de acordo com a concentração de células no NP e UT. A influência do *flash-frozen* variou de acordo com o tratamento. No estudo 2, o objetivo foi traçar o perfil proteico de células espermáticas sexadas (X e Y) de bovinos. Foram utilizadas amostras comerciais de espermatozoides sexados X (n = 6) e Y (n = 6). As proteínas foram solubilizadas, submetidas a espectromia de massas, análise SWATH. Foram identificadas 459 proteínas comuns aos grupos, 10 variaram a abundância relativa (p < 0,05) De acordo com os resultados obtidos nos 2 estudos conclui-se que a concentração de proteína recuperada em uma amostra varia de acordo com o tratamento e concentração celular. Não foram identificadas proteínas exclusivas presentes nos espermatozoides sexados para X ou Y, entretanto deve-se ressaltar que há uma contaminação de 10% com espermatozoides portadores dos cromossomos opostos, ainda assim, este

estudo poderá ser utilizado como embasamento científico para novas pesquisas em busca de marcadores sexo-específicos.

Palavras chave: bovino, extração-proteína, proteína- sexo-específica

ABSTRACT

SCOTT, C. Proteomic studies of bull sperm cells. Botucatu, 2017. 87p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, Brasil.

The proteomic study is used as a tool in animal reproduction as an aid to understanding of the cells physiology. In this regard, this technique is used in spermatozoa in an attempt to elucidate the biological processes and thus determine the molecular mechanisms involved in the sex separation. Therefore the aim of this study was to describe the bovine sperm cell proteins in different aspects. In study 1, the influence of the extraction buffer, associated or not to mechanical method (flash-frozen), and cellular concentration on the amount of proteins extracted from bovine spermatozoa were investigated. TRIS buffers containing Nonidet P-40 (NP), modified RIPA (RP) and urea/thiourea/CHAPS (UT) were used as well as concentrations of 2, 4, 6, 8 and 10×10^6 spermatozoa/mL in groups submitted or not to flash-frozen. Total protein concentrations were quantified and SDS-1D gel electrophoresis was prepared. The UT treatment recovered a higher concentration of proteins, but in RP the proteins showed better resolution in electrophoresis gel. The protein concentration increased according to the concentration of cells in the NP and UT. The influence of flash-frozen varied according to the treatment. In study 2, the objective was to map the protein profile of sexed sperm cells (X and Y) of cattle. Commercial samples of sexed spermatozoa X (n = 6) and Y (n = 6) were used. The proteins were solubilized, submitted to mass spectrometry SWATH analysis. 459 proteins common to the groups were identified, 10 varied in relative abundance ($p < 0.05$). According to the results obtained in the 2 studies it is concluded that the concentration of recovered protein in a sample varies according to the treatment and cellular concentration. No exclusive proteins were identified in spermatozoa sexed for X or Y, but it should be noted that there is a 10% contamination with spermatozoa bearing the opposite chromosomes, however, this study could be used as a scientific basis for further research in search of sex-specific markers.

Keywords: bovine, protein-extraction, sex-specific-proteina

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A utilização das biotecnologias nos programas de reprodução de bovinos vem aumentando nos últimos anos. Parte deste crescimento se deve ao aumento da produtividade que a aplicação destas técnicas tem promovido. Esse fato, em sua maioria, é devido a melhor compreensão da fisiologia animal oriunda de pesquisas relacionadas aos mecanismos moleculares, incluindo a proteômica, que estão envolvidos nas diferentes funções celulares.

Dentre as biotecnologias que poderiam gerar grande impacto ao sistema de produção a utilização do sêmen sexado se apresenta como uma ferramenta altamente desejável. Entretanto, sua aplicação em programas de inseminação artificial (IA), atualmente, não apresenta resultados consistentes em relação à taxa de prenhez obtida. A técnica de seleção espermática por citometria de fluxo, apesar de ser a que possui melhor eficácia para este fim, também se mostra pouco eficiente em relação à quantidade de doses produzidas, além de ser um procedimento altamente exaustivo ao espermatozoide devido aos danos causados durante o processo de separação (BONDAN, 2012; DEJARNET, 2012), o que limita sua utilização de apenas touros com alta fertilidade.

Associadas a esses fatores, a subfertilidade e a infertilidade são um dos maiores problemas econômicos na pecuária, causando sérios prejuízos ao produtor, pois estão relacionadas à baixa produção anual de bezerros acarretando menor produção de carne e leite (SOGGIU, 2013; ASLAM et al., 2014). Nesse sentido, estudos dos mecanismos moleculares envolvidos no funcionamento espermático, contribuirão para minimizar os efeitos indesejáveis nesta célula. Nas últimas décadas as técnicas relacionadas à proteômica celular permitem, cada vez mais, identificar e caracterizar funções biológicas importantes para o aprimoramento das biotecnologias da reprodução.

Atualmente, os estudos de proteínas vêm ganhando destaque como ferramenta nas pesquisas biológicas, com a proposta de estudar genes/proteínas e funções celulares e moleculares. Dentre os métodos de estudo proteômico, a espectrometria de massas é difundida e sua função é a identificação e caracterização de proteínas com alta sensibilidade (AEBERSOLD, 2003). No espermatozoide, estudos indentificaram proteínas

relacionadas à cabeça (KICHINE et al, 2013). Outros grupos descreveram proteínas relacionadas à função da cauda (AMARAL et al., 2013; HASHEMITABAR et al., 2015). Estes resultados têm estimulado diversas pesquisas na tentativa de elucidar as proteínas envolvidas nos processos biológicos que envolvem as células espermáticas.

Os avanços das técnicas proteômicas têm identificado proteínas que permitem compreender os processos envolvidos na fertilização, a fim de entender as características dos espermatozoides que podem ser úteis no desenvolvimento de métodos de separação das células pelo sexo (AITKEN; BAKER, 2007; DE CANIO et al., 2013; RAHMAN, 2013).

Este trabalho objetivou-se em analisar os espermatozoides de bovinos em diferentes vertentes na tentativa de encontrar o melhor método e concentração ideal de células para a solubilização de proteínas. Além disso, através de análises qualitativa e quantitativa de espectrometria de massas os espermatozoides foram analisadas a fim de traçar um perfil proteico diferencial entre as células portadoras do cromossomo X e Y.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A estrutura dos espermatozoides

Os espermatozoides são formados por duas regiões estruturais: cabeça e cauda. Na cabeça se encontra o núcleo, o acrossoma e em menor quantidade estruturas citoesqueléticas e citoplasma (EDDY, 2006). No núcleo a informação paterna está organizada de forma única. Comparada às células somáticas, a cromatina dos espermatozoides se encontra em um estado mais condensado e compacto (WARD; COFFEY 1991). Esta característica, específica dos espermatozoides, se deve à troca das proteínas nucleares presentes nas células somáticas (histonas) por protaminas durante a espermatogênese (BALHORN, 1982). Além disso, a unidade básica da cromatina no espermatozoide é o toróide de protamina (HUD et al., 1993), ao contrário das células somáticas, que possuem o nucleossomo. Aproximadamente 50.000 pb de DNA do toróide são firmemente enrolados pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de “*donut*” (rosca) ou toróide. Essa constituição é importante na proteção e manutenção da estabilidade do DNA e permite que todo o DNA a ser transportado pelo espermatozoide ocupe um volume menor do que se estivesse na forma de nucleossomos (BALHORN, 1982). Estudos mostraram que a permanência das histonas, ou a ocorrência de anormalidades nas protaminas, podem levar a distúrbios na condensação da cromatina (complexo DNA-proteína) dos espermatozoides, repercutindo sobre a fertilidade (GREDHILL, 1966; EVENSON et al., 1980; MELLO, 1982).

A cauda tem como função principal a motilidade espermática. Nela se encontram o colo, a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal (FAWCETT, 1975). Apesar de ter sua fisiologia bem descrita, os componentes moleculares relacionados à função da cauda ainda estão em estudo (TURNER, 2003). Ao longo de toda cauda se encontra o axonema constituído de um arranjo de 9 microtubulos duplos e um par central e algumas centenas de proteínas acessórias conferindo a força de movimento à célula (LINDEMANN; LESICH, 2016).

O colo é a porção que se liga a cabeça do espermatozoide e tem

como principal função a articulação entre a cabeça e a cauda (TURNER, 2006). A peça intermediária se inicia no fim do colo, se caracteriza pela presença de 9 fibras densas externas (do inglês ODF) que se encontram externamente aos microtubulos e um revestimento de mitocôndrias envolvendo as ODFs e o axonema. As mitocôndrias possuem milhares de proteínas que estão envolvidas em diversos processos metabólicos responsáveis por, entre tantas funções, a produção de energia (ATP), o que garante a motilidade espermática (PAGLIARINI et al., 2008; PIOMBONI et al.; 2011), A peça intermediária termina com o annulus, aproximadamente a um quarto do fim da cauda, que marca o início da peça principal. Este ponto é o fim do revestimento mitocondrial, presente apenas na peça intermediária, e início da peça principal que se estende cerca de dois terços pelo comprimento do flagelo. Neste local também é onde duas das ODFs são substituídas por bainhas fibrosas longitudinais que são presentes exclusivamente na peça principal. Com o fim da peça principal e início da peça terminal as ODFs e bainhas fibrosas longitudinais acabam, e a porção final contém apenas o axonema circundado pela membrana plasmática (TURNER, 2003; 2006).

2.2. A formação do espermatozoide

Os espermatozoides são células haploides, especializadas, com habilidade limitada de biossíntese e regeneração celular (AMANN; GRAHAM, 1993). São formadas no testículo (FRANCA et al., 2005) e maturadas durante o trânsito epididimário (DACHEAUX et al., 2005). Este processo pode ser dividido em três fases:

Fase 1: Fase proliferativa. As espermatogônias se multiplicam pelo processo de mitose e se transformam em espermatócitos I, células diploides (2N).

Fase 2: Fase meiótica. Os espermatócitos I sofrem a primeira meiose e se tornam espermatócitos II. Estes, por meio da segunda meiose, se tornam espermátides, células haploides (1N).

Fase 3: Fase de diferenciação ou espermiogênese. As espermátides se diferenciam e se tornam espermatozoides (ADLER, 1996).

Em uma revisão, Boerke et al. (2007), relatam que após as divisões

meióticas as células passam por grandes mudanças na forma e na organização, elas se tornam alongadas e apresentam acrossoma. Ambos os processos requerem a transcrição e tradução do mRNA pós-meiótico. Na fase de diferenciação espermática a expressão gênica é silenciada e se inicia a condensação do DNA em protaminas, formando estruturas de DNA supercondensadas que auxiliam a formação do núcleo e a motilidade espermática pelo trato reprodutivo da fêmea (MILLER et al., 2010). A fase de maturação final ocorre no epidídimo e coincide com o declínio do conteúdo de RNA e a falta de síntese proteica. Desta forma, acredita-se que algumas proteínas presentes nos espermatozoides maduros são advindas do processo de maturação no trânsito epididimário (LALANCETTE et al., 2006; BAKER, 2016).

Após a primeira divisão meiótica as células são haploides, mas contêm ambos os cromossomos X e Y que evoluíram dos autossomos e são totalmente diferentes e especializados. O cromossomo X preservou evolutivamente 98% dos genes dos autossomos ancestrais, enquanto o cromossomo Y preservou apenas 3% (HU; NAMEKAWA, 2015). No que diz respeito à diferenciação sexual, logo após a divisão meiótica, a composição proteica dos espermatozoides que carregam os cromossomos X ou Y só serão diferentes quando os produtos gênicos forem de células haploides individuais (HENDRIKSEN, 1999), entretanto, após a meiose a transcrição e tradução de proteínas não acontecem mais, esse processo é chamado silenciamento pós-meiótico. Por outro lado, alguns genes ligados ao sexo e que podem estar envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial, são reativados após o silenciamento pós-meiótico e se expressam em espermátides haploides (GALERAUD-DENIS et al., 2007; HU; NAMEKAWA, 2015). Apesar dos poucos estudos, a evidência da transcrição pós silenciamento é essencial no entendimento dos últimos passos da maturação espermática (GALERAUD-DENIS et al., 2007). Ademais, pesquisadores buscam entender como ocorre o silenciamento meiótico dos cromossomos sexuais e qual a sua significância biológica (HEIJDEN; BAARENDS, 2011).

Kildemo (2012) citou em uma revisão, que o silenciamento ocorre pois o espermatozoide não possui complexos citoplasmáticos ribossomais suficientes para suportar a tradução proteica. Deste modo, o autor sugeriu que

esse processo ocorre nas mitocôndrias. Outros autores relataram a tradução pós-meiótica de algumas proteínas envolvidas no processo de capacitação. Utilizando um inibidor mitocondrial de tradução (D-chloramphenicol), eles afirmaram que existe um tipo de mitocôndria (*mitochondrial type ribosome*) que é capaz de traduzir proteínas durante a capacitação, sugerindo que a tradução proteica é um passo importante para o espermatozoide em eventos durante e pós-capacitação (ZHAO et al., 2009).

É importante ressaltar que a função conhecida do espermatozoide é levar os genes paternos no processo de fertilização, entretanto, vários estudos mostram que a contribuição da célula espermática vai além do DNA. Ela também fornece uma grande variedade de moléculas de mRNA com papel essencial durante a fertilização (BUKOWSKA et al., 2013).

Quatro teorias são descritas a respeito da função do RNA espermático. A primeira delas se relaciona à sinalização de “espermatozoides irmãos”, facilitando a evolução e a cooperação das células durante a ejaculação. A segunda teoria é sobre o processo de empacotamento na célula diploide. O RNA age no controle da manutenção do material genético paterno. A terceira é de que o RNA atua como um mecanismo de proteção, permitindo que a fêmea tenha acesso somente ao espermatozoide que fertilizará o oócito. A quarta hipótese é de que o RNA espermático age na manipulação da maquinaria de fertilização do oócito em benefício do gene masculino (HOSKEN; HODGSON, 2014).

A passagem de transcritos através do silenciamento pós meiótico pode ser a explicação para tradução pós-meiótica. A identificação e a quantificação das proteínas expressas nas células são bastante importantes no entendimento da dinâmica e do funcionamento celular. As análises qualitativa e quantitativa de proteínas são conhecidas mundialmente como estudo proteômico e auxiliam no entendimento do que a célula espermática necessita para sobreviver e funcionar corretamente (RAHMAN, et al., 2013).

As proteínas presentes na célula espermática possuem papel vital na motilidade, na maturação, na capacitação, na fertilização, na ativação do oócito e no desenvolvimento embrionário. Ainda que seus mecanismos não sejam totalmente elucidados, qualquer defeito molecular nessas proteínas pode levar à baixa fertilidade (BYRNE et al., 2012; GOVINDARAJU et al., 2012).

Ademais, a célula espermática tem vários estágios funcionais para a análise proteômica (não capacitada, capacitada e pós-reação acrossomal) (AITKEN; BAKER, 2007).

2.3. Técnicas de extração de proteínas

Devido à heterogeneidade dos materiais e das diferentes propriedades físico-químicas das proteínas, distintas abordagens podem ser seguidas para o preparo de amostras (BARACAT-PEREIRA et al., 2012). Nesta fase, as seguintes etapas devem ser consideradas: rompimento celular e extração das proteínas; inativação e/ou remoção de substâncias interferentes/contaminantes e solubilização da amostra (GÖRG et al., 2004; BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007).

Conhecer as propriedades físico-químicas inerentes a cada proteína é fundamental na escolha, no desenvolvimento do processo de extração e na manutenção da estabilidade das proteínas-alvo durante o trabalho (BARACAT-PEREIRA et al., 2012). A escolha do método influencia diretamente a diversidade de proteína recuperada (KUPRADIT; KETUDAT-CAIRNS, 2009).

