

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES PROTEÍCOS DO PLASMA SEMINAL E
DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES E SUA
CORRELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE GARANHÕES**

PRISCILLA NASCIMENTO GUASTI

BOTUCATU - SP

Agosto - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES PROTEÍCOS DO PLASMA SEMINAL E
DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES E SUA
CORRELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE GARANHÕES**

PRISCILLA NASCIMENTO GUASTI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal (Área de concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU - SP

Agosto - 2014

Nome da Autora: Priscilla Nascimento Guasti

Título: AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES PROTEÍCOS DO PLASMA SEMINAL E DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES E SUA CORRELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE GARANHÕES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Fabiana Ferreira Souza
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura
Membro
Departamento de Zootecnia
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Membro
Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)
UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 29 de agosto de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos pais Luiz Carlos Guasti e Vera Lucia Nascimento Guasti pelo amor, exemplo de vida e pela luta constante em prol da minha formação e educação. Que mesmo apesar da distância, se mantiveram sempre presentes com muito amor e carinho. Amo vocês!

Uma especial dedicatória à minha amada avó Davina (*in memoriam*), que sempre torceu e vibrou com minhas conquistas.

**“Quando você tem uma meta, o que era um obstáculo
passa a ser uma etapa de um dos planos.”**

Gerhard Erich Boehme

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, por me orientar nas escolhas certas, por me dar forças nos momentos mais difíceis e por fazer possível a realização de cada conquista.

Aos meus pais Vera e Guasti, pelo amor incondicional, contínuo apoio e pela grande confiança e fé que sempre depositaram nas minhas decisões. Registro minha eterna gratidão e admiração por vocês.

A todos os meus familiares, em especial, minha avó Davina, avó Conceição, avô Lourival, Jorge, Maria Helena, Luiza, Jânio, tia Rosângela, tio Jorginho e tia Rosana. Obrigada por estarem ao meu lado e por acreditarem em meu potencial.

As minhas queridas e amadas amigas: Juliana, Lígia, Roberta, Aline, que apesar da distância, a força de nossa amizade vence toda e qualquer barreira.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais e ao Professor Julio César Ferraz Jacob pela amizade desde os tempos da graduação e incentivo às atividades acadêmicas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudo e auxílio financeiro concedido para realização do projeto de pesquisa.

Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa pela orientação, por seus conhecimentos e experiência oferecidos. Ainda, pela amizade e confiança dispensadas e, sobretudo, pela seriedade e profissionalismo que tanto contribuíram para minha formação.

A Professora Fabiana Ferreira de Souza pelo importante apoio que me prestou nestes últimos anos, sempre solícita e disposta a ajudar e esclarecer diversas dúvidas em todos os momentos. Sua colaboração foi fundamental para a realização deste projeto.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo grande apoio, amizade, ensinamentos e conselhos ao longo dos últimos anos.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelos bons momentos de convívio e pela amizade.

A Carol, pela amizade, companheirismo e persistência na realização da técnica de eletroforese.

Aos amigos e estudantes de iniciação científica, Leandro e Gabriel, pela ajuda constante.

Aos grandes amigos que conquistei em Botucatu: Gabriel, Rosiara, Márcio, Patrícia, Queijo, Bianca, Yamê, Rombudo, Felipe, Fernando, Mariana, Fernanda, Bió, Ian, Alexandre, Thati, Carlos Renato, Guta, Julia, Carol, Pedro, Braxola, Camila, Zé, Gabriele, Isabelle, ...

Aos pós-graduandos do Ceran: Helene, Patrícia, Yamê, Gabriel, Rombudo, Mariana, Ian, Camila, Felipe, Fernando, Alexandre, Pedro, pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos e amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esses anos.

Aos colegas pós-graduandos e residentes pelo convívio e amizade por todos esses anos.

Aos equinos utilizados no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na elaboração e desenvolvimento deste trabalho...

Minha eterna gratidão!

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

2D SDS-PAGE: eletroforese bidimensional

ACE: enzima conversora da angiotensina

ACN: acetonitrila

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

BCA: ácido bicinconínico

CASA: análise computadorizada do movimento espermático

CBB: comassie blue G-250

cm: centímetro

CRISP: proteínas ricas em resíduos de cisteína

DFI: índice de fragmentação de DNA

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNase: desoxirribonuclease

DTT: ditioneitol

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ESI: ionização por eletrospray

FAA: antígeno associado a fertilidade

Fn-2: fibronectina tipo II

g: gravidade

GAGs: glicosaminoglicanos

GO: ontologia gênica

HBP: proteína de ligação à heparina

HSP: proteínas do plasma seminal equino

HTMO: Hamilton Thorne Research

IAA: iodoacetamida

IEF: focalização isoeletrica

Ig: imunoglobulina

IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina 1

kDa: kilo-dalton

LC: cromatografia líquida

LIN: linearidade
MALDI: ionização e dessorção a laser assistida por matriz
mg: miligrama
mL: mililitro
mM: milimolar
MP: motilidade progressiva
MPA: membrana plasmática e acrossomal
MPAI: membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida
MPAL: membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida
MPIAL: membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida
MPLAI: membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida
MS/MS: espectrometria de massas tandem
MT: motilidade total
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NET: *Neutrophil extracellular traps*
OPN: osteopontina
PBS: tampão fosfato-salino
pH: potencial Hidrogeniônico
pI: ponto isoelétrico
PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PS: plasma seminal
Q-TOF: plataforma quadrupolo-tempo de voo
Rap: espermatozoides rápidos
RNAm: RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
ROS: espécies reativas ao oxigênio
SDS PAGE: eletroforese unidimensional
TALP: *Tyrode* albumina lactato piruvato
TFA: ácido trifluoroacético
v/v: volume/volume
V: volts
VAP: velocidade média de trajeto
VCL: velocidade curvilínea
Zn: zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
Capítulo 1.....	
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Maturação Espermática Pós-testicular.....	4
2.2. Plasma Seminal.....	6
2.3. Proteômica Seminal.....	8
2.3.1. Proteínas da Membrana Espermática.....	8
2.3.2. Proteínas do Plasma Seminal.....	10
2.3.2.1. Proteínas Secretórias Ricas em Cisteína (CRISPs).....	11
2.3.2.2. Proteínas com Módulos de Fibronectinas tipo II (Fn-2).....	13
2.3.2.3. Espermadesinas.....	13
2.4. Biomarcadores Moleculares de Fertilidade no Macho.....	14
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	17
4. OBJETIVO.....	18
5. REFERÊNCIAS.....	19
Capítulo 2.....	
ARTIGO 1 - Proteínas do plasma seminal e membrana plasmática associadas à fertilidade de garanhões Quarto de Milha.....	27
RESUMO.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
Capítulo 3.....	
ARTIGO 2 - Caracterização do proteoma do plasma seminal e membrana espermática de equinos.....	87
RESUMO.....	87
INTRODUÇÃO.....	88

MATERIAL E MÉTODOS	91
RESULTADOS	96
DISCUSSÃO	103
CONCLUSÃO	110
AGRADECIMENTO.....	110
REFERÊNCIAS.....	110
Capítulo 4	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
Anexos	
ANEXO I – Normas de Publicação do Periódico Biology of Reproduction.....	129
ANEXO II – Normas de Publicação do Periódico Andrology	136

GUASTI, P.N. **Avaliação dos constituintes proteicos do plasma seminal e da membrana plasmática de espermatozoides e sua correlação com a fertilidade de garanhões.** Botucatu. 2014 Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os parâmetros seminais, a expressão de proteínas do plasma seminal (PS) e da membrana plasmática (MP) correlacionando-os com a fertilidade de garanhões Quarto de Milha (Experimento I); e caracterizar o proteoma do PS e da MP de espermatozoides por eletroforese 2D e espectrometria de massas (Experimento II). No Experimento I, três ejaculados de 10 garanhões férteis e 9 garanhões subférteis foram avaliados quanto aos parâmetros de cinética, integridade de membrana plasmática e acrossomal e cromatina espermática. Proteínas do PS e extraídas da MP foram submetidas a eletroforese 2D e espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) e análise *shotgun* (LC-ESI/TOF). Foi observada associação positiva da fertilidade com a MT, MP, LIN e RAP. Um *spot* diferencial (28 kDa; pI 5,6) do PS apresentou maior expressão em garanhões subférteis. Não foi observada diferença na expressão proteica na MP entre os garanhões. Na análise *shotgun*, foram identificadas 53 proteínas únicas no PS de garanhões férteis, como a SPATA21 e 103 nos garanhões subférteis, como a clusterina. Na MP, foram identificadas 269 proteínas em animais com alta fertilidade como a SP-1, SMOK e PLC, e 167 proteínas únicas em garanhões subférteis. No Experimento II, o PS e o extrato de MP apresentaram predominância de polipeptídeos com massa molecular < 35 kDa. Proteínas ribossômicas foram detectadas nas duas amostras. A análise *shotgun* identificou 66 proteínas no PS e 291 no extrato de MP; envolvidas no processo reprodutivo como as *kallikrein*, SP-1, SP-2, Fn-2 e Fn-3, SPATA. Em conclusão, o estudo de garanhões com distintos índices de concepção permitiu a identificação de proteínas únicas do PS e da MP e de parâmetros de cinética espermática relacionados a fertilidade que podem servir como base para determinação de marcadores de fertilidade em garanhões. Uma série de proteínas da MP podem ser originárias do PS e estar relacionadas à funcionalidade espermática e na interação entre os gametas. Ainda, a utilização de uma abordagem proteômica moderna possibilitou a identificação de grande parte das proteínas do plasma seminal e da membrana plasmática de espermatozoides, o que facilita futuras investigações de suas funções na reprodução equina.

Palavras-chave: biomarcador de fertilidade, garanhão, proteínas do plasma seminal

GUASTI, P.N. Evaluation of protein constituents of seminal plasma and sperm membrane and their correlation with fertility of stallions. Botucatu. 2014 Thesis (PhD) - School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the seminal parameters, the expression of proteins in seminal plasma (SP) and plasma membrane (PM) correlating them with the fertility of Quarter Horses stallions (Experiment I); and characterize the proteome of SP and PM sperm by 2D electrophoresis and mass spectrometry (Experiment II). In Experiment I, three ejaculates from 10 fertile stallions and nine subfertile stallions were evaluated for kinetic parameters, plasma membrane integrity and acrosome and sperm chromatin. Proteins extracted from the SP and MP were submitted to 2D electrophoresis coupled to mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) and shotgun analysis (LC-ESI/TOF). Positive association of fertility with MT, MP, LIN and RAP was observed. A differential spot (28 kDa, pI 5.6) of SP showed higher expression in subfertile stallions. No difference in protein expression in PM among stallions was observed. In the shotgun analysis, 53 unique proteins in the SP of fertile stallions, as SPATA21, and 103 in subfertile stallions, as clusterin, were identified. In PM, 269 proteins were identified in animals with high fertility as SP-1, SMOK and PLC, and 167 unique proteins in subfertile stallions. In Experiment II, the SP and the extract of PM showed a predominance of polypeptides with molecular mass < 35 kDa. Ribosomal proteins were detected in both samples. Shotgun analysis identified 66 proteins in SP and 291 in the extract of PM; involved in the reproductive process such as kallikrein, SP-1, SP-2, Fn-2 and Fn-3, SPATA. In conclusion, the study of stallions with distinct conception rates allowed the identification of unique proteins of SP and PM and kinetic parameters related to fertility which may serve as basis for determination of fertility biomarkers in stallions. A number of PM proteins may originate from the SP and be related to sperm functionality and interaction between gametes. Although, the use of modern proteomic approach allowed the identification of most of the seminal plasma proteins and sperm plasma membrane, which facilitates further investigation of their role in equine reproduction.

Keywords: biomarker of fertility, stallion, seminal plasma proteins, plasma membrane proteins

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional pelo expressivo número de animais e pela excelência de seu plantel. Adicionalmente, a indústria do cavalo é uma importante área geradora de divisas e empregos no Brasil. O país, por possuir uma gama de reprodutores de destaque passou a ser visto como ponto de referência para investimentos de muitos criadores estrangeiros. Desta forma, para manter o país competitivo, é necessária a incorporação de novas biotecnologias para acelerar e facilitar o melhoramento genético.

A seleção de garanhões é baseada na genética, performance e conformação. Claramente, a saúde reprodutiva do animal não é inserida nesta seleção. Os garanhões representam 50% da equação da reprodução e a indústria do cavalo é repleta de garanhões com nível de fertilidade indesejável (VARNER et al., 2008)

Dentre os fatores que podem alterar os índices reprodutivos, a qualidade seminal assume um efeito considerável. No entanto, os testes laboratoriais de rotina, aplicados na avaliação da qualidade do sêmen, por muitas vezes não são capazes de determinar o potencial de fertilidade dos reprodutores (AMANN, 1995; JOBIM et al., 2009; MOURA et al., 2011). Desta forma, conforme revisado por Moura et al. (2011) diversos estudos sugerem que componentes moleculares dos espermatozoides, ou do meio que os cercam, podem influenciar sua capacidade fecundante

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e apesar de apresentarem detectáveis níveis de transcrição e tradução (produção ativa de transcritos após a meiose) (GUR; BREITBART, 2008) possuem limitada habilidade de biossíntese de novos componentes (AMMAN et al., 1993). Além disso, importantes modificações ocorrem nos domínios de membrana da célula espermática durante a maturação pós-testicular no epidídimo, na ejaculação e na capacitação (AITKEN et al., 2007; BOERKE et al., 2007), e estas etapas ocorrem em completa ausência de expressão gênica (BREWIS; GADELLA, 2010).

O plasma seminal contém diferentes tipos de proteínas que são expressas e sintetizadas nas glândulas acessórias, tais como próstata, glândulas bulbouretrais e vesículas seminais (MANÁSKOVÁ et al., 2003), que exercem diversas funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação, como ativação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, entre outros. Adicionalmente, é mediador da capacitação espermática e da resposta inflamatória pós-coital no útero de

éguas (POLAKOSKI et al., 1982; ELZANATY et al., 2002; TROEDSSON et al., 2005).

Em humanos, o proteoma do plasma seminal tem sido amplamente descrito com uma lista atual de mais de 2000 proteínas identificadas (PILCH et al., 2006; BATRUCH et al., 2011; MILARDI et al., 2012), enquanto que nas principais espécies de mamíferos domésticos poucas proteínas foram identificadas (DRUART et al., 2013). Portanto, a membrana plasmática, assim como o plasma seminal, são candidatos para a avaliação da fertilidade masculina (MILARDI et al., 2013). Os biomarcadores relacionados à reprodução possibilitam o desenvolvimento de novos critérios para a predição e aumento da fertilidade masculina. Com isso, a análise proteômica seminal tornou-se essencial para identificação de propriedades e funções de proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação das funções no trato reprodutor masculino e consequentemente, no processo de fertilização (MILARDI et al., 2013).