O processo de extração começa sempre com ruptura celular ou lise (GALDOS-RIVEROS, 2009). As técnicas mais utilizadas se baseiam na homogeneização dos tecidos ou células e na destruição dos limites celulares, por meio de diferentes procedimentos físicos e/ou químicos. Estes procedimentos tentam maximizar a liberação das proteínas de interesse, evitando a degradação térmica ou alterações secundárias por oxidação, proteólises, entre outros.

Muitos protocolos têm sido desenvolvidos visando à lise celular, os quais são usados em escala laboratorial, podendo ser classificados como: métodos físicos mecânicos, físicos não mecânicos e químicos. Os métodos físicos são mais acessíveis economicamente, o seu uso não é necessário ser associado a químicos. Entretanto, o calor gerado no processo deve ser combatido evitando a desnaturação das proteínas (MORRIS, 2006).

Nos métodos físicos mecânicos a eficiência da lise depende de fatores como a energia utilizada, a concentração celular, o tempo e a temperatura. Nele estão os métodos de agitação com abrasivos,

homogeneização ou pressão celular (AHMED, 1959). Dentre os métodos físicos não mecânicos há o choque osmótico, ciclos de congelação/descongelação, sonicação. Dos métodos químicos, se destacam os tratamentos com álcoois, solventes, ácidos, substâncias caotrópicas, enzimas líticas e detergentes. Apesar destes métodos geralmente serem eficientes, algumas vezes o auxílio do rompimento mecânico se faz necessário. (RABILLOUD, 2009; CORTHALS et al., 2000; STULTS; ARNOTT, 2005; GORG et al., 2010; USAMI et al., 2007; BURDEN, 2012).

Detergentes são utilizados no isolamento de determinadas proteínas ou para explorar a estrutura proteica da célula. Apesar de pouco estudados, vários tratamentos são descritos na literatura. Entender o mecanismo de ação de cada um na interação e na solubilização da membrana auxiliam na escolha do melhor tratamento de extração para o objetivo desejado (KIRKPATRICK et al, 1974; MAIRE, et al. 2000).

Para a maioria das estratégias proteômicas, a espectrometria de massas (MS) é a fase final do processo analítico, devendo fornecer dados confiáveis para a interpretação da informação codificada pelos genes, ou seja, o proteoma. A qualidade destes dados, no entanto, é dependente da condição inicial das amostras, desde as etapas de preparação (extração, purificação e quantificação) até a entrada no equipamento e processamento. Em geral, as amostras analisadas por MS devem ser da maior pureza possível, pouco complexas, e ausentes de compostos que interfiram nos processos de ionização, separação e detecção de sinais, tais como: sais inorgânicos, agentes caotrópicos, detergentes, polímeros e componentes não voláteis (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007).

Neste contexto a escolha deve-se basear na natureza da amostra (BURDEN, 2012). Não existe um método de extração de proteínas adequado para todos os tipos celulares (CHEN et al., 2011). Devido à sua estrutura única, o espermatozoide necessita ser bem estudado quanto a sua composição para que as técnicas sejam adequadas a tais células e sua análise proteômica.

2.4. Estudo do sêmen sexado

A seleção do sexo tem um valor econômico significativo na pecuária de leite e de corte, em sistemas nos quais a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR et al., 1985; VAN VLECK et al., 1987; RUVUNA et al., 1992; HOHENBOKEN, 1999). A sexagem de espermatozoides associada à inseminação artificial e a transferência de embriões pode incrementar o melhoramento genético animal com o aumento anual em até 25% na produção de leite e/ou carne (HOHENBOKEN, 1999).

A seleção do sexo em espécies de interesse zootécnico é bastante estudada e dois métodos são descritos para tal: seleção do sexo em espermatozoides (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; SEIDEL, 2003;) e identificação do sexo em embriões (MOREIRA-FILHO et al., 2000; RAMALHO et al., 2000). Para a pré-seleção de sexo antes da concepção o único método eficaz é a separação de espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y (MAXWELL et al., 2004). Para a bovinocultura essa seleção representa um grande potencial para o melhoramento genético e satisfação da demanda do mercado (PARATI et al., 2006).

Os espermatozoides portadores do cromossomo X e Y possuem diferenças, ainda que sutis, em relação ao conteúdo de DNA, ao tamanho, à motilidade, à carga e ao antígeno de superfície (BORO et al., 2016). Em 1979, Morruzi sugeriu pela primeira vez que o DNA poderia ser um fator diferencial nos espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y, e essa poderia ser a base da separação espermática. A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente interespecies, desde 2,8% em humanos até 7,5% em chinchilas. Nos bovinos, essa variação chega a 3,8% e, até o momento constitui-se na única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozoides X ou Y *in vitro* por meio da citometria de fluxo (JOHNSON; WELCH 1999; RATH et al., 2013).

Outra forma já descrita para a separação do sexo, considerada uma metodologia simples e barata, é a centrifugação em gradiente de densidade (TURKER; JANSER, 2002). O processo se baseia na diferença de densidade entre os espermatozoides X e Y, devido a diferença no conteúdo de DNA (SUMNER; ROBINSON, 1976). Várias pesquisas descreveram diferentes

gradientes (ESMAEILPOUR et al., 2012; LIMA et al., 2011), entretanto nenhum tem validação científica comprovada.

Em 1955, Eichwald e Silmsler descreveram pela primeira vez o antígeno de membrana H-Y nas células espermáticas portadoras do cromossomo Y, dando início aos estudos das diferenças proteicas entre os espermatozoides portadores de cromossomos diferentes.

Em 1998 Blecher registrou patente (US 5, 840,504; 24/11/1998) sobre um método de identificação das moléculas sexo-específicas, este método foi relatado no seu trabalho em 1999, descrevendo o desenvolvimento de um método para a sexagem imunológica dos espermatozoides, pela identificação de proteínas específicas do sexo (SSP, *Sex Specific Protein*). Este processo se baseia na identificação e no isolamento dessas proteínas, na sua purificação por cromatografia de coluna e na obtenção de anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino e feminino. Após a incubação com espermatozoides bovinos, os anticorpos antiproteínas específicas do sexo feminino promoveram a aglutinação de 50% das células. Destas, as que não sofreram aglutinação produziram *in vitro* 92% de embriões do sexo masculino. Não foi relatado se a incubação de espermatozoides com anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino também promoveu o desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino. Os autores postularam a presença de diferentes proteínas cromossomais específicas do sexo na superfície dos espermatozoides X e Y, originárias de transcrição e tradução pós-meiótica, que não seriam capazes de atravessar as pontes interespermáticas (BLECHER et al., 1999). Tal possibilidade já foi levantada na literatura e patenteada por ZAVOS et al. (US 4,999,283, 12/03/1991), SPAULDING (US 5,660,997, 26/08/1997).

Uma patente publicada por Benjamin et al. (US 6, 153,373, 28/11/2000) descreve o uso de esferas magnéticas não porosas ligadas a anticorpos sexo-específicos. A separação se dá pela adição ao sêmen de anticorpos específicos para um dos sexos, previamente acoplados às esferas contas. Os espermatozoides tratados são submetidos a um campo magnético e o sobrenadante removido constitui a fração rica em espermatozoides X ou Y. Apesar da técnica descrita nesta patente ser de conhecimento amplo na imunologia e, portanto, consagrada pela eficiência, o autor não relatou o uso

dos espermatozoides sexados na IA ou qualquer outra técnica que comprovasse a obtenção do sexo desejado.

Em uma pesquisa eletroforética bidimensional com espermatozoides de bovinos foram encontradas 42 proteínas diferenciais entre os espermatozoides portadores do cromossomo X e Y. Dentre essas, 16 foram avaliadas por espectrometria de massas e os autores afirmaram que estão relacionadas ao metabolismo energético, a resistência ao estresse, a estrutura do citoesqueleto, e a atividade de serinoprotease. Essas diferenças podem afetar os fenótipos dos animais (CHEN et al., 2012).

Ainda com bovinos, De Canio et al. (2013) relataram em seu trabalho que existem diferenças na expressão de proteínas entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. Essas diferenças estão relacionadas à estrutura do citoesqueleto e flagelo, sugerindo diferenças estruturais entre os grupos.

No que se refere à utilização prática da seleção do sexo por métodos imunológicos, permanece a limitação da necessidade de mais investigações utilizando-se técnicas de identificação de proteínas mais sensíveis.

REFERÊNCIAS¹

ADLER, I. D. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. **Mutation Research**, v. 352, p. 169-172, 1996.

AEBERSOLD, R. A. Mass Spectrometric Journey into Protein and Proteome Research. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, p. 685-695, 2003.

AHMED, HAFIZ. Título: Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. In:___ **Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization**. New York: CRC Press, 1959. Cap 1, p. 1-34.

¹ Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002.

AITKEN, J.; BAKER, M. A. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 295-302, 2007.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Espermatozoal function. In:___ MCKINNON, A.O.; VOSS, J. L. (Eds). **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea e Febiger., 1993. p. 715-745.

AMARAL, A.; CASTILLO, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCA, J. L.; RAMALHO-SANTOS, J.; OLIVA, R. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 12, p. 330-342, 2013.

ASHRAFZADEH, A.; KARSANI, S. A.; NATHAN, S. Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, p. 1649-1657, 2013.

ASLAM, M. K. M.; KUMARESAN, A.; SHARMA, V. K.; TAJMUL, M.; CHHILLAR, S.; CHAKRAVARTY, A. K.; MANIMARAN, A.; MOHANTY, T. K.; SRINIVASAN, A.; YADAV, S. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. **Theriogenology**, v. 82, p. 1254-1262, 2014.

AX, R. L.; BELLIN, M. E.; ZHANG, H. M.; HAWKINS, H. E. **New Approach to Estimating Bull Fertility**. In:___ Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI, 1999 Greeley, Colorado. 1999.

BAKER, M. A. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. **Cell and Tissue Research**, v. 363, p. 279-287, 2016.

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 93, p. 298-305, 1982.

BARACAT-PEREIRA, M. C.; BARBOSA, M. O.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; CARRIJO, L. C.; GAMES, P. D.; ALMEIDA, H. O.; SENA NETTO, J. F.;

PEREIRA, M. R.; BARROS, E. G. Separomics applied to the proteomics and peptidomics of low-abundance proteins: Choice of methods and challenges - A review. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 283-291, 2012.

BENJAMIN, T. L.; KOHN, B.; BASKER, C. J.; GEORGE, S.; LIVINGSTON, D., **Method for sex determination of mammalian offspring**. US Patent 6,153,373, 28 Nov 2000.

BLECHER, S. R. **Method for separating sex specific molecules and non-sex specific molecules**. US Patent 5,840,504, 24 Nov., 1998.

BLECHER, S. R.; HOWIE, S. L.; DETMAR, J.; BLAHUT, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1309-1321, 1999.

BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA, J.; SILBERRING, J. Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography**, v. 849, p. 1-31, 2007.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, p. 147-155, 2007.

BONDAN, J. A. **Sêmen sexado, finalmente é uma realidade?** Disponível em: <<http://www.semeia.com.br/site/artigo.php?ID=60&IDC=1&PHPSESSID=8b33be216ebb66096488ec39a6ba5014>>. Acesso em 27 mar. 2012.

BORO, P.; NAHA, B. C.; MADKAR, A.; PRAKASH, C. Sexing of semen in bulls: a mini review. **International Journal of Applied Research**, v. 4, p. 460-462, 2016.

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; SOSINSKA, P.; WOZNA, M.; CIESIOLKA, S.; ANTOSIK, P.; JASKOWSKI, M.; BRÜSSOW, K. P.; NOWICKI, M. The structure and role of mammalian sperm RNA: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, p. 57-64, 2013.

BURDEN, D. W. Guide to the Disruption of Biological Samples. **Random Primers**, v. 12, p. 1-25, 2012.

BYRNE, K.; LEAHY, T.; MCCULLOCH, R.; COLGRAVE, M. L.; HOLLAND, M. K. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v. 12, p. 3559-3579, 2012.

CORTHALS, G. L.; WASINGER, V. C.; HOCHSTRASSE, D. F.; SANCHEZ, J. C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1104-1115, 2000.

CHEN, X.; ZHUA, H.; WUC, C.; HAND, W.; HAOA, H.; ZHAOA, X.; DUA, W.; QINA, T.; LIUA, Y.; WANG, D. Identification of differentially expressed proteins between Bull X and Y spermatozoa. **Journal of proteomics**, v. 77, p. 59-67, 2012.

CHEN, Y. H.; KUO, Y. H.; CHUNG, M. T.; CHIU, Y. F.; HUANG, S. Y. Evaluation of different lysis buffers for improving resolution in proteomic analysis of porcine spermatozoa. **Journal of the Chinese Society of Animal Science**, v. 40, p. 183-189, 2011.

DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 319-41, 2005.

DE CANIO, M.; SOGGIU, A.; PIRAS, C.; BONIZZI, L.; GALLI, A.; URBANICD, A.; RONCADA, P. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. **Molecular BioSystems**, v. 10, p. 1264-1271, 2014.

DE JARNETTE, M. **Sêmen sexado: uma realidade**. Disponível em: <<http://www.semeia.com.br/site/artigo.php?ID=94&IDC=3&PHPSESSID=7779520d1346c3e53f0e3cb2030804a8>>. Acesso em 06 mar. 2012.

EDDY, E. M. The spermatozoon. In: ___Neill JD, editors. **Knobil and**

Neill physiology of Reproduction. New York: Elsevier, 2006, v. 1, p. 3-54.

EICHWALD, E. J. E.; SILMER, C. R. Untitled communication. **Transplant Bull**, p. 148-149, 1955.

ESMAEILPOUR, T.; ELYASI, L.; BAHMANPOUR, S.; GHANNADI, A.; MONABBATI, A.; DEHGHANI, F.; KAZEROONI, M. Effect of combined density gradient centrifugation on X- and Y- sperm separation and chromatin integrity. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 10, p. 435-440, 2012.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FAWCETT, D. W. The mammalian spermatozoon. **Developmental Biology**, v. 44, p. 394-436, 1975.

FRANCA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300-18, 2005.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; PIZA, A. R. T.; RESENDE, L. C.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. Proteomica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, p. 1-9, 2010.

GALERAUD-DENIS, I.; LAMBARD, S.; CARREAU, S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p. 587-592, 2007.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LUCK, C.; WEILAND, F. **Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual.** Disponível em: <<http://www.wzw.tum.de/blm/deg/>>. Acesso em: 28 fevereiro 2017.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GOVINDARAJU, A.; DOGAN, S.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; GRANT, K.; KAYA, A.; MEMILI, E. Delivering value from sperm proteomics for fertility. **Cell and Tissue Research**, v. 349, p. 783-793, 2012.

GLEDHILL, B. L. Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 7, p. 1-20, 1966.

HASHEMITABAR, M.; SABBAGH, S.; ORAZIZADEH, M.; GHADIRI, A.; BAHMANZADEH, M. A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 853-863, 2015.

HEIJDEN, G. W.; EIJPE, M.; BAARENDS, W. M. The X and Y chromosome in meiosis: how and why they keep silent. **Asian Journal of Andrology**, v. 13. p. 779-780, 2011.

HENDRIKSEN, P. J. M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, p. 1295-1308, 1999.

HOSKEN, D. J.; HODGSON, D. J. Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 29. p. 451-455, 2014.

HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, p. 1421-1433, 1999.

HU, Y.; NAMEKAWA, S. H. Functional significance of the sex chromosomes during spermatogenesis. **Reproduction**, v. 149, p. 265-277, 2015.

HUD, N. V.; ALLEN, M. J.; DOWNING, K. H.; LEE, J. BALHORN, R.

Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, p. 1347-1354, 1993.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/e_pp_2016_mar.pdf>. Acesso em mar. 2016.

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of x and y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, v. 52, p. 1323-1341, 1999.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 368-373, 2008.

KAYAA, A.; MEMILI, E. Sperm macromolecules associated with bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 88-94, 2016.