Deste modo, o isolamento e caracterização das proteínas presentes no plasma seminal podem possibilitar a avaliação de sua influência sobre as células espermáticas e a identificação segura e precoce de ganhões férteis em relação àqueles subférteis. O presente estudo baseia-se na correlação dos parâmetros espermáticos, constituintes do plasma seminal e da membrana plasmática com a fertilidade de espermatozoides equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Maturação Espermática Pós-testicular

Após a espermatogênese, os espermatozoides ainda não são capazes de fertilizar o oócito. Os últimos estágios de diferenciação de espermátides são marcados pela condensação do DNA, que diminui progressivamente o processo de transcrição e tradução no gameta até sua estagnação. Nos mamíferos a capacidade de fertilização é adquirida durante o trânsito epididimário, onde sucessivas modificações morfofuncionais contribuem para a maturação do espermatozoide (DACHEUX et al., 2003).

O epidídimo é anatomicamente conectado ao testículo e pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. Cada região secreta substâncias específicas que promovem mudanças na composição química e proteica do fluido epididimário, essenciais para a

diferenciação e manutenção da célula espermática (DACHEUX et al., 2003; GATTI et al., 2004). Este controle extragonadal da diferenciação espermática é chamado de maturação espermática epididimária, na qual o gameta masculino adquire motilidade, habilidade de reconhecer e ligar-se a zona pelúcida (ZP) e capacidade de fusão com oócito (DACHEUX; DACHEUX, 2014).

A maioria das proteínas luminais é secretada ativamente pelo epitélio epididimário e está relacionada com a proteção do espermatozoide durante sua passagem pelo epidídimo, como a redução de espécies reativas ao oxigênio (ROS), ação antibacteriana e proteção dos sítios ativos na superfície de membrana (FABREGA et al., 2012; WANG et al., 2012; TAYLOR et al., 2013)

A secreção de proteínas no epidídimo é altamente regionalizada, sendo a cabeça e a corpo as regiões mais ativas, sintetizando cerca de 80% dos componentes do fluido. Na espécie bovina, a atividade secretória na região da cabeça é 6 a 8 vezes maior que na região da cauda. Já na espécie equina, 73% dos compostos proteicos são secretados na cabeça do epidídimo (DACHEUX et al., 2003; GATTI et al., 2004).

As proteínas epididimárias são caracterizadas de acordo com o tipo de interação com a célula espermática. Podem ocorrer ligações fracas por meio de interações iônicas com proteínas responsáveis pela quiescência dos espermatozoides e ligações fortes com proteínas hidrofóbicas, importantes no trato reprodutivo da fêmea e na fertilização (MARENGO et al., 2008). Adicionalmente, algumas proteínas do fluido epididimário são processadas por uma cascata de clivagens proteolíticas antes ou durante sua inserção na membrana plasmática. Os peptídeos clivados são remanejados em diferentes domínios da membrana encobrendo/expondo sítios de ligação ou são liberados para o fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (DACHEUX; DACHEUX et al., 2014). Desta forma, a principal característica das proteínas secretadas no lúmen epididimário é o alto grau de polimorfismo na massa molecular e no ponto isoelétrico devido a modificações pós-traducionais e glicosilação (DACHEUX et al., 2003).

As primeiras modificações espermáticas ocorrem na cabeça do epidídimo, onde cerca de 80-90% de água do fluido testicular é reabsorvido e a atividade secretória de proteínas é aumentada (FOUCHECOURT et al., 2000; BELLEANNE et al., 2011; DACHEUX et al., 2012). Grande parte das proteínas do lúmen, originárias da *rete testis*, desaparece na região proximal da cabeça epididimária sendo substituídas por outros componentes. As modificações na região anterior do epidídimo estão associadas à migração da gota citoplasmática, início do batimento flagelar e habilidade de ligação a

ZP (DACHEUX; DACHEUX, 2014).

O número de espermatozoides móveis aumenta regularmente entre a cabeça e a cauda do epidídimo. O processo iniciador da motilidade não é bem estabelecido, no entanto, a motilidade potencial existe no espermatozoide imaturo da cabeça do epidídimo (VIJAYARAGHAVAN et al., 1996), e é expressa ao longo do ducto epididimário, onde são observadas mudanças nos níveis intra-espermáticos de AMPc, pH e cálcio (WADE et al., 2003).

O desenvolvimento da interação entre os gametas no epidídimo está relacionado a redistribuição dos domínios de diversas proteínas testiculares de superfície, como as proteínas da família ADAM, tACE, basigina e TEX101, e na adsorção ou fusão de proteínas a membrana plasmática, como a CD52, CRISP1, CRISP4, CRISP7, MFGE8, SPAM1, proteínas envolvidas no processo de fertilização (DACHEUX; DACHEUX, 2014). Esta interação entre as membranas espermática e oocitária não é sustentada por uma proteína específica e sim por um complexo proteico, o qual as proteínas atuam conjuntamente no processo de fusão entre os gametas (REID et al., 2011). Portanto, tanto os eventos da espermatogênese quanto à maturação pós-testicular são necessários para a competência das células espermáticas frente à fertilização (GATTI et al., 2004).

2.2. Plasma Seminal

O sêmen é composto por duas frações distintas, os espermatozoides, que compõem menos que 1% do volume total e o plasma seminal. A principal função do plasma seminal é servir como meio de transporte e manutenção para os espermatozoides (WITE, 1988).

O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela *rete testis*, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Em equinos, este fluido é expelido em frações durante a ejaculação e sua composição apresenta diferentes aspectos bioquímicos de acordo com a fração expelida. A primeira porção ejaculada é a fração pré-espermática, aquosa, e provém das glândulas bulbouretrais e da próstata. Esta fração possui a função de limpeza da uretra. A segunda fração é rica em espermatozoides, leitosa e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira porção contém poucos espermatozoides, porém grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das vesículas seminais, com a função de carrear os poucos espermatozoides que restaram na uretra (AMANN; GRAHAM, 1993; KAREKOSKI; KATILA, 2008).

O volume do ejaculado do garanhão pode chegar a 200 mL, sendo 10 a 20 vezes

maior do que o ejaculado de touros e 50 a 100 vezes maior do que o ejaculado de carneiros. Entretanto, o número total de espermatozoides por ejaculado é similar nas três espécies, demonstrando a grande contribuição do plasma seminal no sêmen de equinos (VARNER, 1987).

O plasma seminal possui em sua composição substâncias moduladoras da inflamação uterina que auxiliam na eliminação dos espermatozoides e na limpeza uterina de éguas susceptíveis a endometrite (TROEDSSON et al., 2005; DOTY et al., 2011). Adicionalmente, o plasma seminal contém uma série de agentes antioxidantes enzimáticos, como a catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase; e não enzimáticos como a albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina. A atividade destas enzimas no plasma seminal inibe a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) protegendo os espermatozoides do dano celular causado pelo estresse oxidativo (KANKOFER et al., 2005).

O plasma seminal possui efeito mediador na capacitação, como as BSP (*binding seminal plasma proteins*) (FLORMAN; FIRST, 1988; MANJUNATH; THERIEN, 2002) e auxilia na formação de reservatórios espermáticos na tuba uterina (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005).

A composição bioquímica do plasma seminal equino apresenta extensa variabilidade entre garanhões (ZAHN, 2006), entre os ejaculados (FRAZER et al., 1996) e entre as frações dos ejaculados (KAREKOSKI et al. 2011). Aurich et al., (1996) relataram que a adição de plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade elevou a qualidade do sêmen descongelado de machos de baixa congelabilidade, ocorrendo o oposto quando se adicionou o plasma proveniente de garanhões de baixa congelabilidade. Contrariamente, Morrell et al. (2014) avaliaram o efeito da adição de plasma seminal homólogo e heterólogo na qualidade do sêmen de garanhões e constataram uma considerável variação entre os garanhões, portanto, não foi possível prever se o plasma seminal autólogo ou heterólogo foi capaz de aumentar a motilidade espermática. Os autores afirmaram que a interação entre o PS e o espermatozoide depende da origem de ambas as partes.

Apesar do plasma seminal demonstrar funções específicas nos eventos da fertilização, as técnicas de criopreservação de sêmen de equinos preconizam a refitada deste fluido (BARRIER-BATUT et al., 2013; RAMIRES NETO et al., 2013), substituindo-o por diluentes, uma vez que estudos demonstram que o acréscimo de

plasma seminal promove um efeito deletério sobre a preservação das células espermáticas (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Ainda, a comprovação da fertilidade de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo tem questionado a necessidade dos componentes do plasma seminal no processo de fertilização, já que estes são capazes de fertilizar o oócito, sem nenhum contato prévio com as secreções das glândulas anexas (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010; GUASTI, 2010) e possuem índices de concepção maiores ou similares aos espermatozoides do ejaculado (MONTEIRO et al. 2011).

2.3. Proteômica Seminal

A proteômica consiste na caracterização em larga escala de componentes proteicos de uma determinada célula, tecido ou fluido biológico. No entanto, a análise proteômica ultrapassa a simples listagem de proteínas e fornece indícios substanciais quanto à organização e dinâmica dos processos metabólicos, regulatórios e de sinalização pelos quais a célula se desenvolve (PANDEY; MANN, 2000).

Na década passada, a proteômica possibilitou o desenvolvimento de novas tecnologias na identificação de marcadores moleculares de patologias. O plasma seminal, assim como a membrana plasmática, são candidatos para a análise proteômica na avaliação da fertilidade masculina (MILARDI et al., 2013). O fluido das glândulas anexas contém diversas proteínas que são importantes no processo de fertilização e cerca de 35% destas macromoléculas da membrana plasmática são provenientes deste fluido (KOEHLER et al., 1980; RUSSEL et al., 1984). A caracterização e identificação destas proteínas no plasma seminal e membrana plasmática permite elucidar os processos biológicos relacionados à fertilidade masculina e ao processo de fertilização, e após sua validação podem ser utilizadas na distinção clínica entre fertilidade e infertilidade.

2.3.1. Proteínas da Membrana Espermática

O estudo do proteoma da célula espermática é relativamente mais simples quando comparado com o proteoma de células somáticas. O espermatozoide é uma célula altamente especializada com o conteúdo mínimo de citosol e organelas (EDDY; O'BRIEN 1994; YANAGIMACHI et al., 1994), no entanto, possui maior quantidade de proteínas de membrana plasmática do que qualquer outro tipo celular (BREWIS; GADELLA, 2010).

A superfície da cabeça espermática, peça intermediária e flagelo são altamente heterogêneas e a presença de estruturas de junção (anéis) previne a difusão lateral das proteínas e lipídios de um domínio para o outro (VOS et al., 1994). Ainda, a região da cabeça é dividida em subdomínios, sendo região apical (reconhecimento e ligação a zona pelúcida), região pré-equatorial (reação acrossomal), região equatorial (reconhecimento e fusão com oolema) e região pós-acrossomal (BREWIS; GADELLA, 2010), cada qual com uma função na fertilização (GADELLA et al., 2008).

Importantes modificações ocorrem nos domínios de membrana da célula espermática durante a maturação pós-testicular no epidídimo e durante a capacitação (AITKEN et al., 2007; BOERKE et al., 2007) e estas etapas ocorrem em completa ausência de expressão gênica (BREWIS; GADELLA, 2010). As modificações são realizadas, na sua maioria, por proteínas contidas no meio que cercam a célula espermática, seja no fluido epididimário, plasma seminal ou secreções do trato reprodutor feminino, promovendo a reorganização de sua estrutura (BREWIS; GADELLA, 2010).

A reorganização da membrana plasmática resulta de diferentes mecanismos incluindo redistribuição ou desaparecimento por processamento proteolítico, ação de enzimas glicolíticas e integração de novos componentes (DACHEUX et al., 2003). Exemplos de proteínas proteoliticamente processadas durante o trânsito pelas vias seminais são as proteínas da família ADAM, incluindo a fertilina (pH30), ciritestina e testase, que possuem papel na interação entre os gametas (EVANS, 1999).

A enzima conversora de angiotensina-I (ACE) presente na superfície da peça intermediária e da peça principal do flagelo é completamente removida do espermatozoide durante o trânsito epididimário (GATTI et al., 1999; MÉTAYER et al., 2002). A proteína é liberada no fluido em uma forma ativa e pode ser encontrada posteriormente no plasma seminal (MÉTAYER et al., 2001).

A clusterina é secretada pelo epidídimo e algumas isoformas (80 kDa) se associam a membrana do espermatozoide (HOWES et al., 1998). Esta proteína está envolvida na adesão e agregação celular (BLASCHUK et al., 1983) e maturação espermática (SYLVESTER et al., 1991). Em bovinos, a clusterina está associada com espermatozoides morfologicamente anormais e foi sugerida como um marcador de baixa qualidade seminal (IBRAHIM et al., 2001). O tipo de interação não é bem elucidado, provavelmente a molécula é adsorvida devido a sua alta concentração extracelular (TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

A proteína transmembrana Izumo, integrante da superfamília das imunoglobulinas, esta presente na membrana interna acrossomal dos espermatozoides de humanos e camundongos e parece exercer papel fundamental na fusão entre os gametas (INOUE et al., 2005; GUPTA; BANSAL, 2010). Recentemente, seu receptor (Folr4, Juno) foi localizado na membrana do oócito. Após a fertilização, o receptor Juno rapidamente desaparece da membrana do oocitária, sugerindo que a interação Izumo-Juno levam ao bloqueio da poliespermia (BIANCHI et al., 2014).

Meyers (2001) demonstrou que uma proteína específica da membrana plasmática, PH-20, localizada na cabeça do espermatozoide, possui atividade de hialuronidase e se distribui na região acrossomal durante o processo de capacitação. Do mesmo modo, a enzima galactosiltransferase está presente na membrana plasmática de equinos, e pode servir com receptor durante a interação inicial entre os gametas (FAYRER-HOSKEN et al., 2005). As proteínas do grupo Fn-2 interagem com os fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide durante a maturação pós-testicular e momento da ejaculação (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005).

2.3.2. Proteínas do Plasma Seminal

As proteínas do plasma seminal possuem duas diferentes origens, parte é sintetizada nas glândulas anexas, sendo específicas para este fluido e parte possui origem sanguínea. As proteínas de origem sanguínea possuem como função a regulação da pressão osmótica e pH do plasma seminal, transporte de íons, lipídeos e hormônios, e compreendem principalmente a pré-albumina, albumina, globulina, transferrina, α -antitripsina, B-lipoproteína, β -glicoproteína e imunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) (PERUMAL, 2012).

De modo geral, as funções de proteínas específicas do plasma seminal incluem o seu envolvimento nos passos iniciais e centrais do processo de fertilização, como a regulação da capacitação, o estabelecimento do reservatório espermático na tuba uterina, a modulação da resposta imune no útero, o transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea e a interação e fusão entre os gametas (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

A multifuncionalidade das proteínas do plasma seminal é desempenhada por sua estrutura e pela ação de mecanismos moleculares (STRZEZEK et al., 2005). Proteínas da mesma família ou grupo parecem ter funções distintas de acordo com a espécie. Assim, diferenças na sua estrutura, quantidade e padrão de expressão ao longo do trato

reprodutor masculino podem determinar os efeitos espécie-específicos de proteínas homólogas na fisiologia espermática (CALVETE; SANZ, 2007).

A quantidade de proteínas existentes no plasma seminal equino é relativamente baixa (10 mg/mL) quando comparada com outros mamíferos (20-60 mg/mL) (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Tais proteínas possuem como característica a formação de agregados multiprotéicos, compostos por proteínas de 11 a 30 kDa, correspondendo a 70% das proteínas totais do plasma seminal equino (VON FELLEBERG et al., 1985). Calvete et al. (1994) isolaram e caracterizaram oito proteínas de baixo massa molecular (14 a 30 kDa) denominadas proteínas do plasma seminal eqüino (HSP-1 a HSP-8). Estas contribuem para o teor de proteína total do plasma seminal e se agregam a superfície espermática durante a ejaculação, exceto a HSP-4.

Até o momento, sabe-se que a maioria das proteínas seminais na espécie equina pertence a três grupos, sendo estas proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2) e as espermadesinas (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

2.3.2.1. Proteínas Secretórias Ricas em Cisteína (CRISPs)

A família das proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP) consiste em um amplo grupo de proteínas com massa molecular de 20 a 30 kDa, caracterizadas por apresentarem 16 resíduos de cisteína em sua estrutura (EBERSPAECHER et al., 1995). As CRISPs são classificadas como CRISP1, CRISP2, CRISP3 e mais recentemente, CRISP4, encontrada em camundongos (KOPPERS et al., 2011). Estão presentes em diversos tecidos e espécies, incluindo os répteis, apresentando 45% de homologia com a CRISP humana (MORISSETTE et al., 1995; TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

A função dos diversos membros da família CRISP parece estar relacionada com processos da espermatogênese, maturação do espermatozoide, capacitação espermática e interação espermatozoide-oócito (TOPFER-PETERSEN et al., 2005).

A CRISP 1 é expressa nas regiões proximais do epidídimo sob controle androgênico e se associa a membrana espermática durante a maturação epididimária (KOHANE et al., 1980). Esta envolvida na capacitação espermática, interação zona pelúcida-espermatozoide e fusão da célula espermática com o oócito. No entanto, apesar de todas estas funções, a CRISP1 parece não ser essencial para processo de fertilização (COHEN et al., 2011).

A CRISP2 é predominantemente expressa no testículo, independente do controle androgênico (HARDY et al., 1988). Está presente em diversos estágios de diferenciação celular na espermatogênese e foi localizada especificamente na região acrossomal (FOSTER; GERTON, 1996). A CRISP2 é secreta pelas células espermatogênicas e permanece em sua superfície, mediando sua interação com as células de Sertoli (MAEDA et al., 1999). Em estudo realizado por Busso et al. (2007), a incubação de espermatozoides humanos e de camundongos com anti-CRISP2 resultou na inibição da penetração do oócito, sugerindo que há sítios específicos de ligação para CRISP2 no oolema, fundamentais para a interação espermatozoide-oócito.

Na espécie equina, a CRISP3 é secretada em grandes quantidades (1 mg/mL), sendo um dos principais componentes do plasma seminal. Possui alta expressão na ampola e nas vesículas seminais e está localizada na região pós-acrossomal e equatorial dos espermatozoides (SCHAMBONY et al., 1998).

As CRISPs, principalmente a CRISP3, são removidas da membrana plasmática do espermatozoide após sucessivas lavagens com PBS e com altas concentrações de sal, correspondendo a redução de 80 a 90% de CRISP da superfície espermática. Entretanto, algumas moléculas da CRISP permanecem fortemente ligadas à superfície espermática e demonstraram correlação positiva com a fertilidade de garanhões (REINEKE et al., 1999).

Em estudo realizado por Hamman et al., (2007) foi constatado que variações no gene equino da CRISP3 foram identificadas como uma causa de redução da fertilidade. Foi identificado um polimorfismo do gene CRISP3 de cavalos da raça Hannoveriano, nos quais o polimorfismo do gene E2O8K, quando em estado heterozigoto, compromete, em média 7% a fertilidade quando comparado com animais que possuem o alelo mais comum no seu estado homozigoto. Além disso, em estudo mais recente foi constatado que a quantidade de CRISP3 encontrada no plasma seminal equino foi positivamente relacionada a taxa de concepção no primeiro ciclo e pode ser utilizada como um marcador de fertilidade (Novak et al., 2010).

A CRISP3 equina parece possuir um efeito indireto sobre a fertilidade, uma vez que já foi demonstrado que esta proteína regula a eliminação de espermatozoides no trato reprodutor da fêmea, pela supressão da ligação entre espermatozoides e polimorfonucleares (Doty et al., 2011), o que pode amenizar os efeitos da endometrite pós-cobertura e possibilitar a chegada de mais espermatozoides ao local da fertilização.

2.3.2.2. Proteínas com Módulos de Fibronectinas tipo II (Fn-2)

As proteínas do grupo Fn-2 no trato reprodutor masculino são caracterizadas pela presença de dois ou quatro módulos fibronectina do tipo II (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2007). São expressas em diferentes regiões do trato reprodutor masculino, especificamente pelo corpo e cauda do epidídimo e pela ampola do ducto deferente, dependendo da espécie (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005).

As proteínas HSP-1 e HSP-2, expressas na ampola do ducto deferente, pertencem ao grupo das proteínas com módulos Fn-2 e representam cerca de 70 a 80% das proteínas totais do plasma seminal equino. Estas proteínas são homólogas as proteínas de ligação a heparina do plasma seminal bovino (BSP), que estão envolvidas na capacitação espermática (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005).

Durante a ejaculação, essas proteínas interagem com os resíduos de colina dos fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide (DESNOYERS; MANJUNATH, 1993), estimulando o efluxo de fosfolipídios e colesterol (MOREAU; MANJUNATH, 1999). Este processo é potencializado pela habilidade de ligação a heparina. A heparina é estruturalmente semelhante aos glicosaminoglicanos (GAGs), estes são secretados em grandes quantidades na tuba uterina e nos fluidos uterinos durante a fase folicular da fêmea bovina, e parece mediar o processo de capacitação espermática pela desestabilização da membrana plasmática por meio do efluxo de colesterol e fosfolipídeos (MANJUNATH; THÉRIEN et al., 2002).

As diferenças observadas em relação ao impacto das proteínas Fn-2 de equinos e bovinos na membrana de espermatozoides, como por exemplo, o grau de imobilização da membrana e extração de lipídios, pode refletir a modulação da função espermática de cada espécie (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005).

2.3.2.3. Espermaesinas

As espermaesinas são glicoproteínas compostas por 110 a 113 aminoácidos na sua estrutura e compreendem um único domínio CUB estabilizado por pontes dissulfídicas (BORK; BECKMANN, 1993; ROMERO et al., 1997). São multifuncionais e exibem habilidade para se ligar a heparina, a inibidores de proteases, fosfolipídeos e a carboidratos (TOPFER-PETERSEN et al., 1999).

As espermaesinas se aderem a membrana plasmática durante a ejaculação e são caracterizadas como proteínas multifuncionais, pois possuem propriedades de ligação a heparina, a inibidores de proteases, a fosfolipídeos e a carboidratos. Desta forma, podem

exercer função como receptores no reconhecimento entre os gametas ou mediar a ligação espermática no epitélio da tuba uterina (TOPFER-PETERSEN et al., 1998; TOPFER-PETERSEN et al., 1999).

No suíno, seis proteínas deste grupo foram identificadas (AWN-1, AWN-2, AQN-1, AQN-3, PSP-I, PSP-II) e correspondem a 30% das proteínas totais do plasma seminal (CALVETE et al., 1995; VARELA et al., 1997).

A HSP-7 é a espermaesina equina homóloga a AWN suína e ambas possuem atividade de ligação a carboidratos (CALVETE et al., 1995). A HSP-7 demonstrou propriedades de ligação a zona pelúcida de equinos, indicando sua função na interação entre os gametas (REINERT et al., 1996).

2.4. Biomarcadores Moleculares de Fertilidade no Macho

A fertilidade masculina é complexa, e depende de uma população heterogênea de espermatozoides que irá interagir de diferentes formas em diversos locais do trato reprodutor da fêmea, zona pelúcida e oócito (RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 2011). Desta forma, os testes laboratoriais de rotina aplicados na avaliação da qualidade do sêmen, por muitas vezes não são capazes de determinar o potencial de fertilidade dos reprodutores (AMANN, 1995; JOBIM et al., 2009; MOURA et al., 2011).

Diversos estudos sugerem que componentes moleculares dos espermatozoides, ou do meio que os cercam, podem influenciar sua capacidade fecundante. Pesquisas sobre a avaliação da integridade do DNA, identificação de mRNAs dos espermatozoides, identificação de proteínas intra-espermáticas e da membrana, e proteínas expressas nos fluidos reprodutivos, são realizadas com o intuito de identificar biomarcadores de fertilidade (MOURA et al., 2011).

Biomarcadores são por definição indicadores biológicos característicos de um processo, evento ou condição que podem ser objetivamente mensurados, avaliados e comparados. Adicionalmente, funcionam como um indicador de uma via fisiológica (MERRIAM-WEBSTER, 2012). Portanto, a disponibilização de biomarcadores na área de reprodução possibilita o desenvolvimento de novos critérios para a predição e aumento da fertilidade masculina. Com isso, a análise proteômica seminal tornou-se essencial para identificação de propriedades e funções de proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação das funções no trato reprodutor masculino e consequentemente, no processo de fertilização (MILARDI et al., 2013).

A busca por marcadores moleculares para fertilidade em machos de várias

espécies tem aumentado progressivamente na última década, sendo as proteínas do plasma seminal um dos principais alvos de estudo.

Em equinos, até o momento, a proteína CRISP3 é a principal proteína do plasma seminal relacionada a índices de concepção e pode ser considerada um biomarcador de fertilidade (NOVAK et al., 2010). Na membrana plasmática de espermatozoides, duas proteínas, SNARE e caveolina-1, foram igualmente relacionadas aos índices de concepção e podem ser utilizadas como ferramentas para a predição da fertilidade em garanhões (GAMBOA; SANTOS, 2005).

Em bovinos, a busca por marcadores de fertilidade é amplamente estudada. Diversas proteínas do plasma seminal possuem correlação com a fertilidade e podem ser utilizadas para predição do potencial reprodutivo do macho, especialmente osteopontina (KILLIAN et al., 1993), prostaglandina D-sintetase tipo-lipocalina (GERENA et al., 1998), fosfolipase A2 (MOURA et al., 2006), P25b (PARENT et al., 1999) e antígeno associado a fertilidade (BELLIN et al., 1996).

A osteopontina (OPN) é expressa nas células epiteliais da ampola, na vesícula seminal (RODRIGUEZ et al., 2000), nos testículos, nos epidídimos (ERIKSON et al., 2007) e na próstata de bovinos (BUSTAMANTE FILHO, 2010). A OPN liga-se a membrana espermática durante a ejaculação, especificamente na região acrossomal, pós-acrossomal e na peça intermediária do espermatozoide bovino (ERICKSON, et al., 2007). Sua função está envolvida na adesão celular por receptores celulares da família integrina (CRAIG et al., 1989). Os receptores para integrina tem papel fundamental na ligação espermatozoide-oócito, na pré-implantação e na implantação embrionária (VINATIER, 1995).

O antígeno associado a fertilidade (FAA) pertence ao grupo das proteínas de ligação à heparina (HBPs) (BELLIN et al., 1996). Desta forma, as HPBs durante a ejaculação se aderem a membrana espermática, que por sua vez, ligam-se aos GAGs presentes no trato reprodutivo da fêmea mediando o processo de capacitação espermática (MILLER et al., 1987). Além disso, a proteína recombinante da FAA bovina possui atividade DNase-I, que atua no processo de liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (ALGHAMDI; FOSTER, 2005). As NETs são estruturas em formato de redes, liberadas para o meio extracelular após a ativação dos neutrófilos, sendo constituídas de DNA, histonas e proteínas de grânulos de neutrófilos, que são capazes de aprisionar e destruir patógenos (BRICKMANN et al., 2004).

Atualmente, encontra-se disponível comercialmente um kit de ELISA contendo

o anticorpo monoclonal para identificação da proteína FAA na membrana plasmática do espermatozoide bovino (Repro Tec, Inc. em cooperação com a Universidade do Arizona EUA– grupo Prof. Roy Ax), sendo utilizado como um indicador de touros com maior fertilidade. Skopp (2011) afirmou que a utilização do teste de FAA juntamente com exame andrológico é um método efetivo e não invasivo e pode ser utilizado como uma ferramenta para identificar touros com baixa fertilidade. E devido à homologia do FAA em outros mamíferos, os testes de FAA poderiam se estender para a espécie humana, animais silvestres e animais de produção para a predição da fertilidade de reprodutores.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A utilização de dois grupos distintos e bem caracterizados de fertilidade (garanhões férteis e subférteis) pode possibilitar a detecção de proteínas associadas à fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática de espermatozoides. A identificação das proteínas pode permitir a elucidação de sua atividade biológica e servir como um marcador molecular de fertilidade.

O plasma seminal e a membrana de espermatozoides de garanhões subférteis possuem determinadas proteínas que acarretam a queda dos padrões de motilidade espermática, menor integridade de membrana plasmática e acrossomal e maior fragmentação de DNA, fatores estes que podem contribuir para a queda de fertilidade destes animais.

A caracterização do proteoma seminal e da membrana plasmática de garanhões por abordagens proteômicas recentes podem proporcionar melhor entendimento da fisiologia reprodutiva masculina e identificação de marcadores moleculares com maior eficácia.

Assim, este estudo baseou-se na hipótese que as proteínas do plasma seminal e da membrana espermática estão associadas à fertilidade de garanhões da raça Quarto de Milha, assim como, a cinética e cromatina espermática e a integridade da membrana plasmática e acrossomal.

4. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo:

- Avaliar e correlacionar os parâmetros cinéticos, integridade de membrana plasmática e acrossomal e fragmentação de DNA espermático com a fertilidade de garanhões.
- Comparar o perfil proteico do plasma seminal e da membrana plasmática de garanhões férteis e subférteis.
- Sequenciar e identificar proteínas com diferentes padrões de expressão no plasma seminal e na membrana plasmática de garanhões férteis e subférteis.
- Caracterizar o proteoma do plasma seminal e da membrana plasmática de equinos com abordagem proteômica moderna.

5. REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J.; NIXON, B.; LIN, M.; KOPPERS, A.J.; LEE, Y.H.; BAKER, M.A. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p.554-64, 2007.
- ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N. Seminla DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. **Biology of Reproduction**, v. 73, p.1174-1181, 2005.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders. 1993, p.715-745.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-97, 1996.
- BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J.F.; FIÉNI, F.; TAINURIER, D.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. **Theriogenology**, v. 58, p.229-32, 2002.
- BATRUCH, I.; LECKER, I.; KAGEDAN, D.; SMITH, C.R.; MULLEN, B.J.; GROBER, E.; LO, K.C.; DIAMANTIS, E.P.; JARVI, K.A. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. **Journal of Proteome Research**, v.10, p.941-53, 2011.
- BELLEANNE, C.; BELGHAZI, M.; LABAS, V.; TEIXEIRA-GOMES, A.P.; GATTI, J.L.; DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. **Proteomics**, v.11, p. 1952-1964, 2011.
- BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E.; ZHANG, H.; SMITH, R.G.; FORREST, D.W.; SPROTT, L.R.; AX, R.L. Fertility-associated antigen (FAA) on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2032-2039, 1998.
- BIANCHI, E.; DOE, B.; GOULDING, D.; WRIGHT, G. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. **Nature**, v.508, p.483-487, 2014.
- BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. **Journal of Molecular Biology**, v.231, p.539-45, 1993.
- BLASCHUK, O.; BURDZY, K.; FRITZ, I.B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v.258, p.7714-7720, 1983.
- BREWIS, I.A.; GADELLA, B.M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, v.16, p. 68-79, 2010.
- BRICKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMAN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.33, p.1532-1535, 2004.
- BUSO, D.; GOLDWEIC, N.M.; HAYASHI, M.; KASAHARA, M.; CUASNICU PS. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. **Biology of Reproduction**, v.76, p.701-708, 2007.
- BUSTAMANTE FILHO, I.C. **Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen**. Porto Alegre, 2010. 36p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

- CALVETE, J.J.; REINERT, M.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. **Journal of Chromatography**, v.711,p.167–173, 1995.
- CALVETE, J.J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 29, p. 411 – 426, 1994.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. **Society for Reproduction and Fertility**, v.65, p.201-215, 2007.
- COHEN, D.J.; MALDERA, J.A.; MUÑOZ, M.W.; ERNESTO, J.I.; VASEN, G.; CUASNICU, P.S. Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. **Biological Research**, v. 44, p. 135-138, 2011.
- CRAIG, A.M.; SMITH, J.H.; DENHARD, D.H. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.9682-9689, 1989.
- DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, p 27-42, 2014.
- DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technology**, v.61, p.7–17, 2003.
- DACHEUX, J.L.; BELLEANNÉE C, GUYONNET B, LABAS V, TEIXEIRA-GOMES AP, ECROYD H, DRUART X, GATTI JL, DACHEUX F. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.58, p.197-210, 2012.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 305, p.341-349, 1993.
- DOTY, A.; BUHL, W.C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K.E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M.; MUTZ, M.; TROEDSSON, M.H.T. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 157-164, 2011.
- DRUART, X.; RICKARD, J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; KERSHAW-YOUNG, C.M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C.G.; DE GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of Proteomics**, v.91, p.13-22, 2013.
- EDDY, E.M., O'BRIEN, D. (1994). Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction (2nd edition)**. New York: Raven Press, 1994. p.29–78.
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHÄFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 45-57, 2005.
- ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v.17, p.2904–2911, 2002
- ERIKSON, D.W.; WAY, A.L.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis

- homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v.133 p.909-917, 2007.
- EVANS, J.P. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p.114-131, 1999.
- FAYRER-HOSKEN, R.A.; CAUDLE, A.B.; SHUR, B.D. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, p. 74–78, 1991.
- FABREGA, A.; PUIGMULE, M.; DACHEUX, J.L.; BONET, S.; PINART, E. Glycocalyx characterisation and glycoprotein expression of *Sus domesticus* epididymal sperm surface samples. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p.619–630, 2012.
- FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p.197-235, 2000.
- FOSTER, J.A.; GERTON, G.L. Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine- rich secretory protein (CRISP) family. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p.221–229, 1996.
- FOUCHE-COURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1790–1803, 2000.
- FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 46, p. 1389 – 1402, 1996.
- GADELLA, B.M.; TSAI, P.S.; BOERKE, A.; BREWIS, I.A. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. **The International Journal of Developmental Biology**, v.52, p.473-480, 2008.
- GAMBOA, S.; SANTOS, J.R. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. **Theriogenology**, v.64, p.275-291, 2005.
- GATTI, J.L.; DRUART, X.; GUERIN, Y.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. A 105-to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. **Biology of Reproduction**, v.60, p.937–945, 1999.
- GATTI, J.L.; CASTELA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p.321-339, 2004.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v.58, p.826-833, 1998.
- GONÇALVES, R.F.; WOLINETZ, C.D.; KILLIAN, G.J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α v and α 5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.468-474, 2007.
- GUASTI, P.N. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo** [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2010.

- GUR, Y.; BREITBART, H. Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 282, 45–55, 2008.
- HAMANN, H.; JUDE, R.; SIEME, H.; MERTENS, U.; TÖPFER-PETERSEN, E.; DISTL, O.; LEEB, T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. **Animal Genetics**, v.38, p.259-264, 2007.
- HARDY, D.M.; HUANG, T.T.F.; DRISCOLL, W.J.; TUNG, K.S.K.; WILD, G.C. Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.38, p.423-437, 1988.
- HEISE, A.; KAHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p.48-53, 2010.
- HERWIG, R.; KNOLL, C.; PLANYAVSKY, M.; POURBIABANY, A.; GREILBERGER, J.; BENNETT, K.L.A. Proteomic analysis of seminal plasma from infertile patients with oligoasthenoteratozoospermia due to oxidative stress and comparison with fertile volunteers. **Fertility and Sterility**, v. 100, p. 355-66, 2013.
- HOWES, E.A.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of mac393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, 4, 673-681. 1998
- INOUE, N.; HAMADA, D.; KAMIKUBO, H.; HIRATA, K.; KATAOKA, M.; YAMAMOTO, M.; IKAWA, M.; OKABE, M.; HAGIHARA, Y. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. **Development**, v. 140, p.3221-3229, 2013.
- JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Marcadores proteicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.6, p.11-19, 2009.
- KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 63, p.1354-1365, 2005.
- KARESKOSKI, M.; SANKARI, S.; JOHANNISSON, A.; KINDAHL, H.; ANDERSSON, M.; KATILA T. The association of the presence of seminal plasma and its components with sperm longevity in fractionated stallion ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1073-1081, 2011.
- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p.249-256, 2008.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KOEHLER, J.K.; NUDELMAN, E.D.; HAKOMORI, S. A collagen-binding protein on the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. **The Journal of Cell Biology**; v.86, p.529-536, 1980.
- KOHANE, A.C.; CAMEO, M.S.; PIÑEIRO, L.; GARBERI, J.C.; BLAQUIER, J.A. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 23, p.181-187, 1980.
- MAEDA, T.; NISHIDA, J.; NAKANISHI, Y. Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. **Development Growth & Differentiation**, v.41, p.715–722, 1999.
- MAŇÁSKOVÁ, P.; BALINOVÁ, P.; KRAUS, M.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and

- chromatographic methods. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.50, p.399 – 410, 2003.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p.109-119, 2002.
- MARENGO, S. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v.05, p. 52–63, 2008.
- MEYERS, S.A. Equine sperm–oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 291–303, 2001.
- MERRIAM-WEBSTER. **Merriam-Webster dictionary**. Springfield,MA: Merriam-Webster; 2012.
- MÉTAYER, S.; DACHEUX, F.; GUÉRIN, Y.; DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L. Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of germin al angiotensin I-converting enzyme. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1332-1339, 2001.
- MILARDI, D.; GRANDE, G.; VINCENZONI, F.; CASTAGNOLA, M.; MARANA, R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. **Molecular Reproduction and Development**, v.80, p.350–357, 2013.
- MILARDI, D.; GRANDE, G.; VINCENZONI, F.; MESSANA, I.; PONTECORVI, A.; DE MARINIS, L.; CASTAGNOLA, M.; MARANA, R. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. **Fertility and Sterility**, v. 97, p.67-73, 2012.
- MILLER, D.J., M.A. WINER, AND R.L. AX. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v.42, p.899-915, 1990.
- MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELLAQUA JR, J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.; AVANZI, B.R.; ALVARENGA, M.A.; GUASTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.197-201, 2011.
- MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1438, p.175–184, 1999.
- MORRELL, J.M.; GEORGAKAS, A.; LUNDEHEIM, N.; NASH, D.; DAVIES MOREL, M.C.; JOHANNISSON, A. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. **Theriogenology**, v. 82, p. 176–183, 2014.
- MORRISSETTE, J.; KRÄTZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; EL-HAYEK, R.; MOCHCA-MORALES, J.; MARTIN, B.M.; PATEL, J.R.; MOSS, R.L.; SCHLEUNING, W.D.; CORONADO, R.; POSSANI, L.D. Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. **Biophysical Journal**, v. 68, p.2280-2288, 1995.
- MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A.; RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.A.M.; OLIVEIRA, R.V.; MENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.139-144, 2011.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v.27, p.201-211, 2006.

- NOVAK, S.; SMITH, T.A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.R.; DIXON, W.T. Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v.74, p.956–967, 2010.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837–846, 2000.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.293–301, 2008.
- PARENT, S.; LEFÈVRE, L.; BRINDLE, Y.; SULLIVAN, R. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. **Molecular Reproduction and Development**, v.52, p.57–65, 1999.
- PERUMAL, P. **Seminal Plasma Proteins**. Available from Nature Precedings <http://dx.doi.org/10.1038/npre.2012.7001.1> (2012). Acesso 18/06/2014.
- PILCH, B.; MANN, M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. **Genome Biology**, v. 7, p.40–49, 2006.
- POLAKOSKI, K.L.; KOPTA, M. Seminal Plasma. In: Zaneveld LJD, Chatterton RT, editors. **Biochemistry of mammalian reproduction**. Wiley Interscience Publication; 1982. p. 89–117.
- RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; CASTRO-CHAVES, M.M.; ALVARENGA, M.A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v. 79, p. 1120–1123, 2013.
- REID, A.T.; REDGROVE, K.; AITKEN, R.J.; NIXON, B. Cellular mechanisms regulating sperm–zona pellucida interaction. **Asian Journal of Andrology**, v. , p. 88–86, 2011.
- REINEKE, A.; HEB, O.; SCHAMBONY, A.; PETROUNKINA, A.M.; BADER, H.; SIEME, H.; TOPFER-PETERSEN, E. Sperm-associated seminal plasma proteins – a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? **Pferdeheilkunde**, v.15, p.531–537, 1999.
- REINERT, M., CALVETE, J.J., SANZ, L., MANN, K., TOPFER-PETERSEN, E., Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal of Biochemistry**, v.242, p.636–640, 1996.
- RODRIGUEZ, C.M., DAY, J.R., KILLIAN, G.J. Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.21, p.414–419, 2000.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., KVIST, U., ERNERUDH, J., SANZ, L.; CALVETE, J. J. Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play? **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.11–22, 2001.
- ROMERO, A.; ROMAO, M.J.; VARELA, P.F.; KOLLN, I.; DIAS, J.M.; CARVALHO, A.L.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. (1997). The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.4, p.783–788, 1997.
- RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N.; HUNT, W.; STRACK, L.E. Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.30, p.959–978, 1984.
- SCHAMBONY, A.; HESS, O.; GENTZEL, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.53, p.67–72, 1998.

- SYLVESTER, C.; MORALES, R.; O.K.O, R.; GRISWOLD; M.D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**, v.45, p.195-207, 1991.
- SKOPP, S. **Fertility associated antigen (FAA): economics of testing**. 2011. 25 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Arizona.
- STRZEŻEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLIŃSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRASER, L. Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**, v. 5, p.279-290, 2005.
- TOPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 5, p.314–329, 1999.
- TAYLOR, A.; ROBSON, A.; HOUGHTON, B.C.; JEPSON, C.A.; FORD, W.C.; FRAYNE, J. Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. **Human Reproduction**, v. 28, p. 2332–2342, 2013.
- TOPFER-PETERSEN, E., ROMERO, A., VARELA, P.F., EKHLASI-HUNDRIESER, M., DOSTALOVA, Z., SANZ, L., CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v.30, p.217–224, 1998.
- TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.
- TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.S.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHL, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-186, 2005.
- VARELA, P.F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMÃO, M.J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. A resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **Journal of Molecular Biology**, v.274, p.635-649, 1997.
- VARNER, D.D.; LOVE C.C.; BRINSKO S.P.; BLANCHARD, T.L.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.B.; CARROLL B.S.; ESLICK, M.C. Semen Processing for the Subfertile Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 677-685, 2008.
- VARNER, D.D; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Therigenology**, v. 28, p.709-723, 1987.
- VIJAYARAGHAVAN, S.; STEPHENS, D.T.; TRAUTMAN, K.; SMITH, G.D.; KHATRA, B.; CRUZ E SILVA, E.F.; GREENGARD, P. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity'. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 709-718, 1996.
- VINATIER, D. Integrins and reproduction. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.59, p.71-81, 1995.
- VOGLMAYR J. K. Metabolic changes in spermatozoa during epididymal transit., In: HAMILTON D. W.; GREEP R. D., **Handbook of Physiology**. 1975; p.437-451.
- VON FELLEBERG, R.; ZWEIFEL, H.R.; GRUNIG, G.; PELLEGRINI, A. Proteinase inhibitors of horse seminal plasma: A high molecular mass, acid-soluble proteinase inhibitor. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler** , v. 366, p.705-712, 1985.

- VOS, J.P., LOPES-CARDOZO, M., GADELLA, B.M. Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1211, p.125-49, 1994.
- WADE, M.A.; ROMAN, S.D.; JONES, R.C.; AITKEN, R.J. Adenylyl cyclase isoforms in rat testis and spermatozoa from the cauda epididymidis. **Cell Tissue Research**, v. 314, p.411-419, 2003.
- WANG, H.; LIU, J.; CHO, K.H.; REN, D. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. **Biology of Reproduction**, v.81, p. 539–544, 2009.
- WITE, R.G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, São Paulo: Manole, 1988, p.212-28.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILLS, J. **The physiology of reproduction (2nd edition)**. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.
- ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; MELO, C.M.; BRISOLA, M.L. Protein profile of equine seminal plasma: correlation to semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.313-315, 2005.

Capítulo 2

Trabalho a ser enviado para a revista **Biology of Reproduction** (Normas para publicação especificadas no Anexo II)

ARTIGO 1 - Proteínas do plasma seminal e membrana plasmática associadas à fertilidade de garanhões Quarto de Milha

Running Title: Proteínas associadas à fertilidade de garanhões

Summary sentence: Garanhões férteis e subférteis possuem cinética espermática relacionada a fertilidade e expressão diferenciada de proteínas no plasma seminal e na membrana plasmática.

Palavras-chave: plasma seminal, membrana espermática, garanhões subférteis, Quarto de Milha, marcador de fertilidade, fertilidade de garanhões, proteínas associadas a fertilidade

Priscilla N. Guasti¹,
Fabiana F. Souza¹,
Caroline Scott¹,
Patrícia M. Papa¹,
Felipe P. Hartwig¹,
Rosiara D. Maziero¹,
Camila P. Freitas-Dell'Aqua¹,
Lucilene D. Santos²,
Frederico O. Papa¹.

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu ,SP Brasil.

²Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil.