KICHINE, E.; DI FALCO, M.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B.; CHAN, P. Analysis of the Sperm Head Protein Profiles in Fertile Men: Consistency across Time in the Levels of Expression of Heat Shock Proteins and Peroxiredoxins. **Plos one**, v. 8, p. 1-10, 2013.

KILDEMO, H. **RNA expression in sperm as markers of sperm-quality**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado) Universitetet i Oslo, Noruega, 2012.

KIRKPATRICK, F. H.; GORDESKY, S. E.; MARINETTI, G., V. Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 345, p. 154-161, 1974.

KUPRADIT, C.; KETUDAT-CAIRNS, M. The extraction and purification of boar sperm surface protein. **Suranaree Journal of Science and Technology**, v.

16, p. 245-251, 2009.

LALANCETTE, C.; FAURE, R. L.; LECLERC, P. Identification of the proteins present in the bull sperm cytosolic fraction enriched in tyrosine kinase activity: a proteomic approach. **Proteomics**, v. 6. p. 4523-4540, 2006.

LIMA, V. F. M. L; RAMALHO, M. D. T.; RODRIGUES, L. H.; MALHEIROS, E. B.; MOREIRA-FILHO, C. A. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, v. 53, p. 480, 2000.

LIMA, V. F. M. H; MOREIRA-FILHO, C. A.; LUCIO, A. C.; RESENDE, M. V. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínua de densidade de Percoll. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1680-1685, 2011.

LINDEMANN, C. B.; LESICH, K. A. Functional Anatomy of the Mammalian Sperm Flagellum. **Cytoskeleton**, v. 73, p. 652-669, 2016.

MAIRE, M.; CHAMPEIL, P.; MÖLLER, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1508, p. 86-111, 2000.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLAN, L.; MORTON, K. M.; O BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 79-95, 2004.

MCREYNOLDS, S.; DZIECIATKOWSKA, M.; STEVENS, J.; HANSEN, K. C.; SCHOOLCRAFT, W. B.; KATZ-JAFFE, W. G. Toward the identification of a subset of unexplained infertility: a sperm proteomic approach. **Fertility and Sterility**, v. 102, p. 692-699, 2014.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**,

v. 74, p. 387-392, 1982.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, p. 287-301, 2010.

MISHRA, C.; PALAI, T. K.; SARANGI, L. N.; PRUSTY, B. R.; MAHARANA, B. R. Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. **Veterinary World**, v. 11, p. 905-910, 2013.

MITRA, K.; SHIVAJI, S. Proteins implicated in sperm capacitation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 1001-1015, 2005.

MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. D. T.; KIRNZENBAUM, M.; COTINOT, C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Sex selection of Brazilian Zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, p. 483, 2000.

MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 319-323, 1979.

MORRIS, G. J. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. **Human Reproduction**, v. 21, p. 2075-2083, 2006.

MURATORI, M.; LUCONI, M.; MARCHIANI, S.; FORTI, G.; BALDI, E. Molecular markers of human sperm functions. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 25-45, 2008.

PAGLIARINI, D. J.; CALVO, S. E.; CHANG, B.; SHETH, S. A.; VAFAI, S. B.; ONG, S.; WALFORD, G. A.; SUGIANA, C.; BONEH, A.; CHEN, W. K.; HILL, D. E.; VIDAL, M.; EVANS, J. G.; THORBURN, D. R.; CARR, S. A.; MOOTHA, V. K. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. **Cell**, v. 134, p. 112-123, 2008.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v. 2, p. 1-13, 2008.

RABILLOUD, T. Detergents and Chaotropes for Protein Solubilization Before Two-Dimensional Electrophoresis. In: PEIRCE, M. J.; WAIT, R. **Membrane proteomics methods and protocols**. Springer Protocols, 2009, cap 18, p. 259-267.

RAHMAN, S.; LEE, J.; KWON, W.; PANG, M. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

RAMALHO, M D. T.; ALVES, B. C. A.; MOREIRA-FILHO, C. A.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Sexing of murine and bovine embryos by development arrest induced by high titer H-Y antisera. **Theriogenology**, v. 53, p. 484, 2000.

RATH, D.; BARCIKOWSKI, S.; GRAAF, S.; GARRELS, W.; GROSSFELD, R.; KLEIN, S.; KNABE, W.; KNORR, C.; KUES, W.; MEYER, H.; MICHL, J.; MOENCH-TEGEDER, G.; REHBOCK, C.; TAYLOR, U.; WASHAUSEN, S. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. **Reproduction**, v. 145, p. 15-30, 2013.

RUVUNA, F.; TAYLOR, J. F.; WALTER, J. P.; TURNER, J. W. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1091-1097, 1992.

SEIDEL, G. E. Economics of selecting for sex: the most important genetic tract. **Theriogenology**, v. 59, p. 585-598, 2003.

SOGGIU, A.; PIRAS, C.; HUSSEIN, H. A.; DE CANIO, M.; GAVIRAGHI, A.; GALLI, A.; URBANI, A.; BONIZZIA, L.; RONCADA, P. Unravelling the bull

fertility proteome. **Molecular BioSystems**, v. 9, p. 1188-1195, 2013.

SPAULDING, G. F.; ARIZ, C. **Methods for determining antibodies specific for sex associated sperm membrane proteins**.US Patent 5,660,997, 26 Ago.,1997.

STULTS, J. T.; ARNOTT, D. Proteomics. **Methods Enzymology**, v. 402, p. 245-289, 2005.

TAYLOR, St. C. S.; MOORE, A. J.; THIESSEN, R. B.; BAILEY, C. M. Efficiency of food in traditional and sex controlled systems of beef production. **Animal Production**, v. 40, p. 401-440, 1985.

TUCKER, K.; JANSEN, C. A. M. Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products. In:___Proceedings 2nd International workshop for Embryologists: **Troubleshooting Activities in the ART Lab**, 2002.

TURNER, R. M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **Journal of Andrology**, v. 24, p. 790-803, 2003.

TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 25-38, 2006.

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; NAKAZAWA, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for development toxicity studies. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 521-526, 2007.

Van VLECK, L. D.; POLLAK, E. J.; OLTENACU, E. A B. Genetics for the animal science. New York: W.H. Freeman, cap. 13, p. 287-313, 1987.

WARD, W. S.; COFFEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology Reproduction**, v. 44, p. 569-574, 1991.

ZAVOS, P M.; DAWSON, K. A. **Method for x and y spermatozoa separation.**
US Patent 4, 999, 283, 12, Mar.,1991.

ZHAO. C.; GUO, X.; SHI, Z.; WANG, F.; HUANG, X.; HUO, R.; ZHU, H.;
WANG, X.; LIU, J.; ZHOU, Z.; SHA, J. Role of translation by mitochondrial-type
ribosomes during sperm capacitation: An analysis based on a proteomic
approach. **Proteomics**, v. 9, p. 1385-1399, 2009.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESE E OBJETIVOS

Hipótese

É possível determinar um protocolo eficaz para otimizar a recuperação de proteínas de espermatozoides.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi definir a concentração espermática adequada ao tampão de extração associado ou não ao *flash/frozen* para padronização de um protocolo de solubilização de proteínas.

ARTIGO 1

Artigo redigido segundo as normas da Analytical Biochemistry, ISSN: 0003-2697, ranqueada como A1 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

SPERM PROTEIN EXTRACTION: DIFFERENT TECHNIQUES AND VARIABLE SPERM CONCENTRATIONS

CAROLINE SCOTT¹; FABIANA FERREIRA DE SOUZA^{1*}; GABRIELE BARROS MOTHÉ¹; VIVIANA HELENA VALLEJO ARISTIZABAL¹; MIGUEL JOAO XAVIER^{2,3}; JOSE ANTÔNIO DELL'AQUA J UNIOR¹

¹Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

² Reproductive Science Group, Faculty of Science and IT, University of Newcastle, Australia

³ PRC for Reproductive Science, University of Newcastle, Australia

*Corresponding author:

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/nº
Bairro: Unesp Campus de Botucatu
CEP: 18.618-681 - Botucatu – SP, Brasil
E-mail: fafesouza@fmvz.unesp.br

ABSTRACT

Proteomic data analysis is becoming increasingly important in the study of sperm cells. With the recent advances to this technique more research must be conducted to attempt to improve the quality of mass spectrometry analysis of sperm cells. Thus, with this study we aimed to select the best extraction buffer, mechanical method and ideal sperm concentration for protein extraction. A pool of 4 straws of semen was used, the sperm concentration was assessed, and then cells were diluted in a protease inhibitor buffer. Samples were divided into identical pairs of 5 groups with different cell concentrations (2, 4, 6, 8 and 10 x 10⁶ per mL), with one set per pair submitted to treatment with liquid nitrogen frozen/thawd five times, while the other was not submitted to flash-frozen. Samples were then processed by three different methods of protein extraction followed by sonication. Our results showed that the flash-frozen process influences, although minimally the total protein concentration. Membrane extracts obtained in urea/thiourea/CHAPS treatment displayed the highest protein concentration, followed by RIPA and NP treatment, however had the worst resolution in 1D SDS PAGE gels. Final protein concentrations varied according to sperm concentrations and extraction buffer employed. We conclude that the freeze/thaw process can improve protein recovery rate and urea/thiourea/CHAPS buffer provided the best protein recovery, despite the low gel resolution.

Keywords: bull-sperm, extraction-techniques, proteomics

1. Introduction

The number of techniques employing proteomic analysis has grown in recent decades, in the veterinary medicine is very important molecular studies involving reproduction. The proteomic techniques allow the analysis of the protein content and the study of some functions in sperm cells, as well as expanding our understanding on post-translational modifications during the spermatogenesis [1]. Sperm cells are produced during the spermatogenesis and are a unique cell type, different from other somatic cells. These fact, led to multiple studies attempting to elucidate the cellular composition and how molecular activities relate to their function [2]. The sperm bull proteome contains hundreds of proteins, however for most of them the function or the biological process that they are involved in, remains unknown [3].

Protein extraction is an important initial step in proteomics [4]. In attempt to increase the concentration of proteins recovered, mechanical and chemical techniques have been tried. The success of these procedures depend on variables such as the choice of buffers, protease inhibitors, detergents, and use of mechanical procedures [5].

Mechanical lysis leading to cell disruption can be performed using several methods. A common method is sonication, a mechanical lysis applying sonic vibrations that achieve rupture of the cell membrane and thereby release proteins [5]. An alternative is conducting rapid freezing (flash-frozen) which promotes formation to ice crystals inside the cells that pierce the cell membrane leading to cell rupture [6].

Detergents are commonly used for their amphipathic character and thus bind to the cell membrane causing a solubilization process. Several detergents can be employed for this purpose, each with its own characteristics, interacting with specific membrane structures in a different ways [5,7]. It is necessary know how detergents interact with proteins and lipids in the cellular membrane to determine a better option to use [8]. The sodium dodecyl sulfate (SDS) is an ionic detergent, which acts solubilizing the membrane proteins, however can also cause denaturation [9]. Nonidet P-40 and Triton X-100 are non-ionic detergents, mild and less denaturing, widely used to dissociate molecules with weak interactions. Sodium deoxycholate is also a non-ionic

detergent, effective in dissociating protein–protein interactions and CHAPS is largely used for isolating membrane proteins [10].

Another way found to improve protein extraction is to use chaotropic agents, such as urea and thiourea, associated with detergents to achieve success in denaturing and solubilizing proteins. The total cell concentrations used in extraction process would influence the amount of proteins recovered depending on the choice of extraction buffer and mechanical lysis method [11].

There is no single method of sample preparation that is adequate to all type of samples [12]. Several techniques and reagents can be used isolated or in conjunction to optimize the extraction of proteins. However no protocol has been developed specifically to perform protein extraction from sperm, especially concerning cell concentration, as well as association of mechanical and chemical lysis. Thus, with this study we aim to evaluate the efficiency of different extraction buffers associated or non with flash-frozen in different sperm cells concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All the reagents used were of high purity research grade and were purchased from companies GE Healthcare (Uppsala, Sweden), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil) or they are cited among the text

2.2. Sample preparation

A pool of 4 commercial straws of frozen bovine spermatozoa was used. The straws were thawed at 37° C for 40 sec and sperm concentration was measured in Neubauer chamber (Optik Labor, Friedrichsdorf, Germany). The cells were diluted 1: 2 in proteases inhibitor buffer (PIB) (0.8 mmol EDTA, 1.0 µg/mL aprotinin, 1.0 µg/mL leupeptin and 35.0 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride] in 50 mmol TRIS-HCl, pH 7.2), centrifuged at 700 G for 10 min, 3 times. Afterwards, samples were divided into 5 groups with different cell concentrations (2, 4, 6, 8 and 10 x 10⁶), all in duplicate. Samples were then divided in two groups, one group submitted to a frozen/thawed cycle 5 times in liquid nitrogen, while the other group was not submitted to

frozen/thawed to act as experimental controls. Samples were then processed using the treatments described in Table 1. All lysis solutions were prepared with the same protease inhibitors concentrations followed by sonication.

Table 1. Extraction buffers used to solubilize proteins from the bovine sperm

Extraction buffer	Reference	Composition
Nonidet P-40 (NP) ¹	[13]	0.1% nonidet P-40 PIB solution
Modified RIPA (RP) ²	[14]	150 mM NaCl 1% triton X-100 1% sodium deoxycholate 0.1% SDS 50 mM TRIS-HCl pH 7.5 PIB solution
Urea and thiourea (UT) ²	[14]	7 M urea 2 M thiourea 4% CHAPS 30 mM TRIS-HCl pH 8.5 PIB solution

¹Diluted in proteases inhibitor buffer (PIB – 0.8 mmol EDTA, 1.0 µg/mL aprotinin, 1.0 µg/mL leupeptin and 35.0 µg/mL PMSF [phenylmethylsulfonyl fluoride] in 50 mmol TRIS-HCl pH 7.2). ²Buffer containing 0.8 mmol EDTA, 1.0 µg/mL aprotinin, 1.0 µg/mL leupeptin and 35.0 µg/mL PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

After dilution in lysis buffer, all samples were sonicated according to Baker et al. [15], modified by Souza et al. [16] with a 3.0 mm probe, at 20% amplitude for 30 s on a water-ice-bath, repeated 10 times at intervals of 1 minute between the series. After sonication, samples were centrifuged at 15,000 g, 4° C for 30 min [15]. The supernatant, protein extract was stored at -80° C until further use.

The total protein concentration was determined using Pierce™ 660 nm protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) in spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

An aliquot containing 80 µg of protein was concentrated with acetone [17], and then ran in an one-dimensional electrophoresis SDS-PAGE [18] using a 12% (m/v) polyacrylamide separation gel. Gels were stained with Coomassie G-250 [19 adapted by 20, 21]. After the run, the gels were transferred to plastic containers and fixed in aqueous solution containing 40% (v/v) ethanol and 10%

(v/v) glacial acetic acid for 60 min. A stock aqueous solution containing 0.1% (w/v) coomassie brilliant blue G250, 2% (w/v) phosphoric acid and 10% (w/v) of ammonium sulphate was prepared. Subsequently, the gels were immersed in a working solution containing 80% (v/v) stock solution and 20% (v/v) methanol, and shaken overnight. Background was de-stained with distilled water and gels were stored in 10% (v/v) acetic acid aqueous solution.

Gels were digitized, analysed using Image Master software (Image Master™ 1D, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and a estimation of protein amounts and molecular weight based on integrity optical density was performed

Data collected was statistically analysed in Minitab 17 Statistical Software (Minitab, Inc. 2010 [www.minitab.com]), 3-way ANOVA test was used to compare the effect of the different methods of protein extraction in all sample groups. Residual values were tested for normality with the Kolmogorov-Smirnov normality test. Tukey pairwise comparison test was used to compare the different methods between several groups.

3. Results

The flash/frozen method increased total protein concentration only in NP group when sperm concentration was 6×10^6 or higher indicating that the freezing process influenced the concentration of protein extracted in this group. On the other hand when UT was used flash/frozen significantly reduced total protein concentration (Figure 1).

The extraction method was found to influence the final protein recovery concentration. Protein extracts obtained with UT buffer showed higher total protein concentration, followed by RP and NP (Figure 1). In RP there was no significant correlation between number of sperm and protein concentration ($p > 0.05$). In NP there was no statistical difference between samples with 2 and 4 million cells, and samples with 6 and 8 million cells. However UT treatment showed increased protein concentration recovered according to increase in sperm cells concentration. It should be emphasized that the increase in final protein concentration recovered was not proportional to the increase of sperm concentration.

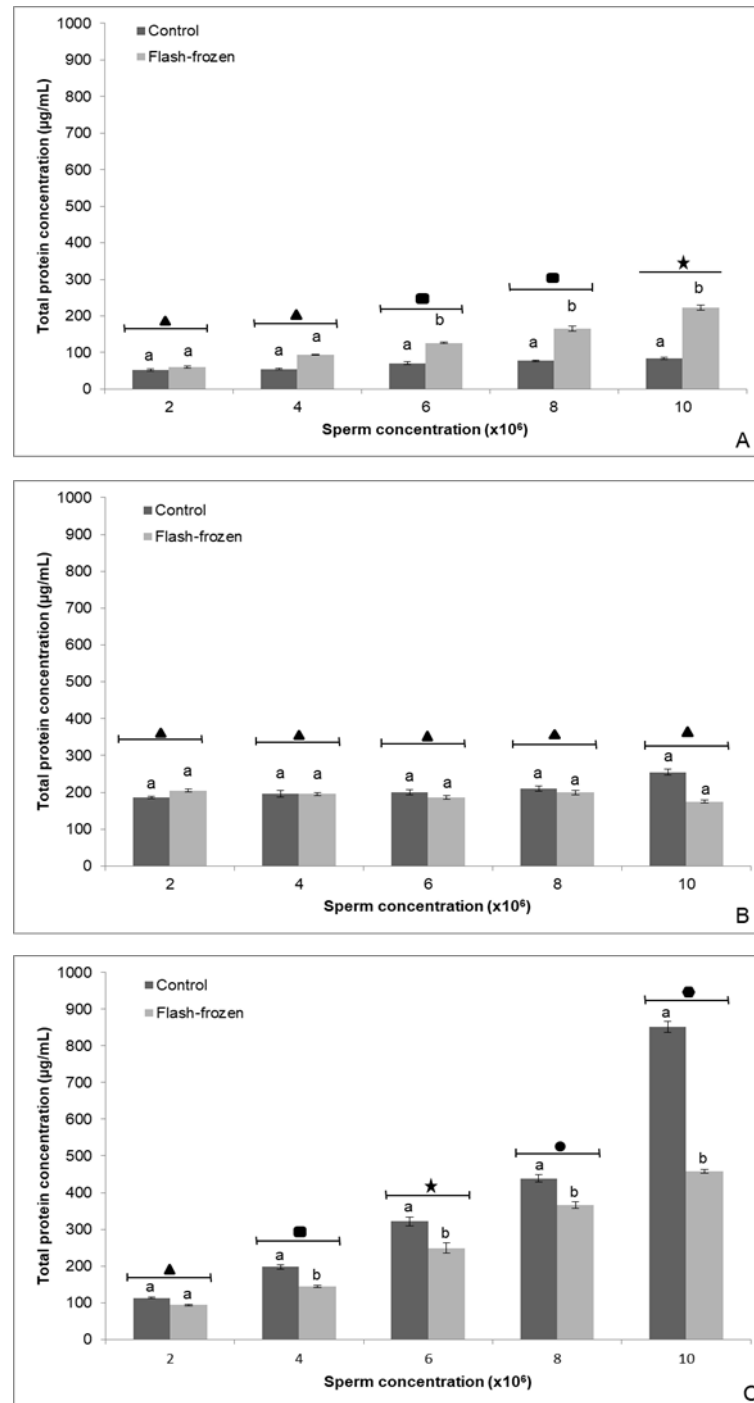


Figure 1. Means \pm standard error of total protein concentration in the treatments (buffers and flash-frozen or control) and sperm concentration. Dark bars are control samples, and light bars are flash-frozen samples. Symbols refer to statistical differences ($p < 0.05$) between group means with different spermatozoa concentration. Letters refer to statistical differences between control and flash-frozen samples in each concentration of sperm cells. **A.** Treatment with Nonidet P-40. **B.** Treatment with modified RIPA. **C.** Treatment with urea/thiourea/CHAPS.

In electrophoresis, a common molecular weight variation was observed for all groups between 11.53 and 225 kDa. The total number of bands obtained was 41, 52 and 33 in NP, RP and UT treatments, respectively. The optical density of common bands between groups showed a great variation. In Figure 2 the arrows represent a common band showing a great variation between groups ($p < 0.01$). Values of IOD of ~45 kDa band in the control group were 152.56, 732.03 and 66.78 to NP, RP and UT respectively, and 153.13, 774.06 and 44.46 in the same sequence of treatments in flash-frozen group.

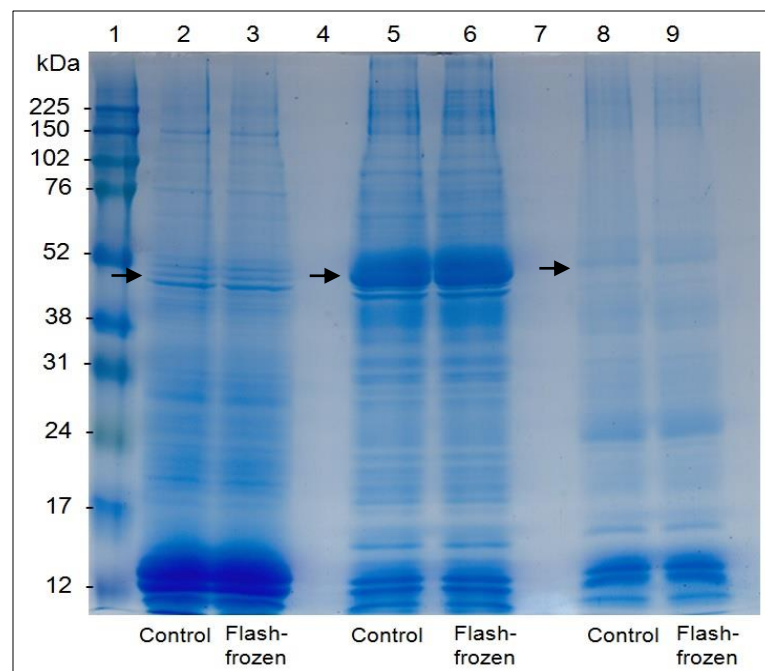


Figure 2. Polyacrylamide electrophoresis gel (SDS-PAGE) at 12% concentration in a separation gel, in a discontinuous alkaline system. Sperm protein extracts in control (lanes 2, 5 and 8) and flash-frozen (lanes 3, 6 and 9) samples. Lane 1, MW marker (full molecular weight range, 12–225 kDa). Lanes 2-3 are samples extracted with nonidet P-40, lanes 5-6 extracted with modified RIPA and 8-9 extracted with urea/thiourea/CHAPS.

4. Discussion

The flash-frozen is a mechanical lysis technique that has been proposed for use in protein extraction, which disrupts the plasma membrane for formation of ice crystals in the cellular cytoplasm [6]. The efficiency of this method in lysing sperm cells has been further supported by the results obtained

in this study only in NP treatment higher than 6×10^6 , in which flash-frozen improved the total protein concentration recovered from bovine sperm cells. Similar results were found previously in protein extraction of cryopreserved nervous tissue using liquid nitrogen prior and after tissue disintegration by sonication in SDS buffer [22]. Contrary results were found in UT treatment, which the cryopreservation decrease the protein concentration recovered. In frogs, urea appears to protect the animals cells from cold shock, protecting the cells from ice crystals formed [23]. Interestingly, in RP, the cryopreservation did not affect the protein recovery.

Sonication associated with the specific extraction buffer was used in this study in an attempt to improve final protein recovery rates since De Mey et al. [24] asserted that there is an increase in the number of proteins when employing similar process. Sonication used in microalgal culture has been shown to be effective in achieving cell rupture, with the protein concentration present in supernatant afterwards increasing with the increase in sonicator energy intensity [25], which was beyond the scope of this study. The sonication coupled with specific extraction buffers technique is frequently used to efficiently disrupt the membrane both of microorganisms and spermatozoa [15].

The ideal buffer choice for each sample type is an important step in protein extraction since each extraction buffer works differently in sample solubilization [26]. Thus, several extraction buffers were tested in this study to determine the most adequate for bovine sperm cells.

The buffer containing detergents Nonidet P-40 and Triton-X recovered fewer proteins than buffers containing CHAPS. Similar results were found with glycoproteins in rat cancer cells, in which Nonidet P-40 and Triton-X were less effective in the breakdown of protein interactions than methods containing CHAPS [27]. On the other hand Kubak and Yotis [28] have reported that in *Staphylococcus aureus*, an extraction buffer containing Triton X-100 obtained the most efficiency than the others buffers followed to Nonidet P-40.

Buffers containing urea and thiourea resulted in higher total protein concentration after extraction. As the results obtained in soybean samples using urea/thiourea and TCA compared to methods using only urea and phenol [29]. Chaotropes substances like urea and thiourea are commonly used to disrupt hydrophobic interactions between proteins and weak interactions between

molecules, and often used in association with detergents to attempt emulsify and denature samples [10].

The proteins recovered increase according to increase in cells number, although it was not found to be proportional. We proposed that media saturation occurred while proteins were extracted, since identical amount of medium was used for samples with different initial cell concentrations. According to our knowledge there is no study concerning the use of different concentrations of sperm cells for protein extraction, in this regard further investigation should be conducted.

Chen et al. [12] studied swine sperm cells and compared solubilization methods and their behavior in 2D-gel electrophoresis. They reported that the buffer containing thiourea in its composition showed the worse resolution, similar to our results with 1D-gel electrophoresis. According to our conclusion that proteins extracted with urea and thiourea do not permit a good resolution in gels. Similar results were found in leaves and roots of the tomato, where the group tested with urea, thiourea and CHAPS were discarded following impaired gel separation on 2D-gel electrophoresis [30]. Even minor impurities can affect the 2D gel quality final resolution as the solutions normally contain large amounts of urea [29,31]. Under these conditions dialysis can be indicated.

5. Conclusion

Our results may be due to the difference in action of each extraction buffer, cell amount and treatment. We conclude that the extraction buffer containing UT provide the greater effective protein extraction buffer, considering the amount of protein extracted. However, the protein extracted in buffer containing RP showed better resolution in 1D-gel electrophoresis.

Despite several studies have been published comparing different types of solubilization buffers to extract sperm proteins, in our knowledge this is the first study comparing the efficiency of several buffers and the effect different cell concentrations on the extraction process. Thus, we propose that by applying lower sperm concentrations to proteomic studies can be an important parameter, especially in rare samples.

Funding: This work was supported by grant 2013/23351-3, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

- [1] J. Aitken, M.A. Baker, The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int. J. Androl.* 31 (2007) 295-302.
- [2] A.H. Kashou, D.J. Benjamin, A. Agarwal, S.S. Du Plessis, The advent of sperm proteomics has arrived. *Open Reprod. Sci. J.* 3 (2011) 92-97.
- [3] O. D'Amours, G. Frenette, M. Fortier, P. Leclerc, R. Sullivan, Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction* 139 (2010) 545-556.
- [4] C. Kupradit, Ketudat-Cairns, M. The extraction and purification of boar sperm surface protein. *Suranaree J. Sci. Technol.* 16 (2009) 245-251.
- [5] A. Hafiz, Chapter 1, in: A. Hafiz, Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization, second ed., CRC Press, New York, 1959, pp. 1-34.
- [6] G.J. Morris, Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum. Reprod.* 21 (2006) 2075-2083.
- [7] B.T. Arachea, Z. Sun, N. Potente, R. Malik, D. Isailovic, R.E. Viola, Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. *Protein Expr. Purif.* 86 (2012) 12-20.
- [8] M. Maire, P. Champeil, J.V. Möller, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta.* 1508 (2000) 86-111.
- [9] A.M. Seddon, P. Curnow, P.J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 1666 (2004) 105-117.
- [10] D.W. Burden, Guide to the Disruption of Biological Samples. *Random Primers*, 12 (2012) 1-25.
- [11] T. Rabilloud, Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 355 (2007) 111-119.
- [12] Y.H. Chen, Y.H. Kuo, M.T. Chung, Y.F. Chiu, S.Y. Huang, Evaluation of different lysis buffers for improving resolution in proteomic analysis of porcine spermatozoa. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 40. (2011) 183-189.

- [13] S.K. Rajeev, K.V.R. Reddy, Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum. Reprod.* 19 (2004) 234-242.
- [14] M. Peach, N. Marsh, D.J. Macphee, Protein solubilization: attend to the choice of lysis buffer, in: Kurien, B.T.; Scofield, R. H. *Protein electrophoresis, methods and protocols*. Human Press, 2012, pp. 37-47.
- [15] S.S. Baker, R.A. Cardullo, C.D. Thaler, Sonication of mouse membranes reveals distinct proteins domains. *Biol. Reprod.* 66 (2002) 57-64.
- [16] F.F. Souza, V.H. Chirinéa, M.I.M. Martins, M.D. Lopes, Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (2009) 283-286.
- [17] B.D. Hames, An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis, in: Hames B D, Rickwood D. (eds). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, London, IRL Press Limited, 1981, pp. 290.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 (1970) 680-685.
- [19] V. Neuhoff, R. Stamm, H. Eibl, Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis.* 6 (1985) 427-448.
- [20] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9 (1988) 255-262.
- [21] S. Luo, N.B. Wehr, R.L. Levine, Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal. Biochem.* 350 (2006) 233-238.
- [22] C. Ericsson, I. Peredo, M. Nistér, Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples. *Acta. Oncol.* 46 (2007) 10-20.
- [23] E.A. Fincel, Urea: A natural cryoprotectant in the freeze tolerant wood frog (*Rana sylvatica*), 2006, pp. 56. Master thesis Eastern Illinois University, Illinois, 2006
- [24] M. De Mey, G.J. Lequeux, J. Maertens, C.I. De Muynck, W.K. Soetaert, E.J. Vandamme, Comparison of protein quantification and extraction methods suitable for *E. coli* cultures. *Biologicals,* 36 (2008) 198-202.

- [25] U.D. Keris-Sem, U. Sen, G. Soydemir, M.D. Gurol, An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresour. Technol.* 152 (2014) 407-413.
- [26] D. Linke, Detergents: and overview. In: L. Galluzzi, J.M.B. Pedro, G. Kroemer, *Methods Enzymol.*, Elsevier, 2009, cap. 34, p. 603-617.
- [27] M.O. Labeta, N. Fernandez, H. Festenstein, Solubilisation effect of Nonidet P-40, Triton X-100 and CHAPS in the detection of MHC-like glycoproteins. *J. Immunol. Methods* 112 (1988) 133-138.
- [28] B.M. Kubak, W.W. Yotis, Solubilization and electrophoretic analysis of *staphylococcus aureus* membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 687 (1982) 238-246.
- [29] S. Natarajan, XU, C. T.J. Caperna, W.M. Garrett, Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal. Biochem.* 342 (2005) 214-220.
- [30] M.B. Vilhena, M.R. Franco, D. Schmidt, G. Carvalho, R.A. Azevedo, Evaluation of protein extraction methods for enhanced proteomic analysis of tomato leaves and roots. *Acad. Bras. Cienc.* 87 (2015) 1853-1863.
- [31] P.W. Reed, A. Densmore, R.J. Bloch, Optimization of Large Gel 2D Electrophoresis for Proteomic Studies of Skeletal Muscle. *Electrophoresis.* 33 (2012) 1-14.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESE E OBJETIVOS

Hipótese

Existem proteínas diferentemente expressas entre os espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil proteico dos espermatozoides previamente sexados por citometria de fluxo por meio de técnicas de espectrometria de massas, afim de encontrar proteínas diferentemente expressas nas células espermáticas para futura utilização em técnicas de imunossexagem.