Correspondência: Priscilla N. Guasti, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu –SP, 18618-970, Brasil. E-mail: priguasti@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os parâmetros seminais, a expressão de proteínas do plasma seminal (PS) e da membrana plasmática (MP) correlacionando-os com a fertilidade de garanhões da raça Quarto de Milha. Três ejaculados de 10 garanhões férteis ($> 60\%$ taxa de concepção) e 9 garanhões subférteis ($< 40\%$ taxa de concepção) foram avaliados quanto aos parâmetros de cinética, integridade de membrana plasmática e acrossomal e cromatina espermática. Proteínas do plasma seminal e extraídas da membrana espermática foram submetidas a eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) e análise *shotgun* (LC-ESI QTOF). Foi observada uma associação positiva da fertilidade com a motilidade total, motilidade progressiva, linearidade e espermatozoides rápidos. Um *spot* diferencial (28 kDa; pI 5,6) do plasma seminal apresentou maior expressão em garanhões subférteis e foi identificado como uma proteína ligadora de zinco. Não foi observada diferença na expressão proteica na membrana plasmática entre os garanhões. Na análise *shotgun*, foram identificadas 53 proteínas únicas no PS de garanhões férteis, como a SPATA21 e 103 nos garanhões subférteis, como a clusterina. Na MP, foram identificadas 269 proteínas em animais com alta fertilidade como a SP-1, SMOK e PLC, e 167 proteínas únicas em garanhões subférteis. Em conclusão, o estudo de dois grupos de garanhões com distintos índices de concepção possibilitou a identificação de proteínas únicas do plasma seminal e da membrana plasmática relacionadas a fertilidade, assim como parâmetros de cinética espermática. Tais relações podem servir como base para determinação de marcadores moleculares de fertilidade em garanhões.

INTRODUÇÃO

25 O plasma seminal (PS) consiste em uma mistura complexa de secreções produzidas pela *rete testis*, epidídimo e glândulas acessórias [1]. Sua função, além de servir como meio de transporte dos espermatozoides, está relacionada ao metabolismo espermático e ao processo de fecundação como modulação da motilidade espermática, ação antimicrobiana, formação de reservatório na tuba uterina e interação entre os gametas [2-5]. Adicionalmente, em equinos, possui papel mediador da capacitação espermática e da resposta inflamatória pós-coital no útero de éguas [6,7].

A concentração média de proteínas do plasma seminal equino é de 10 mg/mL, relativamente baixa quando comparada a outros mamíferos (20-60 mg/mL) [8]. Ainda assim, constitui uma grande fonte de proteínas de fácil acesso para pesquisa. Apesar disso, há poucos estudos sobre a composição proteica do plasma seminal na espécie equina, particularmente a comparação entre animais férteis, subférteis e inférteis. A caracterização proteômica do plasma seminal possibilita o entendimento da etiologia e dos mecanismos envolvidos nas desordens reprodutivas nos machos [9]. Em humanos, o proteoma do plasma seminal tem sido amplamente descrito com uma lista atual de mais de 2000 proteínas identificadas [10-12], enquanto que nas principais espécies de mamíferos domésticos poucas proteínas foram identificadas [13].

Até o momento, de acordo com nosso conhecimento, dois estudos compararam o perfil proteômico de garanhões com a fertilidade. Brandon [14], utilizando eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE), constataram que a proteína do plasma equino 1 (SP-1) foi positivamente relacionada a fertilidade de garanhões (72 kDa e pI 5,6) e outras três proteínas foram negativamente associadas a fertilidade (SP-2, 75 kDa e pI 6,0; SP-3, 18 kDa e pI 4,3; SP-4, 16 kDa e pI 6,5). Novak [15], ao utilizar a eletroforese bidimensional associada a espectrometria de massas, identificaram quatro proteínas relacionadas negativamente com a fertilidade (*kallikrein-1E2*, clusterina, SP-1 e SP-2) e

50 uma proteína com relação positiva a taxa de concepção do primeiro ciclo (CRISP3).

Além da comparação do perfil do proteoma, o estudo de determinadas proteínas do plasma seminal sobre o processo de fertilização tem sido descrito. As proteínas do plasma seminal equino, HSP-1, HSP-2, HSP-5 e HSP-8, atualmente denominadas SP, possuem habilidade de ligação a heparina, indicando alguma função no processo de fertilização [8]. A HSP-7, membro da família de espermedesinas, se associa a 55 membrana plasmática (MP) principalmente na região equatorial e possuem função na interação oócito-espermatozoide [16]. As proteínas com domínio fibronectina tipo II (HSP-1 e HSP-2) se aderem aos fosfolipídeos da MP durante a ejaculação e promovem modificações na estrutura celular [17,18]. A CRISP3 regula a eliminação de 60 espermatozoides no trato reprodutor da fêmea, pela supressão da ligação entre espermatozoides e células polimorfonucleares [7]. Além disso, variações no gene da CRISP3 foram identificadas como uma causa de redução da fertilidade [19]. O fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), quando em maiores concentrações no plasma seminal, possibilita maior taxa de prenhez em éguas [20].

65 Do mesmo modo, as proteínas da membrana plasmática desempenham funções na adesão do espermatozoide com o epitélio da tuba uterina (formação de reservatórios espermáticos) e na interação entre os gametas [21,22], e podem ser candidatas potenciais a marcadores moleculares de fertilidade. Gamboa e Santos [23] relataram que três proteínas da membrana plasmática de espermatozoides equinos, SNARE, 70 caveolina-1 e NSF, estão relacionadas com a fertilidade. A enzima galactosiltransferase, presente na membrana plasmática de equinos, bovinos e camundongos, parece possuir função na interação entre o espermatozoide e o ócito devido a sua localização específica nas três espécies [24]. A glicerolfosfatidilinositol acoplada a hialuronidase (PH-20), uma hialuronidase espermática, apresenta diferentes padrões de expressão na

75 membrana plasmática de espermatozoides epididimários e ejaculados, assim como após a capacitação *in vitro*, e pode estar envolvida no processo de penetração do *cummulus*, reconhecimento dos gametas e fusão com o oolema [25].

Em vista do envolvimento das proteínas do plasma seminal e da membrana espermática na fertilidade equina, o objetivo deste estudo foi comparar o proteoma deste
80 fluido e tipo celular de garanhões férteis e subférteis da raça Quarto de Milha, utilizando 2D SDS PAGE e espectrometria de massas tandem (MALDI-TOF/TOF MS/MS) e abordagem proteômica *shotgun* (LC-ESI QTOF MS/MS); e determinar a correlação das proteínas, fertilidade e os parâmetros espermáticos.

85 MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos

Os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (153/2012-CEUA).

90 *Material*

Os reagentes químicos utilizados foram: Hoechst 33342 (Molecular Probes); iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich), FITC-PSA (Sigma-Aldrich), SigmaFast™ protease inhibitor tablets (Sigma-Aldrich); nonidet P40 (Sigma-Aldrich); phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich); dithiothreitol (Bio-Rad Laboratories); DeStreak
95 rehydration solution (GE Healthcare Life Sciences); IPG buffer (GE Healthcare Life Sciences); sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma-Aldrich); Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); sequencing grade modified trypsin (Promega). Os demais reagentes foram fornecidos por Sigma-Aldrich.

100 *Seleção dos Garanhões e Coleta das Amostras*

Foram utilizados 19 garanhões da raça Quarto de Milha, com idade entre 10 a 15

anos, com histórico reprodutivo conhecido. Os garanhões foram separados em dois grupos de acordo com a fertilidade, sendo grupo de garanhões férteis (n=10), com taxa de concepção maior que 60%; e grupo de garanhões subfêrteis (n=9), com taxa de concepção menor que 40%.

O grau de fertilidade foi avaliado pelo histórico reprodutivo dos animais fornecido pelas centrais de reprodução que alojavam os garanhões e no número de embriões recuperados/número de inseminações, de forma que para cada garanhão foram consideradas 20 inseminações de diferentes éguas. Como critério de seleção, os garanhões participaram no mínimo há 2 anos em programas de transferência de embriões. Os dados de concepção coletados se referem a estação de monta de 2012.

Três ejaculados de cada animal foram coletados com vagina artificial. O sêmen foi filtrado para remoção do gel e uma alíquota 10 mL foi refitada e submetida a centrifugação por $600 \times g$, 10 minutos, para obtenção e análise proteômica do plasma seminal, o qual foi acrescido de um coquetel de inibidores de proteases. Dez alíquotas de 1 mL de sêmen foram acrescidas de um coquetel de inibidores de proteases para a extração das proteínas de membrana espermática. As amostras destinadas a análise proteômica foram armazenadas em nitrogênio líquido para o transporte. O sêmen restante foi diluído em meio a base de leite desnatado (BotuSemen[®], Botupharma) na concentração de 80×10^6 /mL espermatozoides totais para avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, e fragmentação da cromatina e armazenado a 15°C para o transporte das amostras (máximo 4 horas).

Avaliação da Cinética Espermática

125 Após o transporte, as amostras seminais diluídas foram avaliadas pelo método
computadorizado de avaliação espermática (CASA, Hamilton Thorne, IVOS 10) para
motilidade total (MT), motilidade progressiva (PM), velocidade média de trajeto (VAP),
velocidade curvilinear (VCL), linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides
rápidos (Rap). O *setup* do sistema CASA está descrito na Tabela 1.

130

Avaliação da Membrana Plasmática e Acrossomal

Para a avaliação da membrana plasmática e acrossomal (MPA), 1 mL das
amostras seminais foi diluído em meio TALP [26] modificado (sem adição de
CaCl₂.2H₂O), na concentração de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Então, 200 µL desta
135 diluição, contendo 1×10^6 de espermatozoides, foram acrescidos de 5 µL de hoechst
33342 (100 µg/mL), 5 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL) e 0,5 µL de FITC-PSA
(1,000 µg/mL). As amostras foram incubadas a 37°C, durante 15 minutos, protegidas da
luz. Após esse período, mais 200 µL de TALP foram adicionadas a amostra e então
avaliadas. As análises foram realizadas por citometria de fluxo (LSRFortessa Cell
140 Analyzer, Becton Dickinson), com taxa de aquisição de aproximadamente 600 a 1000
eventos/s, com 10,000 células por amostra. A fluorescência verde (FL1) foi coletada
com filtro de 580-nm e a fluorescência vermelha com filtro de 635-nm. Os debris
celulares e partículas foram excluídos da aquisição e análise pelo ajuste do *threshold* e a
coloração de Hoechst 33342.

145

TABELA 1. Setup do sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) para
 150 avaliação de espermatozoides equinos.

Características	Ajuste
Número de imagens adquiridas	30
Contraste mínimo da célula	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80 %
Referência de VAP para velocidade lenta	30.0 µm/segundo
Referência de VAP para velocidade média	70.0 µm/segundo
Referência de VSL para velocidade lenta	20.0 µm/segundo
Tamanho da cabeça estática	0.62 – 2,98
Intensidade da cabeça estática	0.24 – 1.19
Limite inferior-superior de alongamento da célula	0 – 100 %
Aumento	1.95×
Temperatura	37°C

Avaliação de Fragmentação da Cromatina

Para avaliação da integridade do DNA, foram utilizados 5×10^6 de espermatozoides diluídos em meio TALP. Desta amostra diluída, 100 µL foram
 155 acrescidos de 400 µL de solução ácida detergente (0,08 N HCl, 0,15 M NaCl, 0,1 % Triton-X 100; pH 1,4). Exatamente 30 segundos após, 0,6 mL de solução corante de acridina laranja (6 mg/mL de acridina laranja, 0,037 M ácido cítrico, 0,126 M Na₂HPO₄, 0,0011 M EDTA dissódico, 0,15 M NaCl; pH 6,0) foi adicionada as amostras e estas permaneceram protegidas da luz por 30 segundos e então avaliadas. As análises foram

160 realizadas por citometria de fluxo (LSRFortessa Cell Analyzer, Becton Dickinson), com
taxa de aquisição de aproximadamente 100 a 200 eventos/s, com 10,000 células por
amostra. A fluorescência média do canal foi determinada para ambos vermelho e verde.
Os debris celulares e partículas foram excluídos da aquisição e análise pelo ajuste do
threshold e a coloração de Hoechst 33342.

165

Preparação das Amostras de Plasma Seminal

Após a descongelação, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação
a $15,000 \times g$ por 60 minutos à 4°C e as proteínas do plasma seminal foram
quantificadas pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA), de acordo com metodologia
170 descrita por Smith [27].

Preparação e Extração das Proteínas de Membrana Espermática

As amostras foram descongeladas e o total de 500×10^6 espermatozoides foram
separados para a extração de proteínas da membrana espermática. Foram realizadas 3
175 lavagens, com a solução de inibidores de proteases acrescida de 0,1 mg/mL PMSF, por
centrifugação a $700 \times g$, 5 minutos, 4°C. As proteínas de membrana foram extraídas
com 0,5% (v/v) de nonidet P-40 [28] e sonificador (Digital Sonifier, Model 450, Branson
Ultrasonics Corporation), utilizando probe 3,0 mm, 20% amplitude em 10 pulsos de 30
segundos e pausa de 1 minuto entre os pulsos [29]. Após a sonicação, as amostras foram
180 centrifugadas por $10,000 \times g$, durante 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante, contendo as
proteínas da membrana espermática solubilizadas, foi coletado.

A determinação de proteína total foi realizada pelo ensaio de BCA. Em seguida,
as amostras foram submetidas à liofilização (FTS Systems, TDS-00209-A) em função
da baixa concentração de proteína total encontrada nessas amostras.

185 *Eletroforese Bidimensional*

Para cada animal utilizou-se um pool das três coletas seminais, com intuito de eliminar a variabilidade dos ejaculados. Para a primeira dimensão, fitas de IPG de 7cm com gradiente imobilizado de pH 3-10 não linear (GE Healthcare Life Science) foram reidratadas por 16 horas com alíquotas de 150 µg proteína totais do plasma seminal ou
190 membrana espermática, diluída em solução de reidratação acrescida de 0,7 µL de anfólitos. A reidratação das fitas ocorreu de forma passiva à temperatura ambiente. A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no aparelho Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories). O programa constituiu de corrente de 50µA/fita a 250 V por uma hora, 2000 V por uma hora, 4000 V por uma hora, 4000 V até serem acumulados 15000
195 V/hora e 4000 V por uma hora. Após a IEF, as fitas foram equilibradas, por 20 minutos sob leve agitação, em solução de equilíbrio (6 M uréia, 2% SDS, 0,375 M Tris-HCL (pH 8,8), 20% glicerol) contendo 130 mM ditioneitol e em seguida, 20 minutos, na mesma solução de equilíbrio, porém contendo 135 mM iodoacetamida (IAA).

A segunda dimensão foi realizada em mini-cuba vertical (Mini-PROTEAN3
200 Dodeca Cell, Bio-Rad Laboratories) em gel de 12% de poliacrilamida (8.3 x 7.3 cm). Foram realizadas duas réplicas de cada amostra e utilizado padrão de massa molecular de 10 a 260 kDa. As fitas e o marcador de massa molecular foram cobertos com solução selante de agarose (124 mM Tris, 1 M Glicina, 0,5% SDS, 0,5% agarose, 0,001% bromofenol azul). O tampão de corrida utilizado foi o mesmo descrito por Laemmli
205 [30], 1 x concentrado para o anodo e 3 x concentrado para o catodo. A voltagem foi fixada em 50 V até as proteínas migrarem da fita de hidratação, logo após a voltagem foi fixada em 150 V até o final da corrida, a miliamperagem permaneceu livre. O tempo de corrida para os géis foi de 90 a 110 minutos e os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue G-250 (CBB).