ARTIGO 2

Artigo redigido segundo as normas da *Reproduction*, ISSN: 0022-4251,
ranqueada como A1 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE ESPERMATOZOIDES SEXADOS X
E Y DE TOUROS**

CAROLINE SCOTT¹; FABIANA FERREIRA DE SOUZA¹; VIVIANA HELENA
VALLEJO ARISTIZABAL¹; MARK BAKER²; JOSE ANTONIO DELL'AQUA
JUNIOR^{1*}

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

² Reproductive Science Group, Faculty of Science and IT, University of
Newcastle, Australia

*Autor de correspondência:

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/nº
Bairro: Unesp Campus de Botucatu
CEP: 18.618-681 - Botucatu – SP, Brasil
E-mail: dellaquajunior@uol.com.br

28 **RESUMO**

29

30 A identificação de proteínas distintas presentes na membrana de
31 espermatozoides com cromossomos X e Y possibilita o desenvolvimento de
32 técnicas de imunosexagem. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi analisar
33 o perfil proteico de espermatozoides previamente sexados por citometria de
34 fluxo. Foram utilizadas amostras de sêmen sexado (n = 6 amostras X e n = 6
35 amostras Y). As proteínas foram extraídas e analisadas pela aquisição
36 independente de dados (DIA) por espectrometria de massas. Os dados foram
37 pesquisados no banco de dados *Swiss Prot* na taxonomia *Bos taurus*. Foram
38 encontradas 459 proteínas comuns aos grupos, 10 apresentaram significância
39 estatística. Dentre as principais proteínas encontradas, a *seminal plasma*
40 *protein PDC-109* parece não ter relação com os espermatozoides, uma vez que
41 é originária do plasma seminal. A *PREDICT dynein intermediate chain 2*
42 *axonemal* é responsável pela motilidade dos espermatozoides e se apresentou
43 mais abundante nos espermatozoides Y. As proteínas *FUN14 domain-*
44 *containing protein 2*, *NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7*
45 *mitochondrial*, *cytochrome C oxidase subunit 2*, *acetyl-CoA carboxylase type*
46 *beta* foram mais expressas em X e a *pyruvate dehydrogenase protein X*
47 *component* em Y, as quais atuam nos caminhos de produção energética por
48 diferentes vias. A *heat shock protein 60 kDa* e *PREDICT EF-hand domain-*
49 *containing protein 1*, mais expressas no espermatozoide Y estão envolvidas as
50 maiores taxas de desenvolvimento embrionário. Este estudo encontrou
51 proteínas ainda não descritas nos espermatozoides ou nas células contendo o
52 cromossomo X ou Y. Os resultados podem contribuir para estudos

53 relacionados ao espermatozoide sexado e desenvolvimento da imunosexagem.

54

55 **Palavras chave:** bovinos, imunosexagem, proteômica, sêmen-sexado

56

57 **Introdução**

58

59 O crescimento do rebanho bovino mundial se deve as diversas
60 pesquisas em biotécnicas aplicadas à reprodução, com destaque às técnicas
61 moleculares no entendimento da fisiologia animal e as que abordam
62 biotecnologia do sêmen, incluindo, a sexagem espermática. A sexagem
63 espermática se apresenta como uma das biotecnologias de maior impacto no
64 sistema de produção de bovinos. Entretanto, sua aplicação a campo ainda é
65 reduzida, devido à baixa qualidade do sêmen sexado por citometria de fluxo
66 (Beyhan et al., 1999; Fetrow et al., 2007). Para os bovinos, essa seleção
67 representa um grande potencial para o melhoramento genético e a satisfação
68 da demanda do mercado (Parati et al., 2006).

69 Existem diferenças, ainda que sutis, entre os espermatozoides X e Y
70 em relação ao conteúdo de DNA, ao tamanho, a motilidade, a carga e aos
71 antígenos de superfície (Garner; Seidel, 2008; Boro et al., 2016).O conteúdo de
72 DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies.
73 Em bovinos essa diferença chega a 3,8% e até o momento esta é a única
74 diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de
75 espermatozoides X ou Y *in vitro* (Johnson, Welch 1999; Rath et al., 2013).

76 A centrifugação em gradiente de densidade é uma técnica
77 alternativa para separação espermática e vêm sendo proposta há vários anos.
78 Esta técnica é considerada simples, e se baseia na diferença de densidade
79 entre os espermatozoides X e Y, uma vez que os espermatozoides X possuem
80 mais DNA que os espermatozoides Y (Sumner; Robinson, 1976; Tucker,
81 Janser, 2002). Vários autores descrevem do gradiente de densidade (Tucker,

82 Jansen 2002; Lima 2007; 2011; Esmailpour et al., 2012; Kanesharatnam et al.,
83 2012), entretanto, não é considerada como alternativa, devido a falta de
84 precisão e repetibilidade (Seidel Jr, 2012).

85 A citometria de fluxo é atualmente a única técnica viável capaz de
86 separar os espermatozoides contendo os cromossomos X e Y com alta
87 eficácia, cerca de 90% de pureza (Seidel Jr, 2012). É um método funcional,
88 mas ainda é uma técnica com baixa taxa de prenhez em comparação ao uso
89 de sêmen convencional devido a danos nos espermatozoides e a baixa
90 concentração de espermatozoides/palheta (Bondan, 27 mar, 2012; Dejarnet,
91 06 mar. 2012). Além disso, a aplicação de sexagem no campo, associada à
92 inseminação artificial em tempo fixo, tem gerado discussão quanto às suas
93 vantagens e custo-benefício, uma vez que as doses sexadas têm alto custo e
94 seu uso é aconselhado apenas em novilhas não lactantes, superovulados e/ou
95 sincronizadas (Graaf et al., 2006).

96 Uma alternativa é a imunosexagem, que é baseada na busca de
97 proteínas marcadoras de células espermáticas contendo o cromossomo X ou
98 Y. Porém, a expressão proteica, após o espermatozoide se tornar uma célula
99 haploide, ainda é um tema controverso. Alguns autores relatam a possibilidade
100 da transcrição de proteínas sexo-específicas em espermatozoides X e Y
101 (Galeraud-Denis et al., 2007; Hu, et al.; 2015). Nesse sentido, a identificação
102 de diferenças, mesmo que sutis, na superfície da membrana espermática
103 possibilitaria o desenvolvimento de uma técnica de imunosexagem mais
104 eficiente e promissora para utilização no sistema de produção de bovinos.

105 Considerando que não é necessário um equipamento sofisticado a
106 técnica de imunosexagem possui excelente custo benefício. O primeiro passo

107 para o sucesso da técnica é encontrar proteínas diferenciais entre os
108 espermatozoides sexados X e/ou Y. Atualmente, com o desenvolvimento de
109 técnicas mais refinadas em relação a análise proteômica de sistemas
110 biológicos, como a espectrometria de massas, há possibilidade de uma
111 investigação mais minuciosa sobre o perfil proteico de diferentes tipos
112 celulares.

113 Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi analisar o perfil
114 proteico de espermatozoides sexados por citometria de fluxo visando identificar
115 diferenças que possibilitem o desenvolvimento de uma técnica para
116 imunosexagem.

117

118 **Materiais e Métodos**

119

120 Reagentes

121 Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e
122 adquiridos das empresas GE Healthcare (Uppsala, Suécia) e Sigma-Aldrich
123 (São Paulo, Brasil), quando não, foram citados.

124

125 Aspectos Éticos

126 Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de
127 Experimentação Animal (COBEA) foram considerados em cada etapa desse
128 estudo, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais
129 (CEUA) Institucional, sob o protocolo nº 144/2015.

130

131

132 Amostras

133 Foram utilizadas doses comerciais de sêmen de touros sexado de
134 touros por citometria de fluxo, sendo 6 amostras de espermatozoides
135 portadores do cromossomo X e 6 amostras de espermatozoides portadores do
136 cromossomo Y.

137

138 Solubilização das proteínas espermáticas e digestão trípica dos peptídeos

139 Após a descongelação das palhetas (37° C, 30 segundos), $\sim 6 \times 10^6$
140 espermatozoides foram submetidos ao gradiente de Percoll (90%-45%)
141 centrifugados por 30 minutos, a 500g, seguido por 3 lavagens (500g, 5
142 minutos) em meio Biggers–Whitten–Whittingham (BWW) (Biggers et al., 1971).
143 Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 200 μ L
144 de uma solução aquosa contendo 1% C7Bzo, 7 M ureia, 2M tiouréia e 40 mM
145 de Tris, e a mistura foi mantida por 1 hora, a 4° C. Em seguida, as amostras
146 foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação da
147 concentração de proteínas totais pelo método 2-D Quant kit (GE Healthcare,
148 Life Science, Castle Hill, NSW, Australia) de acordo com o protocolo do
149 fabricante.

150 Para digestão trípica dos peptídeos uma alíquota contendo 100 μ g
151 de proteína foi acrescida de uma solução aquosa final de 10 mM de DTT. A
152 mistura foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, uma solução
153 aquosa final de 20 mM de iodoacetamida foi adicionada e as amostras foram
154 mantidas em repouso, por 1 hora, a temperatura ambiente, protegida da luz. As
155 proteínas foram precipitadas utilizando metanol/clorofórmio de acordo com
156 Wessel e Flügge (1984).

157 Após a precipitação, uma solução contendo 1 M de ureia, 25 mM de
158 bicarbonato de amônio e 1 µg de tripsina (Sequence Grade Modified Tripsin
159 V5111, Promega Biotecnologia do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) foi adicionada
160 a cada 50 µg de proteína, mantidas a 30° C, em constante agitação, *overnight*.
161 Em seguida, 0,1% de ácido trifluoroacético na solução final foi adicionado e as
162 amostras foram submetidas à espectrometria de massas.

163

164 Espectrometria de massas (MS)

165 Para análise de proteínas por espectrometria de massas, uma
166 alíquota de 1,0 µL (5,0 µg de proteína) resultante da digestão dos peptídeos foi
167 aplicada no equipamento. A separação de fase reversa foi realizada utilizando
168 um sistema Ultimate 3000 nano HPLC (Dionex, Thermo Fisher Scientific,
169 Idstein, Germany) com 0,1% de ácido fórmico como solvente A e 0,1% de ácido
170 fórmico acrescido de 80% de acetonitrila como solvente B. A separação foi
171 obtida utilizando um auto amostrador, uma bomba de carga e uma bomba de
172 gradiente de nano-HPLC combinada com uma coluna (PepMap™ 300 C18 LC
173 Columns, Thermo Fisher Scientific™, Rockford, IL, USA), 75 µm de diâmetro
174 interno, 150 mm de comprimento, tamanho de partícula de 3 µm e poro de 100
175 Å. Os peptídeos foram pré-concentrados numa coluna (PepMap™ 300 C18 LC
176 Columns, Thermo Fisher Scientific™, Rockford, IL, USA) de diâmetro interno de
177 300 µm, comprimento de 15 mm e uma taxa de fluxo de 20 µL/minuto. A
178 separação foi realizada com uma taxa de fluxo de 300 nL/minuto utilizando um
179 gradiente binário a partir de 5% de solvente B aumentando para 40% em 60
180 minutos. Após a eluição, a coluna foi lavada com 95% de solvente B durante 10
181 minutos e, subsequentemente, equilibrada com 2% de solvente B durante 20

182 minutos. Os peptídeos foram diretamente eluidos para um espectrômetro de
183 massa com uma fonte *nanoelectrospray* (ESI). Para análise da espectrometria
184 de massas dependente de dados (DDA) utilizou-se um ESI *linear ion trap*
185 (Orbitrap Q-exactive, Thermo Fisher ScientificTM, Bremen, Germany). O ciclo de
186 trabalho de aquisição da MS foi configurado com uma varredura de pesquisa
187 seguida de 20 varreduras dependentes dos picos mais intensos com um limite
188 de exclusão de 30 segundos. Para a análise independente de dados (DIA), a
189 amostra foi reanalisada pelo nano-HPLC com injeção direta no equipamento
190 utilizando as mesmas condições que a DDA. A especificação de massa foi
191 ajustada para uma gama de varrimento MS de 500-750 e 750-1000 Da,
192 seguida por janelas de fragmentos de 4 Da.

193

194 Bioinformática

195 Utilizando a funcionalidade do software Peakview (version 2.2.0; AB
196 Sciex), para extração máxima e alinhamento espectral. O conjunto de dados da
197 espectrometria de massas foi resgatado, conservando os peptídeos individuais
198 e seus escores, combinando-os para identificar proteínas com significância
199 maior que aquelas com identificadas por peptídeos únicos. Foi fixada uma *false*
200 *discovery rate* (FDR) de 1 % para a quantificação e erro de tolerância de massa
201 de 10 ppm.

202 Os dados foram pesquisados no banco de dados SwissProt, *Bos*
203 *Taurus* (versão de junho de 2016, 127.380 proteínas). Para a análise dos
204 dados DIA, foi utilizado o software *Skyline* versão 3.6
205 (<http://proteome.gs.washington.edu/software/skyline>), os 5 fragmentos de íons
206 mais intensos por peptídeo foram extraídos dos conjuntos de dados utilizando

207 um mínimo de 3 peptídeos por proteína. Após o processamento de dados,
208 utilizou-se peptídeos com confiança de 99 %. A busca das proteínas preditas
209 (*Predict*) foi realizada no banco de dados *Homo sapiens* (www.uniprot.org).

210 A ontologia gênica das proteínas diferenciais foi realizada utilizando o
211 as ferramentas disponíveis no Uniprot (www.uniprot.org) e Panther
212 (<http://pantherdb.org/>, Mi et al., 2016) nas categorias processo biológico,
213 componente celular, função molecular e classe de proteínas. O interatoma de
214 cada proteína diferencial foi confeccionado utilizando-se o *software String* na
215 taxonomia *Bos taurus* (<http://string-db.org/>).

216

217 Análise estatística

218 Para a análise das variáveis (quantidade de proteína nos extratos
219 proteicos das células espermáticas contendo cromossomo X ou Y) os dados
220 foram normalizados, transformados (\log_2) e comparados utilizando ferramentas
221 disponíveis no *software* Perseus versão 1.5.6.0 ([http://www.perseus-](http://www.perseus-framework.org)
222 [framework.org](http://www.perseus-framework.org)). O teste t de Student foi utilizado para a comparação dos
223 resultados das variáveis. Considerou-se um nível de significância de $p \leq 0,05$ e
224 *fold change* $> \pm 1,5$. A análise de componente principal (PCA) e o agrupamento
225 hierárquico também foram realizados usando o mesmo *software*.

226

227 RESULTADOS

228

229 Os resultados da espectrometria de massas foram utilizados para
230 identificar as proteínas com padrões de abundância relativa diferencial entre os
231 espermatozoides X e Y. Foram identificadas 459 proteínas com pelo menos 3

232 peptídeos, comuns aos grupos, dessas, 10 apresentaram $p < 0,05$, porém
233 apenas 7 tiveram *fold change* $> \pm 1,5$ (Tabela 1). As proteínas foram
234 classificadas em 4 categorias distintas de acordo com a ontologia gênica
235 (classe de proteínas, função biológica, compartimento celular e processo
236 biológico, Figura 1).

237 A PCA está representada na Figura 2, na qual foi possível identificar
238 que não houve correlação entre os grupos na somatória dos componentes
239 principais 1 e 2, eixo horizontal e vertical, respectivamente. A Figura 3
240 representa o agrupamento hierárquico das amostras sexadas para X e para Y.
241 Nota-se que houve similaridade entre as amostras do mesmo grupo exceto
242 pelas amostras Y1 e Y6.