210 *Aquisição de Imagem e Análise dos Géis*

Os géis foram scaneados com ImageScanner III (GE Healthcare Life Science) e com o software LabScan V6.0 (GE Healthcare Life Science). A análise dos géis foi realizada com o software ImageMaster 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare Life Science). O gel de referência foi escolhido por possui maior número de *spots* e então foi utilizado
215 para a comparação dos *spots* correspondentes entre os géis. O volume relativo (%) dos *spots* foi utilizado para determinar a expressão diferencial entre as proteínas.

Digestão Proteica em Gel

As proteínas contidas nos *spots* com maior volume relativo (%) do plasma
220 seminal e da membrana plasmática foram excisadas do gel e descorados em lavagens com solução 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mM bicarbonato de amônia até a remoção total do CBB. A digestão proteica foi realizada segundo metodologia descrita por Schevchenko [31]. Em seguida, os *spots* foram completamente desidratados com 100% (v/v) de ACN, reidratados e reduzidos com 20 mM DTT, mantidos à 56°C por 40
225 min. O sobrenadante foi descartado e os géis foram reidratados e alquilados com 55 mM IAA, no escuro, por 30 minutos à temperatura ambiente. Os *spots* foram novamente desidratados com 100% (v/v) de ACN e deixados em capela para completa remoção do solvente. A digestão proteica foi realizada com uma solução de tripsina 20 ng μ L em 25 mM de bicarbonato de amônio (AmBic). Os géis foram reidratados com a solução de
230 tripsina e as amostras foram incubadas por 12 horas à 37°C. A ação da tripsina foi interrompida com a adição da solução bloqueadora contendo 5% (v/v) ácido fórmico 96% em 50% (v/v) ACN. Os peptídeos foram eluídos do gel com 1% (v/v) ácido fórmico (96%) em 60% (v/v) metanol por 15 minutos à 40°C, duas vezes. Em seguida, em solução 1% (v/v) ácido fórmico (96%) em 50% (v/v) ACN por 15 minutos à 40°C,

235 duas vezes. E uma vez, em solução contendo 100% (v/v) ACN. Os sobrenadantes contendo os peptídeos foram coletados em todos os passos, transferidos para vials de vidro (Waters) e concentrados em concentrador a vácuo (Concentrator plus/5301, Eppendorf). As amostras foram ressuspensas em 10 µL de 0,1% ácido trifluoroacético e os peptídeos foram purificados e dessalinizados em micro colunas de fase reversa 240 (ZipTip C18, Millipore), conforme o protocolo do fabricante. As amostras foram então novamente concentradas a vácuo.

Espectrometria de Massas MALDI-TOF/TOF e Identificação Proteica

As amostras foram ressuspensas em 3 µL de 50% (v/v) ACN, 0.1% (v/v) TFA 245 em água ultrapura. Para aplicação na placa de MALDI foram utilizados 2 µL (1+1) e 1 µL de matrix (ácido α -ciano-4-hidrocinâmico em 50% (v/v) ACN:H₂O acrescido de 0,1% (v/v) TFA). As análises dos fragmentos peptídicos foi realizada por meio de espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo MALDI, no modo reflector positivo, no equipamento MALDI-TOF/TOF MS/MS (Matrix-Assisted Laser 250 Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometer, AB Sciex 5800). A análise foi realizada no modo automático, juntamente com calibração interna, utilizando CAL Mix1 (AB Sciex). Os espectros de massas foram obtidos em modo refletor positivo a 400 hz no modo MS e 1000 hz, no modo MS/MS. A voltagem da fonte de ionização foi de 5500 kvolts no modo MS e 5500 kvoltz no modo MS/MS, sendo 255 aplicado 1000 shots/spectro, no modo MS e 2500 shots/spectro, no modo MS/MS). O programa utilizado para obtenção dos resultados da espectrometria foi o AB Sciex MALDI TOF/TOF series Explorer 4.1.0 (AB Sciex).

A procura dos íons MS/MS foi realizada com sistema de pesquisa Mascot (Matrix Science) utilizando a taxonomia *Equus caballus* do banco de dados Uniprot

260 (29191 sequências). A tolerância de massa foi 0,5 Da para íons precursor e fragmentos. Os parâmetros de procura incluem tripsina como protease com permissão para a perda de 2 clivagens, carbamidometil cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Os resultados do Mascot foram submetidos ao programa Protein Pilot Software 4.0 (AB Sciex) para realizar as análises dos conjuntos de dados, 265 de forma a validar os peptídeos base MS/MS e identificação de proteínas.

Espectrometria de massas LC-ESI QTOF MS/MS (Análise Shotgun)

Digestão Proteica em Solução

Foi realizado um pool dos garanhões, de acordo com a fertilidade, nas amostras 270 de plasma seminal e membrana plasmática para evitar variabilidade individual de cada animal. Foram analisadas duas réplicas de cada amostra. A digestão proteica em solução foi realizada de acordo com protocolo de Villén & Gigy [32]. O total de 100 µg de PS e MP foi ressuspenso em uréia 8M (1:1), reduzidos em solução final de 5 mM DTT por 25 minutos a 56°C e alquilados em solução final de IAA 14 mM por 30 minutos à 275 temperatura ambiente protegido da luz. Em seguida, foi acrescida solução de DTT 5 mM final por 15 minutos a temperatura ambiente protegido da luz. As amostras foram então diluídas em 50 mM de AmBic (1:5) e adicionadas a solução de cloreto de cálcio 1 mM final. A tripsina foi diluída em 50 mM de Ambic, adicionada na proporção 1:50 (enzima:substrato) e incubada por 16 horas à 37°C. Para o bloqueio da ação enzimática 280 foi adicionado 0,4 % de ácido trifluoroacético (TFA) e verificado se o pH < 2,0. As amostras foram submetidas a centrifugação a 2500 × g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e procedeu-se a dessalinização dos peptídeos utilizando as colunas de fase reversa (SepPack C18, Waters Corporations), de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante.

285 *Sequenciamento Peptídico por LC-ESI QTOF MS/MS*

Para análises de espectrometria de massas do tipo ESI-QTOF foi utilizado o equipamento de espectrometria de massas do tipo electrospray (ESI) quadropolo, modelo MicrQ-TOF III (Bruker Daltonics), acoplado ao cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu, Kyoto). A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 µm). As condições de eluição foi otimizada em 290 gradiente linear de 0 a 85% do solvente B por 60 minutos, fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras foram mantidos a 25°C e 10°C, respectivamente. O volume de injeção dos compostos de referência e das amostras foi de 2 µL. O espectrômetro de massas atuou com 4,5 kV com temperatura de solvatação 295 de 180°C, modo positivo em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 1000 m/z, fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0.8 bar. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila 50% (v/v) e TFA 0,1% (v/v) e foram injetadas em fluxo constante de 0,3mL/min. Para as análises de MS/MS foi utilizada o gás nitrogênio como gás de colisão. A energia de colisão utilizada foi de 1 a 200 eV. O equipamento ESI-Q-ToF foi 300 calibrado no intervalo de massa/carga de 50 a 3000, utilizando calibrantes internos, sendo que a calibração externa foi realizada na presença de formiato de sódio.

A busca dos íons MS/MS foi realizada com sistema de pesquisa Mascot (Matrix Science) utilizando a taxonomia *Mammalia* do banco de dados NCBIInr_1.1 (863226 305 sequências). Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease com permissão para a perda de 1 clivagem; modificações fixas da cisteína (carbamidometilação) e modificações variáveis da metionina (oxidação); massa molecular monoisotópica; erro de tolerância de peptídeos (MS) $\pm 0,3$ Da e erro de tolerância (MS/MS) $\pm 0,5$ Da; protonação + 1. Os dados foram exportados e analisados pelo software Scaffold 4 (4.3.4, Proteome Software) para realizar as análises dos conjuntos de dados, de forma a validar

310 os peptídeos base MS/MS e identificação de proteínas.

Ontologia Gênica

Após identificação proteica com ProteinPilot, os dados da análise com MALDI foram inseridos no banco de dados UniprotKB (www.uniprot.org.br) e os resultados da
 315 análise *shotgun* foram submetidas para o software Scaffold 4 (4.3.4, Proteome Software) para obtenção da anotação da Ontologia Gênica em relação a distribuição celular e função molecular.

Análise Estatística

320 A análise estatística foi realizada com a utilização do programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os parâmetros seminais e intensidade dos *spots* no perfil protéico foram testados para normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram analisadas pelo teste *t* de Student (MP, VAP, VCL, RAP, MPLAI,
 325 MPIAL, DNA). Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (fertilidade, MT, LIN, MPAL, MPAL). O modelo de regressão linear foi utilizado para investigar associações da fertilidade com cada parâmetro de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, índice de fragmentação de DNA e volume relativo dos *spots* selecionados. O valor de $P < 0,05$ foi considerado
 330 significativo.

RESULTADOS

Fertilidade e Avaliação dos Parâmetros Seminais

A fertilidade dos garanhões férteis ($75,9\% \pm 8,4$) foi superior a dos subférteis
 335 ($31,4\% \pm 10,6$) ($P < 0,001$). Em relação à cinética espermática, os animais férteis

apresentaram maiores valores de MT, MP, LIN e Rap do que os animais subfêrteis (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças na avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal entre os garanhões férteis e subfêrteis, no entanto, o índice de fragmentação de DNA (DFI) foi superior ($P < 0,037$) em garanhões subfêrteis (Fig. 1).

Para a análise de regressão linear, as variáveis referentes aos parâmetros seminais avaliados dos garanhões férteis e subfêrteis foram agrupados. Foi observada uma associação positiva da fertilidade com a motilidade total ($R = 0,63$; $P = 0,004$), motilidade progressiva ($R = 0,80$; $P < 0,001$), linearidade ($R = 0,67$; $P = 0,002$) e espermatozoides rápidos ($R = 0,65$; $P = 0,003$). Não foi encontrada associação da fertilidade com a integridade da membrana plasmática e acrossomal e fragmentação do DNA.

TABELA 2. Parâmetros de cinética espermática de garanhões férteis e subfêrteis.

	Férteis	Subfêrteis	Valor de P
Motilidade total (%)	$82,4 \pm 4,5^*$	$54,6 \pm 22,0$	$< 0,001$
Motilidade progressiva (%)	$44,1 \pm 8,3^*$	$17,5 \pm 8,9$	$< 0,001$
Velocidade média de trajeto ($\mu\text{m/s}$)	$128,0 \pm 16,5$	$108,9 \pm 29,1$	0,092
Velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$)	$222,4 \pm 26,9$	$211,2 \pm 51,6$	0,556
Linearidade (%)	$47,0 \pm 4,7^*$	$38,8 \pm 3,6$	$< 0,001$
Espermatozoides rápidos (%)	$74,7 \pm 9,2^*$	$41,0 \pm 23,2$	0,002

*Indica diferença estatística na mesma coluna ($P < 0,05$).

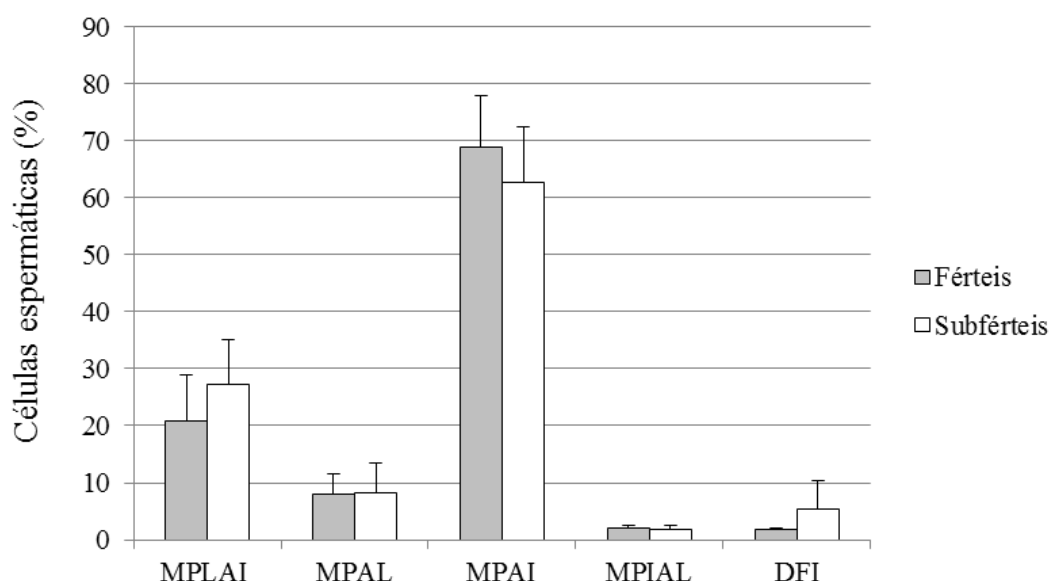


FIG. 1. Média e desvio padrão da quantidade (%) de células espermáticas com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida (MPLAI), membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida (MPAL), membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida (MPAI) e membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida (MPIAL) e índice de fragmentação de DNA (DFI) de espermatozoides de garanhões férteis e subférteis.

2D SDS PAGE e Identificação Proteica MALDI-TOF/TOF

Nas condições descritas neste estudo, foram detectados 56 *spots* principais nos géis de plasma seminal e 43 no extrato de membrana plasmática de garanhões férteis e subférteis. Todos os *spots* foram comuns entre os dois grupos analisados e foram utilizados para comparação do volume relativo.

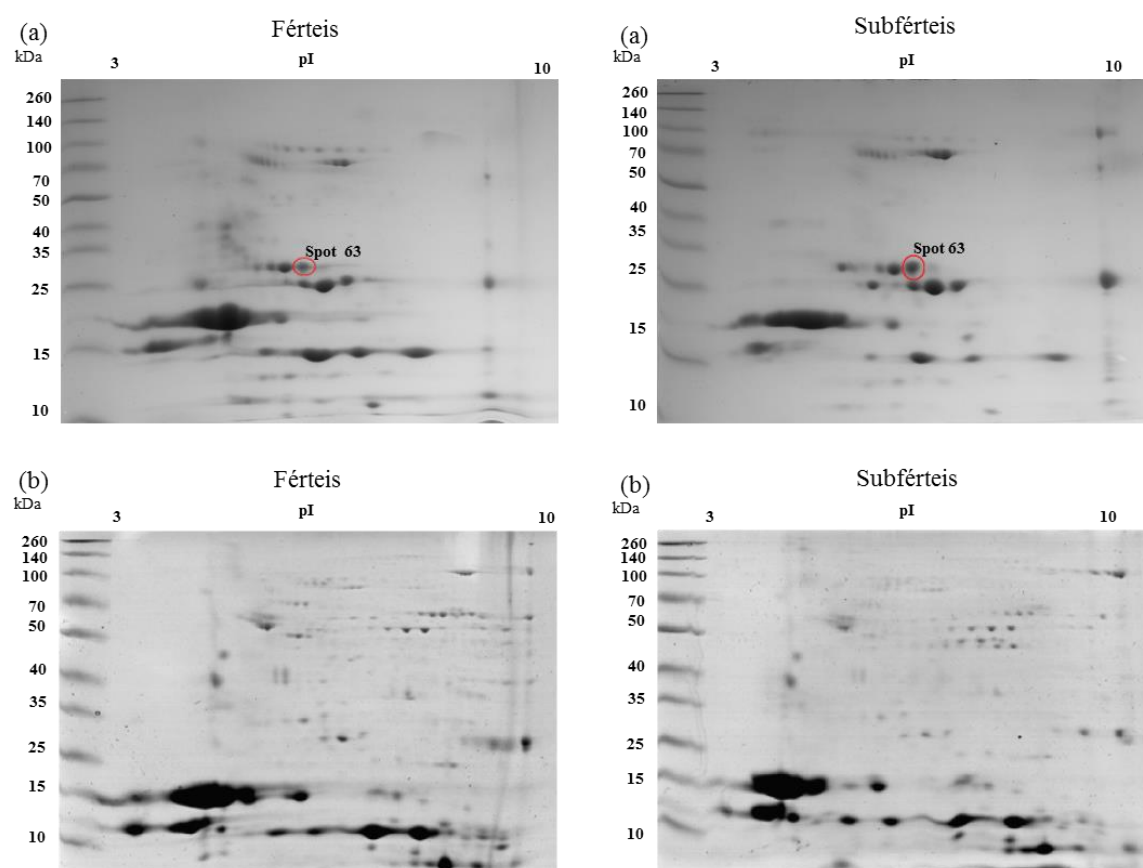
Não foi observada diferença estatística no volume relativo dos *spots* avaliados na membrana plasmática entre animais férteis e subférteis. No plasma seminal, o *spot* 63 do grupo de garanhões subférteis apresentou volume relativo ($2,76 \% \pm 1,15$) superior em comparação ao *spot* 63 de garanhões férteis ($1,85 \% \pm 0,69$) ($P < 0,04$). Os demais

spots não apresentaram diferenças significativas quanto a expressão (Fig. 2).

O spot 63 diferencial (28 kDa; pI 5,6) foi identificado como uma proteína não caracterizada referente ao gene *PEX12*. O número de acesso correspondente é F6UYN6_HORSE, cobertura de sequência de 21% e possui propriedades de ligação ao

375 íon zinco.

De acordo com a análise de regressão linear não foi observada associação significativa do volume relativo da proteína identificada com a fertilidade e os demais parâmetros espermáticos.



380 FIG. 2. Géis representativos de 2D SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal (a) e das proteínas extraídas da membrana plasmática de espermatozoides equinos (b). O círculo no gel (a) indica a proteína com expressão diferenciada no plasma seminal de garanhões férteis e subférteis.

Proteínas Identificadas em Garanhões Férteis e Subférteis (Análise Shotgun)

385 Na análise *shotgun* do plasma seminal, foram identificadas 66 proteínas em
garanhões férteis e 111 em garanhões subférteis. A análise de ontologia gênica
demonstrou que a maioria das proteínas tem origem de organelas intracelulares,
citoplasma e membrana. Grande parte das proteínas está envolvida em funções
moleculares relacionadas a ligação de moléculas e atividade catalítica (Fig. 3).

390 No extrato de membrana plasmática, foram identificadas 291 proteínas em
garanhões férteis e 193 em garanhões subférteis. Assim como no plasma seminal, a
maioria das proteínas classificadas tiveram origem de organelas intracelulares,
citoplasma e membrana e está envolvida em funções moleculares relacionadas,
395 especialmente a ligação de moléculas, mas também a atividade catalítica (Fig. 4).

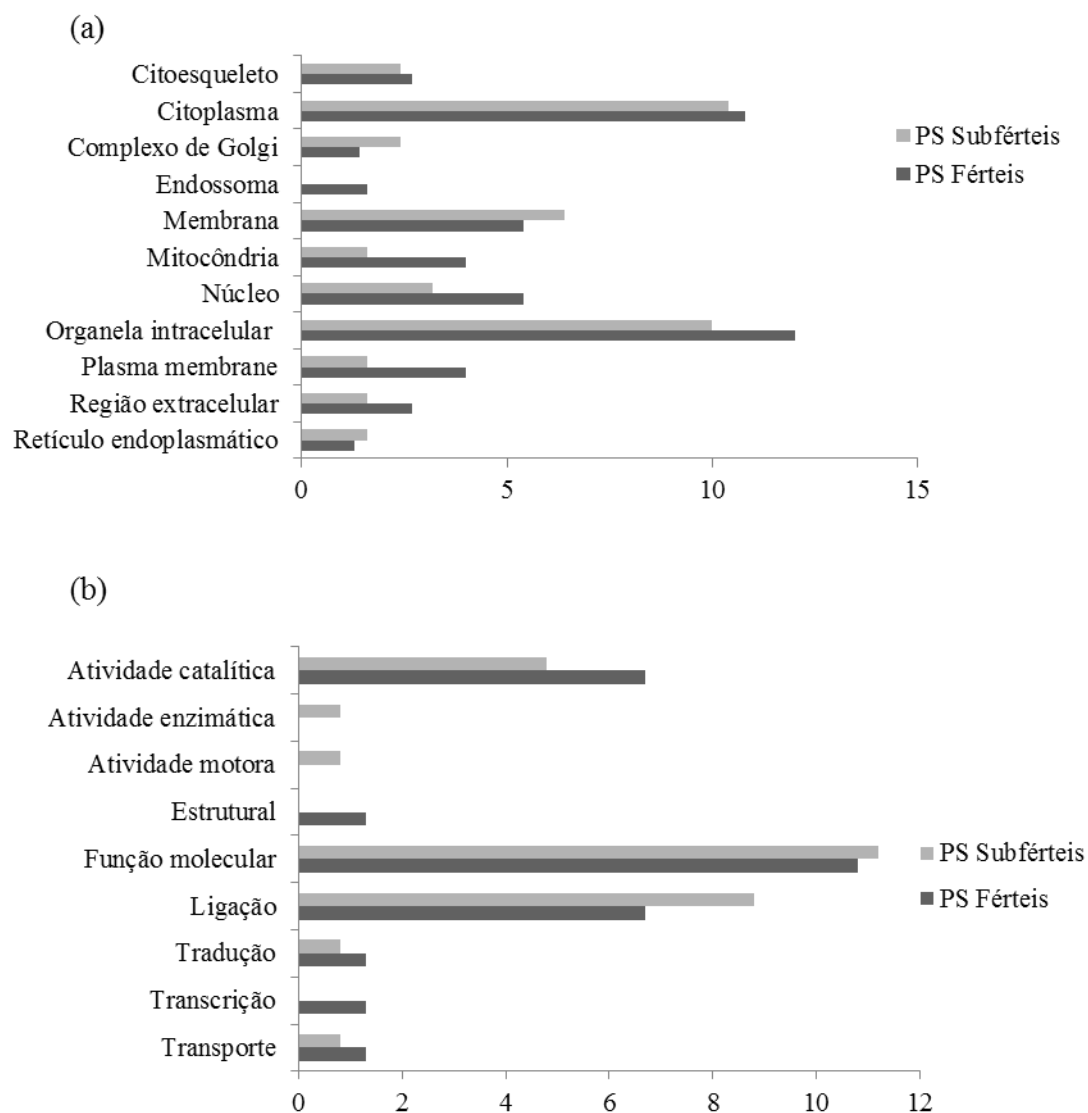


FIG. 3. Distribuição dos componentes celulares (a) e funções moleculares (b) das proteínas identificadas por LC-ESI QTOF no plasma seminal (PS) de garanhões férteis e subférteis.

Tanto no PS e na MP, cerca de 50% das proteínas foram classificadas como previstas, ou seja, os termos de ontologia gênica encontram-se indisponíveis.

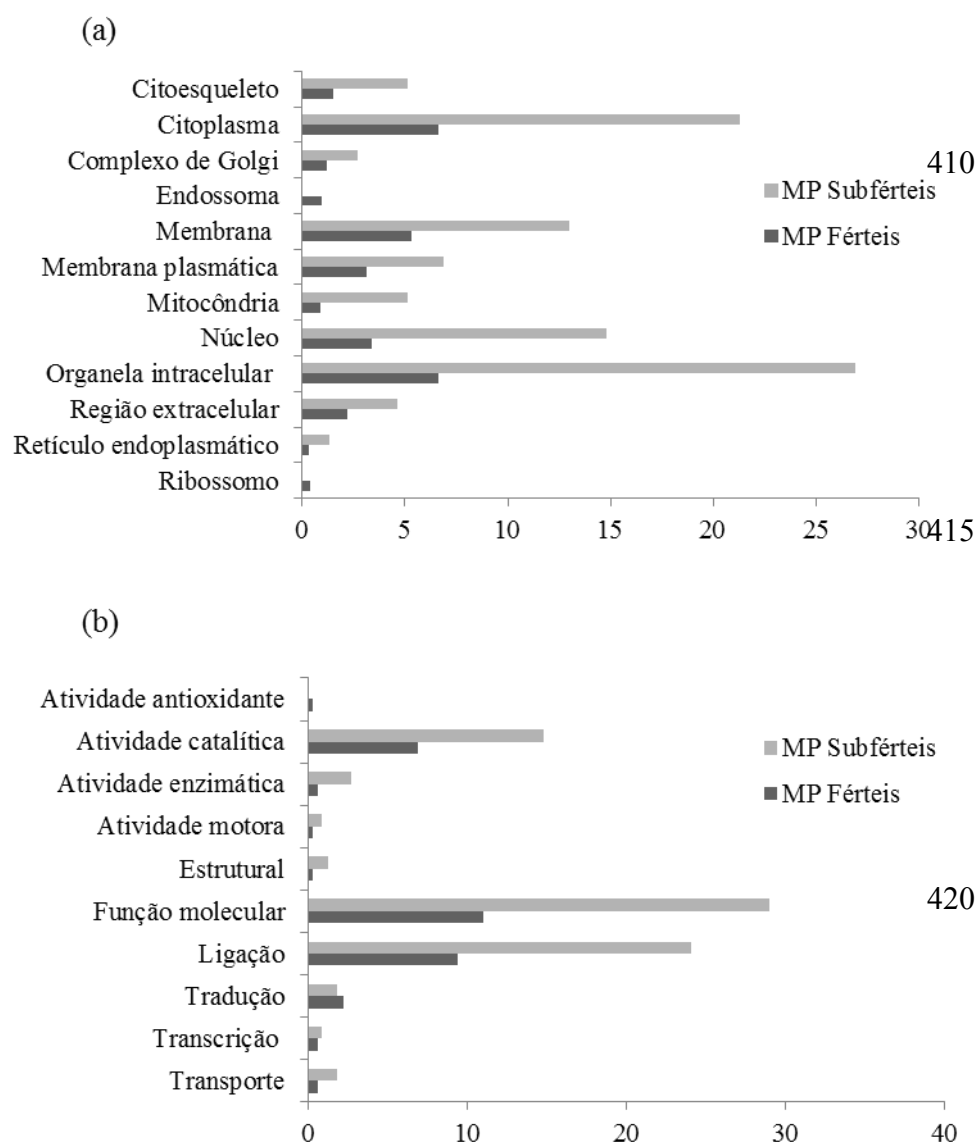


FIG. 4. Distribuição dos componentes celulares (a) e funções moleculares (b) das proteínas identificadas por LC-ESI QTOF no extrato de membrana plasmática (MP) de garanhões férteis e subférteis.

Comparação da Lista Proteica Entre os Dois Grupos de Fertilidade

Comparando os dois grupos no plasma seminal, foram encontradas 21 proteínas em comum, 53 somente no grupo de animais férteis e 103 somente no grupo de animais

de membrana de ganhões subfêrteis, foram igualmente encontradas proteínas relacionadas ao processo de fertilização como proteína da superfamília das imunoglobulinas (membro 3) e lactotransferina. As proteínas comuns aos grupos estão descritas na Tabela 4 e estão envolvidas, em sua maioria, em processos celulares e de desenvolvimento.

TABELA 3. Proteínas em comum do plasma seminal de ganhões férteis e subfêrteis identificadas por LC-ESI QTOF.

Proteína	Número de Acesso	Massa Molecular Teórica
39S ribosomal protein L47, mitochondrial isoform X2	gi 640777981	30 kDa
Coiled-coil domain-containing	gi 634852322	65 kDa
Collagen alpha-5(VI) chain	gi 641693475	287 kDa
Contactin associated protein-like 4, isoform CRA_a	gi 119616016	145 kDa
Dedicator of cytokinesis protein 10 isoform X1	gi 635061118	275 kDa
Fibrous sheath-interacting protein	gi 640814320	109 kDa
hCG1641825, isoform CRA_a	gi 119583781	6 kDa
hCG1642128	gi 119616423	16 kDa
hCG1649526, isoform CRA_a	gi 119583049	16 kDa
HemK methyltransferase family member 1, isoform CRA_a	gi 119585529	38 kDa
Kallikrein-1E2	gi 54036110	29 kDa
Mitochondrial inner membrane protein	gi 29427676	84 kDa
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	gi 641736698	420 kDa
RIO kinase 1	gi 119575614	66 kDa
Seminal plasma protein HSP-1	gi 664722410	17 kDa
SON DNA binding protein, isoform CRA_c	gi 119630221	264 kDa
Spermatogenesis-associated protein 21-like	gi 634834247	37 kDa
Titin, isoform CRA_a	gi 119631418	3881 kDa
Uncharacterized protein KIAA1683 homolog	gi 634861167	248 kDa
Unconventional myosin-Id	gi 122145769	116 kDa
Zinc finger protein 208-like	gi 641737732	114 kDa

A maioria das proteínas do plasma seminal comum aos dois grupos demonstrou atividades relacionadas a função molecular e propriedade de ligação.

470 TABELA 4. Proteínas em comum do extrato de membrana plasmática de garanhões férteis e subférteis identificadas por LC-ESI QTOF.