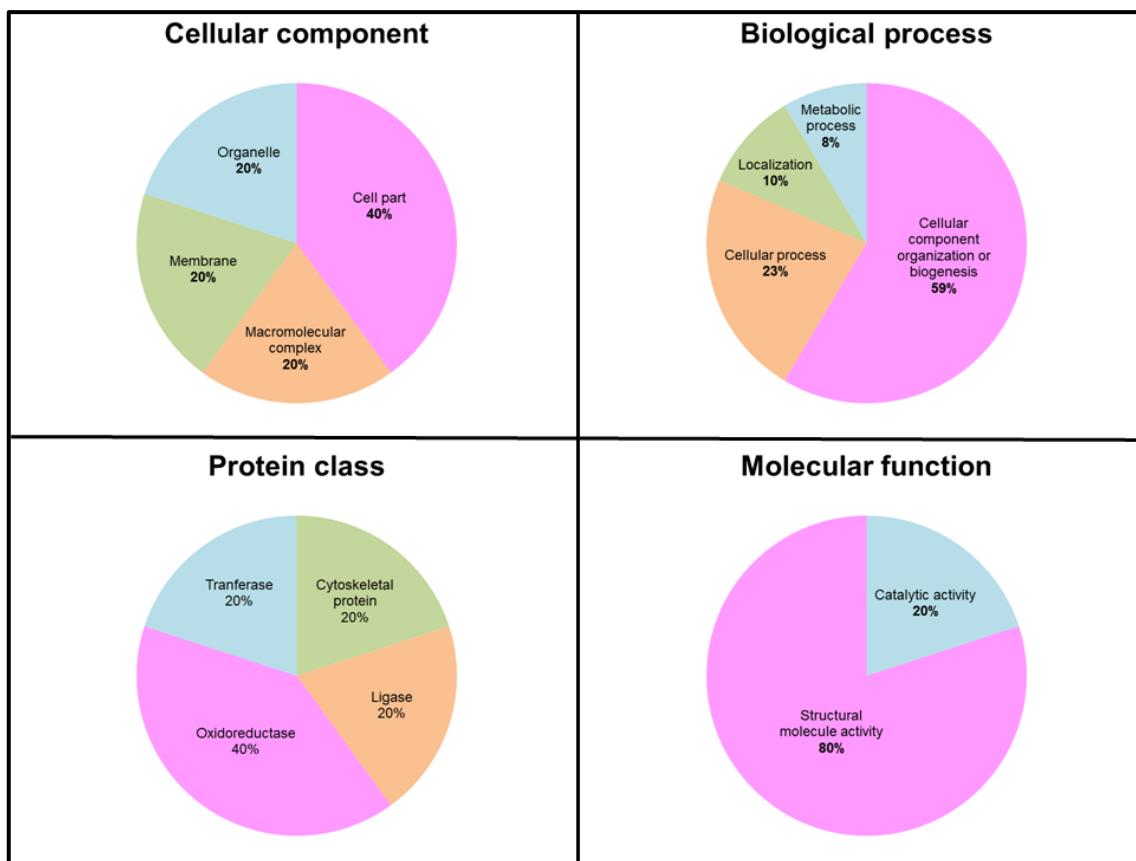
243 Exceto a *seminal plasma protein PDC-109* que não possui gene
244 descrito no banco de dados necessário para a busca no *software String*, os
245 interatomos de cada proteína foram apresentados nas figuras de 4 a 12. O
246 interetoma relacionando as 10 proteínas diferentemente expressas está
247 apresentado na figura 13.

248

249 **Tabela 1.** Proteínas diferencialmente identificadas pela espectrometria de
 250 massas de espermatozoides sexados X e Y e respectivos *fold change* (FC).

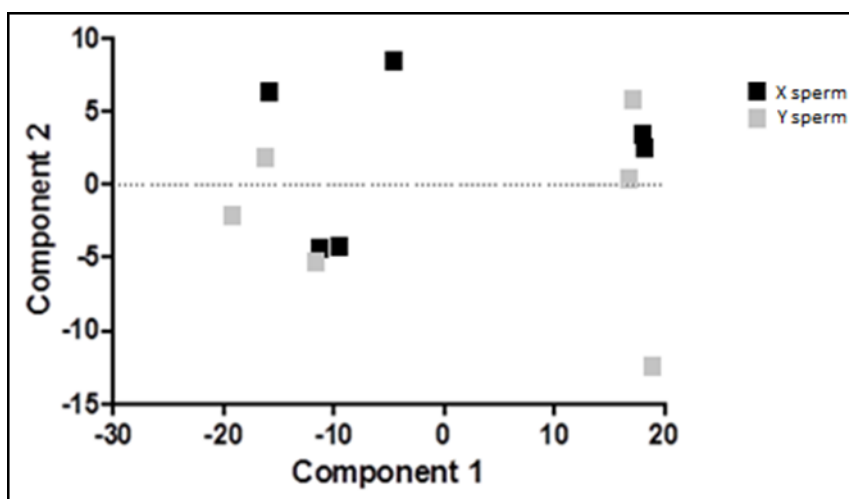
Proteína	p	FC	sptz X*
FUN14 domain-containing protein 2	0,029	2,612	↑
Acetyl-CoA carboxylase, type beta	0,048	2,149	↑
Seminal plasma protein PDC-109	0,039	1,580	↑
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	0,018	1,502	↑
PREDICT EF-hand domain-containing protein 1	0,009	0,508	↓
PREDICT Dynein intermediate chain 2, axonemal	0,021	0,457	↓
Pyruvate dehydrogenase protein X componente	0,003	0,393	↓
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	0,048	1,491	↑
Cytochrome c oxidase subunit 2	0,013	1,399	↑
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,031	0,810	↓

251 *sptz X: espermatozoides contendo o cromossomo X



252

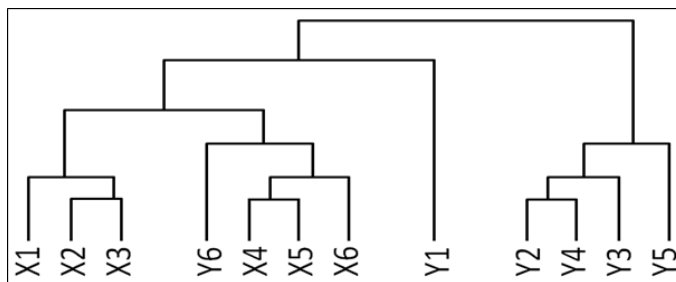
253 **Figura 1.** Ontologia gênica obtida no *software* Panther para processo biológico,
 254 componente celular, função molecular, e classe de proteínas das amostras
 255 estatisticamente diferente ($p < 0.05$).



256

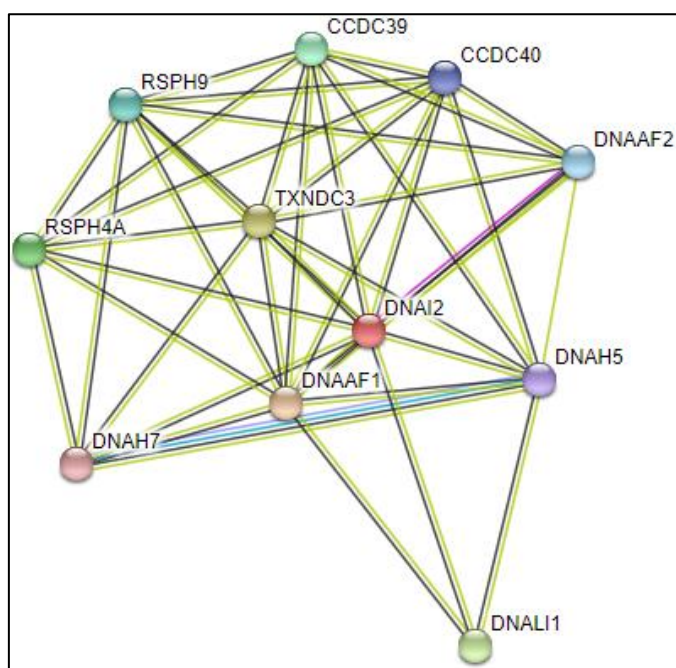
257 **Figura 2.** PCA dos espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y.
 258 Quadrados pretos representam amostras X e cinzas, as amostras Y.

259



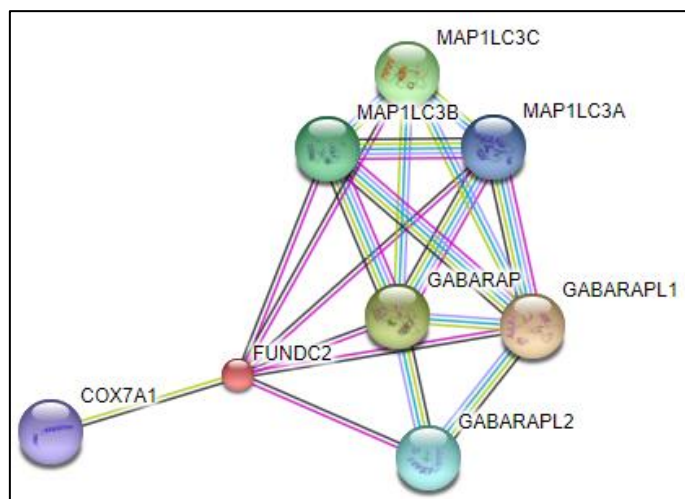
260 **Figura 3.** Agrupamento hierárquico das amostras X e Y. O agrupamento
 261 hierárquico foi produzido utilizando dados dos grupos X e Y com a abundância
 262 relativa das 7 proteínas com $< 0,05$ e *fold change* $> \pm 1,5$.

263



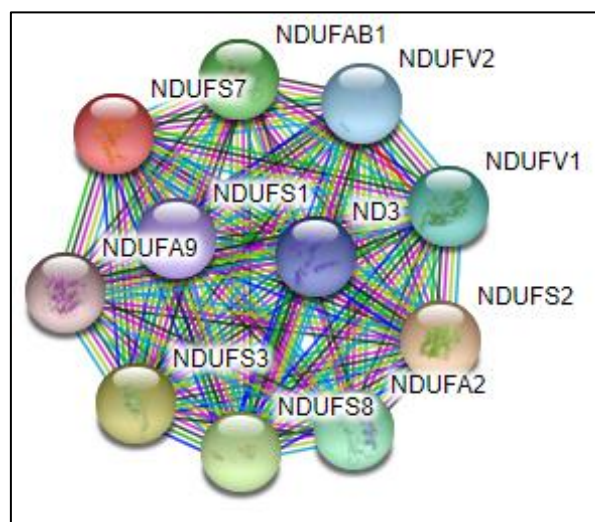
264 **Figura 4.** Interatoma das proteínas relacionadas a *dynein intermediate chain 2*,
 265 *axonemal* (DNAI2) (<http://string-db.org/>).

266



267

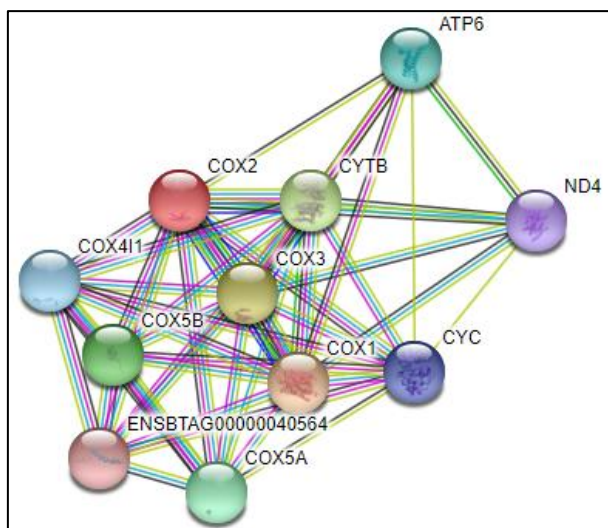
268 **Figura 5.** Interatoma das proteínas relacionadas a *FUN14 domain-containing*
 269 *protein 2* (FUNDC2) (<http://string-db.org/>).



270

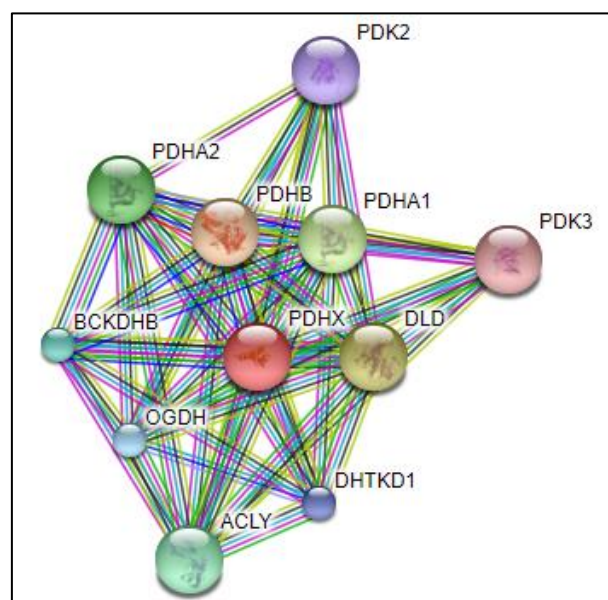
271 **Figura 6.** Interatoma das proteínas relacionadas a *NADH dehydrogenase*
 272 *[ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial* (NDUF S7) (<http://string-db.org/>)

273



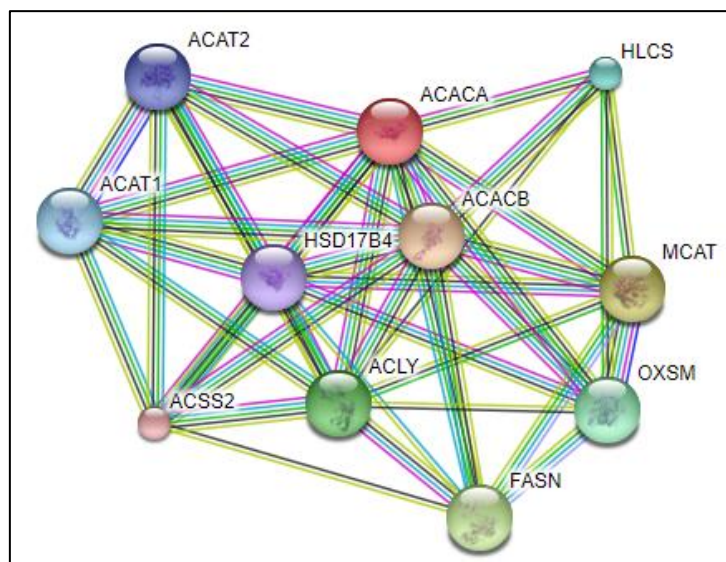
274

275 **Figura 7.** Interatoma das proteínas relacionadas a *cytochrome C oxidase*
 276 *subunit 2* (COXII) (<http://string-db.org/>)

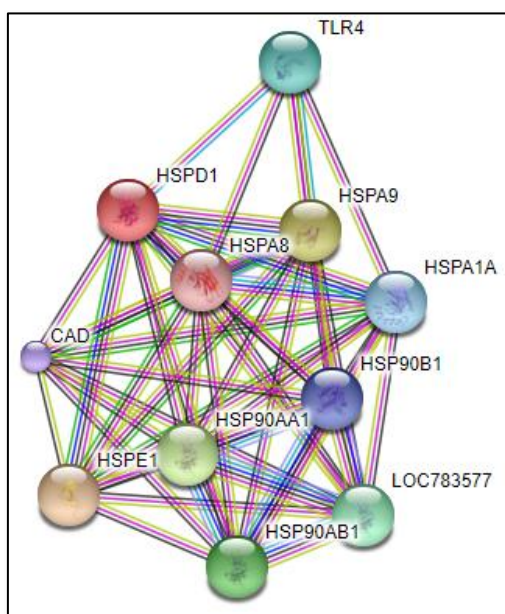


277

278 **Figura 8.** Interatoma das proteínas relacionadas a *pyruvate dehydrogenase*
 279 *protein X component* - PDHX (<http://string-db.org/>)

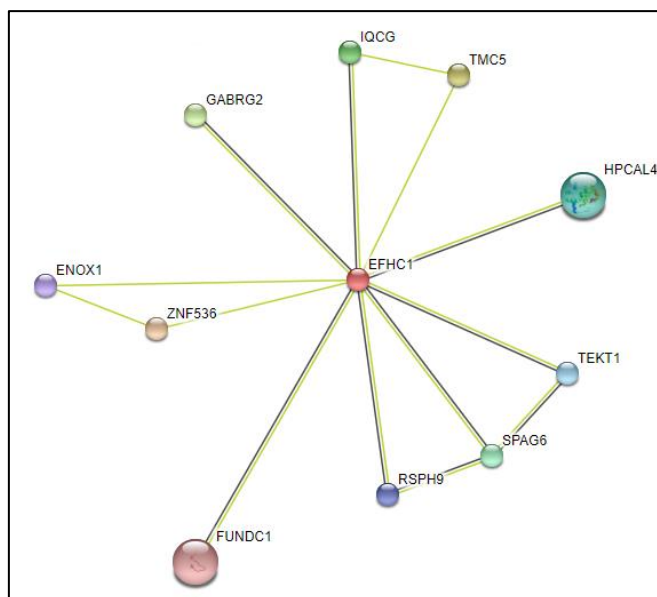


280

281 **Figura 9.** Interatoma das proteínas relacionadas a *acetyl-CoA carboxylase*282 *type beta* (ACACB) (<http://string-db.org/>)

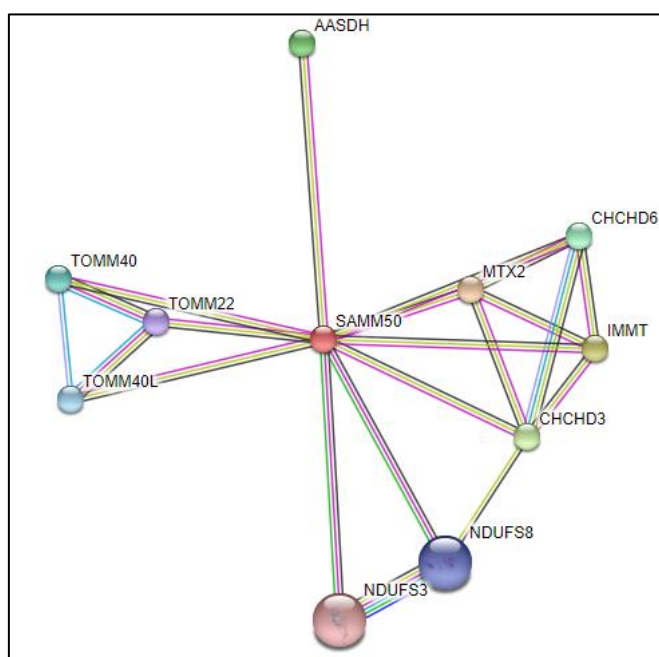
283

284 **Figura 10.** Interatoma das proteínas relacionadas a *heat shock protein 60 kDa*285 (HSP60) (<http://string-db.org/>)



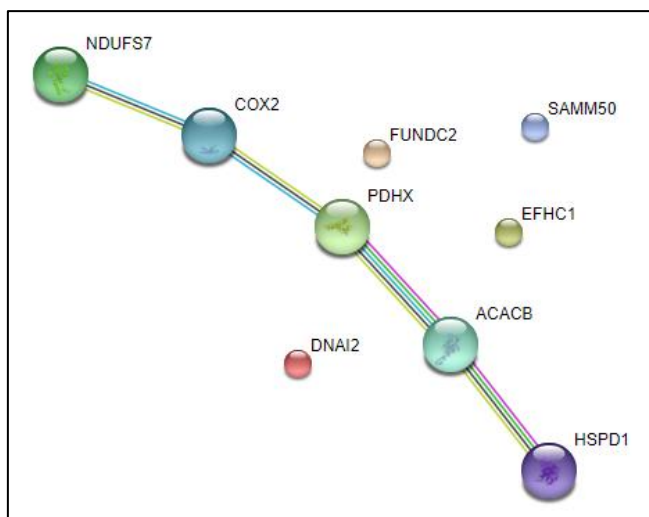
286

287 **Figura 11.** Interatoma das proteínas relacionadas a *EF-hand domain-*
 288 *containing protein 1* (EFHC1) (<http://string-db.org/>)



289

290 **Figura 12.** Interatoma das proteínas relacionadas *sorting and assembly*
 291 *machinery component 50 homolog* (SAMM50) (<http://string-db.org/>)



292

293 **Figura 13.** Interatoma das proteínas diferencialmente abundantes entre as
 294 amostras de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y (DNAI2;
 295 FUNDC2; NDUFS7; COXII; PDHX; ACACB; HSP60; EFHC1; SAMM50)
 296 (<http://string-db.org/>).

297

298 DISCUSSÃO

299 Ainda que haja evidência da existência de uma grande variedade de
 300 genes ligados ao sexo diferentemente expressos entre X e Y (Hu; Namekawa,
 301 2015), alguns autores têm mostrado a limitação entre a expressão de proteínas
 302 diferenciais entre esses grupos (Chen, 2012, De Cânio, 2013). No presente
 303 trabalho foram encontradas 10 proteínas diferencialmente abundantes entre as
 304 amostras de espermatozoides X e Y, sendo 7 delas com *fold change* >1,5, em
 305 sua maioria relacionadas a produção energética. Deve-se ressaltar que este é
 306 o primeiro estudo em bovinos que descreveu as proteínas diferencialmente
 307 expressas entre espermatozoides sexados utilizando a análise de
 308 espectrometria de massa com aquisição de dados independentes.

309 Partindo de amostras previamente sexadas por citometria de fluxo é
 310 relevante considerar que pode haver contaminação cruzada de cerca de 10%

311 com células do sexo oposto (Seidel Jr, 2012), como observado neste estudo no
312 agrupamento hierárquico nas amostras Y1 e Y6, as quais foram agrupadas
313 com as X. Contudo, este estudo permitiu, ainda que inicialmente, o
314 entendimento da diferença em expressão das proteínas dos espermatozoides
315 portadores dos cromossomos X e Y e sua relação aos processos fisiológicos e
316 metabólicos nessas células.

317 Neste estudo, semelhante ao descrito por De Canio et al. (2013), a
318 *seminal plasma protein PDC-109* (BSP1, Manjunath et al., 2009) apresentou
319 maior abundância relativa nas amostras dos espermatozoides portadores do
320 cromossomo X. Esta é a proteína mais abundante encontrada no plasma
321 seminal dos bovinos e tem atividade de chaperona (proteína auxiliar)
322 (Sankhala; Swamy, 2010). Se liga ao espermatozoide na superfície da
323 membrana plasmática (Aumuller et al., 1988) promovendo a ligação com o
324 epitélio da tuba uterina, prolongando a manutenção da motilidade (Gwathmey
325 et al., 2006). Está envolvida na capacitação espermática e reação do
326 acrossomo resultando na desestabilização da membrana devido a estimulação
327 do efluxo de colesterol que leva ao influxo de cálcio e aumenta o pH intracelular
328 (Thérien et al., 1999; Thomas et al., 2003; Srivastava et al., 2013). Neste
329 estudo essa proteína foi desconsiderada como relevante, haja vista sua origem
330 do plasma seminal (Soggiu et al., 2013), não havendo relação com
331 espermatozoides sexados.

332 Apesar de De Canio et al. (2013) relatarem maior abundância de
333 proteínas relacionadas ao citoesqueleto da cauda dos espermatozoides X,
334 neste estudo, a proteína *dynein intermediate chain 2, axonemal* (DNAI2),
335 presente no axonema, foi mais abundante nas amostras de espermatozoides

336 Y, justificando a maior velocidade destas células (Boro, 2016). Acreditamos que
337 a DNAI2 é a principal responsável pela maior velocidade das células Y, uma
338 vez que as proteínas relacionadas à cauda são, estão em sua maioria,
339 relacionadas a movimentação espermática (Dungdung et al., 2016), confirmado
340 pelas proteínas apresentadas no interatoma que se relacionam ao movimento
341 espermático. Embora alguns autores afirmaram que o espermatozoide X, por
342 possuir maior quantidade de DNA é mais pesado e se torna mais lento
343 (Ericsson et al., 1973). Contudo, trata-se de estudo antigo que não relacionou a
344 composição proteica das células espermáticas e suas funções.

345 Proteínas da cauda se relacionam a motilidade espermática, porém
346 outros fatores, como a produção de ATP, também são determinantes na
347 velocidade das células. A produção de ATP ocorre nas mitocôndrias por
348 processos metabólicos, biológicos e bioquímicos, e depende de proteínas
349 interligadas que participam da síntese e transporte de moléculas, assim como a
350 *FUN14 domain-containing protein 1* (FUNDC1) presente na membrana externa
351 da mitocôndria. É uma proteína receptora de hipóxia, induz a fragmentação
352 mitocondrial e tem papel fundamental na mitofagia (Liu et al., 2012; Chen et al.,
353 2016), função semelhante a da *FUN14 domain-containing protein 2* (FUNDC2).
354 Este processo é importante na remoção de mitocôndrias danificadas ou não
355 desejadas (Chen et al., 2016). Alguns autores afirmam que após a expressão
356 de FUNDC2 há um decréscimo significativo no número total de mitocôndrias, e
357 ao contrário, a depleção desta proteína conserva o número total de
358 mitocôndrias (Liu et al., 2012). Acreditamos que a maior abundância desta
359 proteína nas amostras X pode levar ao aumento da mitofagia, diminuindo a
360 produção de ATP e conseqüentemente menor velocidade desta célula. No

361 nosso conhecimento, até o momento não há relatos da relação da FUNDC1 ou
362 FUNDC2 e espermatozoides de bovinos, sendo está a primeira descrição da
363 proteína neste tipo celular.

364 Outra proteína diferencialmente encontrada, relacionada à produção
365 de energia via fosforilação oxidativa, foi a *NADH dehydrogenase [ubiquinone]*
366 *iron-sulfur protein 7, mitochondrial* (NDUFS7 - complexo I) presente na
367 membrana interna mitocondrial é o primeiro complexo enzimático na cadeia
368 transportadora de elétrons das mitocôndrias, produz ATP via fosforilação
369 oxidativa (Zhuchenko et al., 1996; Sharma et al., 2009). É também a maior
370 produtora de espécies reativas de oxigênio (EROs) *in vivo*, uma das principais
371 causas de estresse oxidativo, levando a danos mitocondriais (Hirst et al., 2008;
372 Hirst, 2013). Desta forma, acreditamos que as amostras sexadas X por
373 apresentarem maior abundância relativa desta proteína, podem sofrer maior
374 estresse oxidativo e, por sua vez, ter a motilidade reduzida em vista de lesão
375 na membrana mitocondrial causadas pelas EROs (Varner et al., 2014).

376 A *cytochrome c oxidase subunit 2* (COX2 - complexo IV), assim
377 como NDUFS7 - complexo I, também é uma proteína presente na membrana
378 interna mitocondrial, e contribui com a síntese de ATP (FONTANESI, et al.
379 2009) Neste estudo, supomos que a maior expressão de COX2 - complexo IV
380 nos espermatozoides portadores do cromossomo X funciona como um
381 mecanismo compensatório na tentativa de regular a maior entrada de elétrons
382 advindos do aumento da NDUFS7 – complexo I, uma vez que a COX2 -
383 complexo IV, esta envolvida no consumo de oxigênio e translocação de prótons
384 para o interior da mitocôndria (Kadenbach; Hüttemann, 2015).

385 Além da fosforilação oxidativa outra forma de produção energética

386 nos espermatozoides é pela glicólise (Du Plessis et al., 2015). Neste contexto o
387 complexo *pyruvate dehydrogenase* atua nos caminhos de geração de energia
388 pela conversão do piruvato em acetil-CoA. Todo o complexo possui 6
389 diferentes componentes, cada um com uma função. O componente X (*pyruvate*
390 *dehydrogenase protein X component* - PDHX) tem importante papel na
391 organização e função celular (Patel; Roche, 1990; Patel et al., 2014). Alguns
392 autores afirmaram que a remoção do componente X leva a perda de atividade
393 do complexo (Gopalakrishnan et al., 1989). Assim, hipotetizamos que
394 espermatozoides portadores do cromossomo X possuem menor velocidade
395 comparados aos espermatozoides de bovinos portadores do cromossomo Y
396 devido a menor abundância relativa de PDHX nestas células, o que acarreta
397 em menor produção energética devido à baixa quantidade de acetil-CoA
398 sintetizada.

399 Outra proteína envolvida na produção energética foi encontrada em
400 maior abundância nos espermatozoides com cromossomo X, a proteína *acetyl-*
401 *CoA carboxylase type beta* (ACACB). As *acetyl-CoA carboxylase* tem um papel
402 importante na conversão de acetil-CoA em malonil-CoA. Diferentemente da
403 *acetyl-CoA carboxylase type alpha* (ACACA), que modula a síntese de ácidos
404 graxos (Podkowiński; Tworak, 2011), a ACACB, atua na oxidação dos ácidos
405 graxos nas mitocôndrias como inibidor da atividade de carnitina-palmitoil-
406 transferase 1 no coração, músculo e fígado diminuindo a passagem de acetil-
407 CoA, essencial no ciclo de produção energética, pela membrana interna
408 mitocondrial (Kim, 1997; Wakil; Abu-Elheiga, 2009). Especula-se que há menor
409 produção energética nestas células. Até o momento não há relatos que
410 descreveram a ação da ACACB em células espermáticas. Todas as proteínas

411 relacionadas à produção de ATP no nosso estudo apresentaram interação com
412 proteínas relacionadas à síntese energética, independente do ciclo de síntese
413 que atuam, fosforilação oxidativa, glicólise ou β -oxidação.

414 Outro fator diferencial entre as células sexadas é o desenvolvimento
415 mais rápido de embriões macho (Avery et al., 1991; Carvalho et al., 1996), o
416 que é justificado pela composição do meio de cultivo, o qual favorece o
417 nascimento dos machos (Zhu et al., 2015). Entretanto, hipotetizamos que as
418 proteínas diferenciais dos espermatozoides sexados também podem influenciar
419 o desenvolvimento embrionário. Neste trabalho foram encontradas proteínas
420 relacionadas aos mecanismos de fertilização como as *heat shock protein 60*
421 *kDa* (HSP60) que são proteínas que atuam como um mecanismo de defesa na
422 preservação da célula em condições adversas (Neuer et al., 2000). Essa
423 proteína é mais expressa na superfície da cabeça espermática após a
424 capacitação espermática (Asquith et al. 2005). Asquith et al. (2004) afirmaram
425 que o mecanismo de fosforilação da tirosina, que ocorre na capacitação, pode
426 ativar as chaperonas (como HSP60), que desencadeia algumas mudanças
427 conformacionais na célula espermática e conseqüente formação de
428 receptores funcionais para zona pelúcida. Dadas essas informações
429 acreditamos que um dos fatores que leva ao desenvolvimento acelerado dos
430 embriões fertilizados *in vitro* por espermatozoides portadores do cromossomo
431 Y. é a maior abundância relativa desta proteína.

432 O conteúdo de phospholipase C- ζ (PLC ζ) de uma única célula
433 espermática é suficiente para produzir as oscilações de cálcio necessárias para
434 o desenvolvimento embrionário (Saunders et al., 2002). Estudos com
435 *Escherichia coli* mostraram que os dois domínios X e Y, constituintes da PLC ζ

436 quando em contato com a proteína *EF hand* induz a atividade do complexo
437 PLC. Em espermatozoides a deleção de todos os domínios da *EF hand* causa a
438 perda completa da atividade da PLC (Kouchi et al., 2005). A *EF hand domain-*
439 *containing protein 1 (EFHC1)* se encontrou mais abundante nas amostras dos
440 espermatozoides portadores dos cromossomos Y. Como descrito por Ray et al.
441 (1995) em humanos, há uma diferença de desenvolvimento entre machos e
442 fêmeas durante a fertilização ou durante a primeira ou segunda clivagem. A
443 despeito do interatoma não apresentar conexão entre as proteínas PLC ζ e
444 *EFHC1*, dados da literatura mostram que há relação entre elas (Kouchi et al.,
445 2005). A carência de informações advindas do interatoma pode estar
446 relacionada aos poucos estudos que envolvem essas proteínas. Acreditamos
447 que o desenvolvimento embrionário inicial acelerado dos machos, entre outros
448 fatores, é devido ao estímulo de atividade da PLC ζ induzido pela proteína
449 EFHC1.

450 O complexo SAM presente na membrana externa mitocondrial,
451 (Kozjak et al., 2003) é responsável pela inserção na membrana externa de
452 proteínas β -barrel sintetizadas no citosol dos ribossomos,. A *sorting and*
453 *assembly machinery component 50 homolog (SAMM50)* é uma subunidade do
454 complexo, formadora de canais proteicos (Pfanner et al., 2004). Nos
455 espermatozoides, as proteínas são sintetizadas nas *mitochondrial-type*
456 *ribosomes* localizadas fora das mitocôndrias (Gur; Breitbart, 2006) e parecem
457 passar pelos mesmos mecanismos de inserção na membrana externa
458 mitocondrial que as demais células eucariontes. Não há relatos da presença de
459 SAMM50 que justifiquem a maior abundância relativa desta proteína em células
460 espermáticas portadoras do cromossomo X, entretanto, no nosso

461 conhecimento, essa é a primeira descrição desta proteína em espermatozoides
462 de bovinos.

463 Este estudo relata as proteínas expressas diferentemente entre os
464 espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. A maioria das proteínas
465 encontradas está relacionada com a produção de energia, e processos
466 metabólicos, evidenciando diferenças fisiológicas e permitindo uma melhor
467 compreensão das diferenças entre as células portadores dos diferentes
468 cromossomos. Desta forma, esse estudo auxiliará na orientação de posteriores
469 pesquisas relacionados aos espermatozoides sexados e desenvolvimento de
470 técnicas de imunosexagem.

471 Futuras pesquisas devem ser conduzidas na tentativa de elucidar
472 outros mecanismos bioquímicos que envolvem as proteínas diferenciais nas
473 células espermáticas contendo o cromossomo X ou Y em bovinos. Atenção
474 especial deve ser dada a proteína HSP60 em vista da sua localização na
475 membrana externa, o que torna possível ser candidata ao desenvolvimento de
476 anticorpos sexo-específico.

477

478 Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
479 Paulo Processos nº 2013/23351-3, 2015/25698-7 e 2015/25638-3 pelo apoio
480 financeiro concedido.

481

482 REFERÊNCIAS

483

484 **Asquith KL, Baleato, RM, Mclaughlin EA, Nixon B and Aitken RJ** (2004)485 Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona
486 recognition. *Journal of Cell Science* **117**, 3645-3657.487 **Asquith KL, Harman AJ, Mclaughlin EA, Nixon B and Aitken RJ** (2005)488 Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1,
489 and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during
490 capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction* **72** 328-337.491 **Aumuller G, Vesper M, Seitz J, Kemme M and Scheit KH** (1988) Binding of a492 major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell*
493 *and Tissue Research* **252** 377-384.494 **Avery B, Madison V and Greve T** (1991) Sex and development in bovine in-495 vitro fertilized embryos. *Theriogenology* **35** 653-963.496 **Beyhan Z, Johnson LA and First NL** (1999) Sexual dimorphism in IVM-IVF497 bovine embryos produced from x and y chromosome-bearing spermatozoa
498 sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* **52** 35-48.499 **Biggers JD, Whitten WK and Whittingham DG** (1971). In: *Methods in*500 *Mammalian Embryology* pp 86-116 Ed JD Daniel. San Francisco: Freeman.501 **Boro P, Naha BC, Madkar A, and Prakash C** (2016) Sexing of semen in bulls:502 A mini review. *International Journal of Applied Research* **4** 460-462.503 **Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y and Mapletoft RJ** (1996)504 Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different
505 developmental stages on day 7. *Theriogenology* **45** 489-498.506 **Chen M, Chen Z, Wang Y, Tana Z, Zhua C, Lia Y, Hanc Z, Chenc L Gaoc R,**507 **Liua L and Chena Q** (2016) Mitophagy receptor FUNDC1 regulates

- 508 mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* **12** 689-702.
- 509 **Chen X, Zhua H, Wuc C, Hand W, Haoa H, Zhaoa X, Dua W, Qina T, Liua Y**
510 **and Wang D** (2012) Identification of differentially expressed proteins between
511 Bull X and Y spermatozoa. *Journal of proteomics* **77** 59-67.
- 512 **De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbanicd A and**
513 **Roncada P** (2014) Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun
514 proteomics investigation. *Molecular BioSystems* **10** 1264-1271.
- 515 **Du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G and Van Der Linde M** (2015)
516 Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?
517 *Asian Journal of Andrology* **17** 230-235.
- 518 **Dungdung SR, Bhoumik A, Saha S, Ghosh P, Das K, Mukherjee S, Nath D,**
519 **Chakrabarty J, Kundu C, Jaiswal BS, Mandal M, Maiti A, Banerjee S,**
520 **Roychowdhury M, Ray D, Bhattacharyya D and Majumder GC** (2016) Sperm
521 motility regulatory proteins. *In A tool to enhance sperm quality. Insights from*
522 *Animal Reproduction*, cap. 7 pp 161-177. Intech.
- 523 **Ericsson RJ, Langevin C and Nishino M** (1973) Isolation of fractions rich in
524 human Y sperm. *Nature* **14** 421-424.
- 525 **Esmailpour T, Elyasi L, Bahmanpour S, Ghannadi A, Monabbati A,**
526 **Dehghani F and Kazerooni M** (2012) Effect of combined density gradient
527 centrifugation on X- and Y- sperm separation and chromatin integrity. *Iranian*
528 *Journal of Reproductive Medicine* **10** 435-440.
- 529 **Fetrow J, Overton M and Eicker S** (2007) Sexed Semen: economics of a new
530 technology. In Western dairy management conference, 2007, Reno. **Anais...**
531 Nevada
- 532 **FontanesiF, Soto IC and Barrientos A** (2008) Cytochrome c oxidase

533 biogenesis: new levels of regulation. IUBMB Life **60** 557-568.

534

535 **Galeraud-Denis I, Lambard S and Carreau S** (2007) Relationship between
536 chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. Asian
537 Journal of Andrology **9** 587-592.

538 **Garner DL and Seidel Jr GE** (2008) History of commercializing sexed semen
539 for cattle. Theriogenology **69** 886-895.

540 **Gopalakrishnan S, Rahmatullah M, Radke GA, Powers-Greenwood S and**
541 **Roche TE** (1989) Role of protein X in the function of the mammalian pyruvate
542 dehydrogenase complex. Biochemical and Biophysical Research
543 Communications **160** 715-721.

544 **Graaf SP, Leahy T and Vishwanath R** (2006) *Biological and practical lessons*
545 *associated with the use of sexed sēmen*. In *9th International Symposium on*
546 *Reproduction in Domestic Ruminants* pp 125-140 Eds Juengel JL, Miyamoto A,
547 Price C, Reynolds LP, Smith MF and Webb R. Texas.

548 **Gur Y and Breitbart H** (2006) Mammalian sperm translate nuclear-encoded
549 proteins by mitochondrial-type ribosomes. Genes and Development **20** 411-
550 416.

551 **Gwathmey TM, Ignatz GG, MuellerJL, Manjunath P and Suarez SS** (2006)
552 Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share
553 functional roles in storing sperm in the oviduct. Biology of Reproduction **75** 501-
554 507.

555 **Hirst J** (2103) Mitochondrial Complex I. Annual Review of Biochemistry **82** 551-
556 75.

557 **Hirst J, King MS and Pryde KR** (2008) The production of reactive oxygen

- 558 species by complex I. *Biochemical Society Transactions* **36** 976-980.
- 559 **Hu Y and Namekawa SH** (2015) Functional significance of the sex
560 chromosomes during spermatogenesis. *Reproduction* **149** 265-277.
- 561 **Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D and Thomas PD**
562 (2016) Panther version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and
563 Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids*
564 *Research* **45** 143-149.
- 565 **Johnson LA and Welch GR** (1999) Sex preselection: High-speed flow
566 cytometric sorting of x and y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* **52**.
567 1323-1341.
- 568 **Kadenbach B and Hüttemann M** (2015) The subunit composition and function
569 of mammalian cytochrome C oxidase. *Mitochondrion* **24** 64-76.
- 570 **Kanesharatnam N, Eswaramohan T and Balasubramaniam KA.** Preliminary
571 Study for Sperm Sexing by Using Sucrose Density Gradients in Jersey Bull at
572 Artificial Insemination Centre at Thirunelvely (Northern Province of Sri Lanka).
573 International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics **31** 37-
574 40, 2012.
- 575 **Kim K** (1997) Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase.
576 *Annual Review of Nutrition* **17** 77-99.
- 577 **Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K and Miyazaki S**
578 (2005) The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic
579 activity of phospholipase C ζ . *The Journal of Biological Chemistry* **280** 21015-
580 21021.
- 581 **Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B,**
582 **Meisinger C and Pfanner N** (2003) An essential role of Sam50 in the protein

583 sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. The
584 Journal of Biological Chemistry **278** 48520-48523.

585 **Lima VFMH** (2007) Avanços metodológicos na seleção do sexo de
586 espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na
587 produção animal. Revista Brasileira de Zootecnia **36** 219-228.

588 **Lima VFMH, Moreira-Filho CA, Lucio AC and Resende MV** (2011) Sexagem
589 de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínua de
590 densidade de Percoll. Revista Brasileira de Zootecnia **40** 1680-1685.

591 **Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, Ma Q, Zhu C, Wang R,**
592 **Qi W, Huang L, Xue P, Li B, Wang X, Jin H, Wang J, Yang F, Liu P, Zhu Y,**
593 **Sui S and Chen Q** (2012) Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1
594 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. Nature Cell Biology
595 **14** 177-185.

596 **Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J and Wright MW** (2009) New
597 nomenclature for mammalian BSP genes. Biology of Reproduction **80** 394-397.

598 **Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z and Witkin**
599 **SS** (2000) The role of heat shock proteins in reproduction. Human
600 Reproduction Update **6** 149-159.

601 **Parati K, Bongioni G, Aleandri R and Galli A** (2006) Sex ratio determination
602 in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR.
603 Theriogenology **66** 2202-2209.

604 **Patel MS, Nemeria NS, Furey W and Jordan F** (2014) The Pyruvate
605 Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation. The
606 Journal of Biological Chemistry **289** 16615-16623.

607 **Patel MS and Roche TE** (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate

608 dehydrogenase complexes. The FASEB Journal **4** 3224-3233.

609 **Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C and Lithgow T** (2004) Assembling
610 the mitochondrial outer membrane. Nature Structural and Molecular Biology **11**
611 1044-1048.

612 **Podkowiński J and Tworak A** (2011) Acetyl-coenzyme A carboxylase - an
613 attractive enzyme for biotechnology. Journal of Biotechnology, Computational
614 Biology and Bionanotechnology **92** 321-335.

615 **Rath D, Barcikowski S, Graaf S, Garrels W, Grossfeld R, Klein S, Knabe W,**
616 **Knorr C, Kues W, Meyer H, Michl J, Moench-Tegeder G, Rehbock C, Taylor**
617 **U and Washausen S** (2013) Sex selection of sperm in farm animals: status
618 report and developmental prospects. Reproduction **145** 15-30.

619 **Ray PF, Conaghan J, Winston RM and Handyside AH** (1995) Increased
620 number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos
621 following in vitro fertilization. Journal of Reproduction and Fertility **104** 165-171.

622 **Sankhala RS and Swamy MJ** (2010) The major protein of bovine seminal
623 plasma, PDC-109, is a molecular chaperone. Biochemistry **49** 3908-3918.

624 **Saunders CM, Larman MG, Parrington J, CoxLJ, Royse J, Blayney LM,**
625 **Swann K and Lai FA** (2002) PLCz: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations
626 in eggs and embryo development. Development **129** 3533-3544.

627 **Seidel Jr GE** (2012) Sexing mammalian sperm – where do we go from here?
628 Journal of Reproduction and Development **58** 505-509.

629 **Sharma LK, Lu J and BAI Y** (2009) Mitochondrial respiratory complex I:
630 structure, function and implication in human diseases. Current Medicinal
631 Chemistry **16** 1266-1277.

632 **Soggiu A, Piras C, Hussein HA, De Canio M, Gaviraghi A, Galli A, Urbani**

- 633 **A, Bonizzia L and Roncada P** (2013) Unravelling the bull fertility proteome.
634 *Molecular BioSystems* **9** 1188-1195.
- 635 **Srivastavaa N., Jeromeb A, Srivastavaa SK, Ghosha SK and Kumarc A**
636 (2013) Bovine seminal PDC-109 protein: an overview of biochemical and
637 functional properties. *Animal Reproduction Science* **138** 1-13.
- 638 **Sumner AT and Robinson JA** (1976) A difference in dry mass between the
639 heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. *Journal of Reproduction and*
640 *Fertility* **48** 9-15.
- 641 **Thérien I, Moreau R and Manjunath P** (1999) Bovine seminal plasma
642 phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal
643 sperm. *Biology of Reproduction* **61** 590-598.
- 644 **Thomas CJ, Anbazhogan V, Ramakrishnan M, Sultan N, Surolia I and**
645 **Swamy MJ** (2003) Mechanism of membrane binding by the bovine seminal
646 plasma protein, PDC-109: a surface plasma resonance study. *Biophysical*
647 *Journal* **84** 3037-3044.
- 648 **Tucker K and Jansen CAM** (2002) Sperm separation techniques: comparison
649 and evaluation of gradient products. In *Proceedings 2nd International workshop*
650 *for Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART Lab* Eds. Basuray R,
651 and Mortimer D. In Press.
- 652 **Varner DD, Gibb Z and Aitken RJ** (2014) Stallion fertility: a focus on the
653 spermatozoon. *Equine Veterinary Journal* **47** 16-24.
- 654 **Wakil SJ and Abu-Elheiga LA** (2009) Fatty acid metabolism: target for
655 metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research* **50** S138-43.
- 656 **Wessel D and Flügge UI** (1984) A method for the quantitative recovery of
657 protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical*

658 Biochemistry**138** 141-143.

659 **Zhu J, Zhuang X, Chen L, Liu P and Qiao J** (2015) Effect of embryo culture
660 media on percentage of males at birth. Human Reproduction **30** 1039-1045.

661 **Zhuchenko O, Wehnert M, Bailey J, Sun ZS and Lee CC** (1996) Isolation,
662 mapping, and genomic structure of an X-linked gene for a subunit of
663 mitochondrial complex I. Genomics **37** 281-288.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no artigo 1 concluímos que é possível determinar um protocolo eficaz para extração de proteínas espermáticas associando técnicas físicas e químicas. Este trabalho, base de preparação de amostras, auxiliará futuras pesquisas com proteômica de células espermáticas.

Os resultados obtidos no artigo 2 mostram que existem proteínas diferentemente expressas entre os espermatozoides que carregam o cromossomo X ou Y, fundamentando na proteômica as diferenças já descritas na literatura entre essas células. Esta pesquisa oferece um embasamento para futuros trabalhos com espermatozoides sexados.