Proteína	Número de Acesso	Massa Molecular Teórica
A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9, isoform CRA_e	gi 119597270	454 kDa
Angiomotin, isoform CRA_a	gi 119623031	118 kDa
Calpain-8	gi 302393827	79 kDa
Centromere-associated protein E	gi 115648101	286 kDa
Coagulation factor X precursor	gi 189027044	52 kDa
Coiled-coil domain-containing protein 132	gi 81900484	111 kDa
Collagen alpha-1(XXVIII) chain	gi 167009138	117 kDa
Cordon-bleu protein-like 1	gi 118568014	132 kDa
Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor	gi 251823966	47 kDa
Cytoskeleton-associated protein 5	gi 223635094	226 kDa
DmX-like protein 1	gi 81911500	336 kDa
Filaggrin	gi 84028206	435 kDa
hCG19796, isoform CRA_c	gi 119581720	135 kDa
hCG2011852	gi 119629468	785 kDa
hCG2026048	gi 119625234	51 kDa
Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	gi 117949323	333 kDa
Homeobox B2	gi 114053055	33 kDa
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein-like 2	gi 121942822	58 kDa
LisH domain-containing protein ARMC9	gi 81904869	92 kDa
Lysine-specific demethylase 6B	gi 313104309	177 kDa
Microtubule-associated protein 6	gi 81863336	100 kDa
N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta	gi 90185244	144 kDa
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 9	gi 74762418	113 kDa
Nebulin isoform 3	gi 115527120	773 kDa
Neurofilament light polypeptide	gi 97536879	62 kDa
Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140kDa	gi 119625924	134 kDa
PREDICTED: HCLS1-binding protein 3	gi 291387150	44 kDa
PREDICTED: KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like protein	gi 291392155	107 kDa
PREDICTED: ribosomal RNA-processing protein 8	gi 291384499	51 kDa
Probable C-mannosyltransferase DPY19L2	gi 162416266	87 kDa
Probable RNA-binding protein 19	gi 73621449	106 kDa
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	gi 62900635	85 kDa
Profilin-1	gi 62288870	15 kDa
Prostaglandin reductase 1	gi 41688552	36 kDa
Protein FAM184A	gi 209572754	133 kDa
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D, isoform CRA_b	gi 119579123	186 kDa
Putative Polycomb group protein ASXL3	gi 182671626	244 kDa
Rho GTPase-activating protein 25	gi 238054314	73 kDa
Ribosomal protein S6 kinase alpha-6	gi 11133131	84 kDa
Steroid sulfatase, arylsulfatase C, isozyme S	gi 119619155	60 kDa

TABELA 4. (Continua)

TAR DNA-binding protein 43 isoform 2	gi 56682929	34 kDa
Testis-specific gene 10 protein	gi 81885028	81 kDa
Titin	gi 384872704	3816 kDa
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	gi 81874329	83 kDa
Tyrosine-protein kinase Lyn isoform A	gi 13540677	59 kDa
Uncharacterized protein C2orf71 homolog	gi 81885486	139 kDa
Uncharacterized protein KIAA1671	gi 81897247	35 kDa
Zinc finger protein 608	gi 81882411	162 kDa

DISCUSSÃO

Fertilidade dos Garanhões e Características Seminais

475 Este estudo examinou as possíveis associações entre a fertilidade e parâmetros
seminais. Nossos achados sobre a correlação da fertilidade com a motilidade total e
progressiva, linearidade e espermatozoides rápidos foram consistentes com relatos
anteriores. Love [33] relatou que a MT possui correlação positiva com a fertilidade de
garanhões. Kathiravan [34] reportaram uma correlação positiva entre a porcentagem de
480 fertilização *in vitro* e motilidade progressiva de espermatozoides bovinos. Qarawi [35]
encontraram correlação positiva entre a taxa de fertilidade de dromedários e MP e LIN.
Broekhuijse [36] revelaram efeitos positivos da MP sobre a taxa de parição de porcas e
da MT sobre o número de leitões paridos. Interessantemente, os mesmos dados que
demonstraram correlação com a fertilidade apresentaram valores superiores nos
485 garanhões férteis quando comparados com garanhões subférteis, sugerindo que os
parâmetros espermáticos de MT, MP, LIN e Rap, quando em maiores níveis,
possibilitam a chegada de maior número de espermatozoides no local de fertilização e
obtenção de maiores taxas de fertilidade.

Apesar de não ter sido encontrada correlação da fertilidade com a fragmentação
490 de DNA, a DFI foi superior em garanhões subférteis, conforme relatado por Kenney
[37] que também encontraram correlação negativa entre o escore de desnaturação e a

taxa de prenhez. Corroborando com nossos achados, Rodriguez-Martinez [38] afirmou que a fragmentação do DNA é consideravelmente frequente em espermatozoides de machos subfértéis. Tais alterações na estrutura da cromatina podem afetar a taxa de
495 descondensação, o que é um pré-requisito na formação do pronúcleo durante a fertilização, interrompendo o desenvolvimento embrionário [39] e acarretando em menores índices de concepção.

A integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides férteis e subférteis não diferiram entre si, sugerindo que neste estudo a subfertilidade dos
500 animais esteja relacionada à funcionalidade molecular da célula espermática e não a integridade estrutural da membrana plasmática.

Eletroforese Bidimensional e Identificação Proteica MALDI

Das 56 proteínas detectadas no plasma seminal apenas uma proteína demonstrou
505 expressão diferencial em garanhões subférteis. Novak [15] demonstraram correlação positiva da proteína CRISP3 com o índice de concepção de garanhões, no entanto, foram utilizados somente garanhões férteis com índices de 75 – 100 %, o que difere do presente estudo no qual dois grupos distintos de garanhões, com fertilidade abaixo de 40% e acima de 60%, foram comparados em relação ao volume relativo das principais
510 proteínas detectadas no plasma seminal e na membrana plasmática.

Neste estudo envolvendo eletroforese bidimensional e espectrometria de massas tandem, somente o *spot* com expressão diferencial seguiu para identificação proteica. Este *spot* diferencial foi identificado como uma proteína não caracterizada referente ao gene *PEX12* da taxonomia *Equus caballus*, a qual foi utilizada com intuito de fornecer a
515 função biológica específica da espécie, uma vez que a taxonomia *Mammalia* forneceu dados inconsistentes. De acordo com a ontologia gênica, a proteína possui função

molecular de ligação ao íon zinco (Zn), o qual está envolvido no desenvolvimento dos testículos e fisiologia espermática, como a motilidade espermática e reação acrossomal [40-42]. Além disso, possui atividade antioxidante, pois se liga aos ânions superóxidos produzidos pelos espermatozoides [43].

Esta proteína ligadora de Zn demonstrou maior expressão nos animais subférteis. Relatos demonstram que maior porcentagem de espermatozoides anormais está associada à redução da fertilidade em equinos [33,44]. As células morfologicamente anormais podem representar uma fonte de ânions superóxido que se ligam ao Zn presente no plasma seminal, promovendo o decréscimo de sua concentração no fluido reprodutivo [45]. Uma hipótese seria que a redução do Zn livre pode ter levado a maior expressão de proteínas ligantes de forma a tentar resgatar este íon e restaurar a função espermática. Adicionalmente, o zinco aumenta a estabilidade da bicamada lipídica da membrana celular [46,47], o que possivelmente contribuiu com a manutenção da integridade da MPA nos espermatozoides de garanhões subférteis. Apesar de todas as funções descritas não foi encontrada correlação desta proteína com a fertilidade.

Comparação integral do proteoma PS e MP de garanhões férteis e subférteis (LC-ESI QTOF MS/MS)

A utilização de abordagens proteômicas modernas permite a identificação de milhares de proteínas em amostras biológicas complexas [12], como o plasma seminal e a membrana plasmática. Ademais, a identificação integral destas amostras biológicas pode fornecer melhor entendimento da fisiologia da fertilidade masculina e possibilidade de identificação de marcadores de fertilidade com maior eficácia.

De acordo com as condições deste estudo, a identificação de um grande número de proteínas do plasma seminal e do extrato de membrana plasmática foi obtida com

êxito. No plasma seminal, uma quantidade superior de proteínas foi encontrada em
garanhões subfêrteis (111 proteínas) em relação aos animais com alta fertilidade (66
proteínas). Interessantemente, o número de proteínas identificado no extrato de
545 membrana plasmática dos animais subfêrteis (193 proteínas) foi inferior aos garanhões
fêrteis (291 proteínas). Druart [13] utilizando a abordagem proteômica *shotgun*,
identificaram 59 proteínas no plasma seminal equino, quantidade esta semelhante a
encontrada neste estudo em animais com alta fertilidade. Além disso, já foi
demonstrado que algumas proteínas do plasma seminal se aderem a membrana
550 plasmática durante a ejaculação [48,49]. Desta forma, é possível que no plasma seminal
dos garanhões subfêrteis as proteínas foram incapazes de se ligar a membrana
espermática, acarretando ao aumento considerável das formas proteicas neste fluido e
diminuição destas na composição da MP. Considerando que algumas proteínas do
plasma seminal estão relacionadas a fertilidade [14,15,23,50], a ausência da interação
555 destas com a MP pode ter alterado os índices de fertilidade dos animais do grupo
subfêrtil.

A análise de ontologia gênica demonstrou que as proteínas nos dois grupos de
fertilidade, tanto no PS quanto na MP, possuíam, em sua maioria, origem
citoplasmática. Uma hipótese para este fato é a presença de prostassomas e
560 epididimossomos no plasma seminal [51] bem como a presença de células somáticas
[52]. Os prostassomos e epididimossomos são vesículas membranosas ricas em
proteínas intracelulares liberadas pelo epitélio prostático e epididimário,
respectivamente, por processo de secreção apócrina [53]. Como não houve remoção
destas vesículas neste estudo, muitas destas proteínas intracelulares podem estar
565 presentes no plasma seminal, justificando os resultados obtidos. Já na membrana
espermática, o percentual de proteínas intracelulares foi 3,3 vezes maior em animais

subférteis, e possivelmente isto ocorreu por uma maior fragilidade das membranas plasmáticas de animais com baixa fertilidade frente ao processo de extração de proteínas de membrana, possibilitando a saída de componentes intracelulares.

570 Funcionalmente, a maioria das proteínas das duas amostras biológicas possuiu propriedade de ligação e função catalítica. No entanto, cerca de 50% das proteínas totais identificadas na MP foram classificadas como previstas, ou seja, não possuem termos de ontologia gênica. Muitas destas sequências previstas são baseadas no RNAm como indicado pelas anotações das sequências do banco de dados do NCBI. Os resultados
575 da análise *shotgun* no presente estudo proporciona embasamento adicional de que estas sequências previstas codificam proteínas autênticas.

Em relação às proteínas exclusivas, no plasma seminal de garanhões férteis foi encontrada a proteína associada à espermatogênese 31D1 (SPATA31D1) e nos dois grupos de fertilidade a SPATA21. Até o momento, não há estudos que relatam a função
580 destas proteínas na fertilidade de equinos, no entanto a SPATA1 possui associação positiva com a taxa de gestação por estro e pode servir como biomarcador de fertilidade nesta espécie [54]. Além disso, a proteína SPATA1 está envolvida na formação da cabeça espermática durante a espermatogênese de camundongos, e também é considerada um biomarcador de fertilidade de murinos [55]. Uma vez que tais proteínas
585 pertencem ao mesmo tipo proteico e apenas uma foi identificada exclusivamente no plasma seminal de garanhões férteis, sugere-se que esta possa ser um potencial marcador de fertilidade na espécie equina.

Proteínas associadas negativamente a fertilidade foram encontradas somente no plasma seminal de garanhões subférteis como a clusterina e o inibidor de acrosina. A
590 clusterina está envolvida na adesão e agregação celular [56], o que justifica a quantidade 2,6 vezes maior de proteínas identificadas com propriedade de ligação em animais de

baixa fertilidade. Adicionalmente, em bovinos, a clusterina está associada com espermatozoides morfológicamente anormais e foi sugerida como um marcador de baixa qualidade seminal [57]. Da mesma forma no presente estudo, os garanhões subfêrteis apresentaram parâmetros de cinética espermática (MP, MT, LIN, RAP) inferiores aos de garanhões férteis e maior porcentagem de defeitos maiores (dados não publicados). Ademais, Novak [15] encontraram associação negativa da clusterina do plasma seminal de garanhões com a fertilidade, o que corrobora com os nossos resultados, indicando que esta proteína pode ser um marcador de baixa qualidade seminal e fertilidade.

A identificação exclusiva da proteína inibidora de acrosina no plasma seminal de animais subfêrteis sugere a sua correlação com a fertilidade na espécie equina, já que a quantidade desta proteína no plasma seminal de bovinos foi associada negativamente com a taxa de retorno ao cio [58]. A acrosina espermática é uma enzima proteolítica localizada no acrossomo e promove a hidrólise da zona pelúcida de oócitos [59], sendo a sua inibição prejudicial para o processo de fertilização.

Platts [60] reportaram que a presença de RNAm das proteínas FAM83B e RAB35 em espermatozoides está associada a teratozoospermia em humanos, sendo uma das causas da infertilidade masculina. No presente estudo, foram encontradas as proteínas FAM83D, FAM81B e RAB41 exclusivamente no plasma seminal de garanhões subfêrteis, considerando que proteínas da mesma família podem ter estruturas distintas em espécies diferentes, tais macromoléculas identificadas podem exercer a mesma função daquela encontrada no plasma seminal de humanos.

Dentre os polipeptídeos encontrados nos animais de baixa e alta fertilidade destacam-se as proteínas SP-1 e *kallikrein-1E2*. Apesar de Novak [15] demonstrarem associação negativa destas proteínas com a fertilidade em equinos, Brandon [14]

identificaram homologia antigênica da SP-1 e a osteopontina bovina, que está associada com touros de maior fertilidade [50]. Uma vez que a abordagem *shotgun* neste estudo não quantificou as proteínas descritas e há controvérsias da real associação da SP-1 com a fertilidade, estudos mais aprofundados quanto a quantidade e o padrão de expressão possibilitarão determinar sua influência sobre o processo de fertilização.

Na membrana espermática do grupo de animais férteis, foi encontrado maior número de proteínas relacionadas ao processo de fertilização em comparação aos de baixa fertilidade, destacando-se também a SP-1. Além do que foi discutido anteriormente as SP-1 são homólogas as proteínas de ligação a heparina do plasma seminal bovino (BSP) [18], que se associam a membrana plasmática durante a ejaculação promovendo o efluxo de colesterol e fosfolipídeos, mediando o processo de capacitação espermática [49]. Em vista das funções relacionadas e os achados da maioria dos estudos, sugerimos que esta proteína atua positivamente sobre a fertilidade de equinos.

As *sperm motility kinase* (SMOK) são componentes da cascata de sinalização que regulam a função flagelar e parece mediar a motilidade espermática [61]. A ausência desta proteína no grupo de animais de baixa fertilidade indica que a cinética espermática pode ter sido afetada, justificando os valores inferiores de motilidade total e progressiva encontrados, o que implica a chegada de menos espermatozoides no local de fertilização e menores índices de fertilidade.

As proteínas receptores olfatórios (RO) e fosfolipase C estão envolvidas na maturação e interação entre os gametas [62,63], justificando a presença destas moléculas no extrato de MP de garanhões férteis. Adicionalmente, foi identificado o receptor de prostaglandina D (PGD2) neste mesmo grupo de animais. Em espermatozoides humanos, o receptor de PGE2 media a entrada de cálcio e a reação

acrossomal. Desta forma, tais proteínas identificadas no extrato da membrana espermática de animais com alta fertilidade podem ter exercido influência na maturação, capacitação espermática e interação entre os gametas, acarretando a maiores índices de concepção.

Em animais subfêrteis, o membro 3 da superfamília das imunoglobulinas (IgSF) foi identificado. Assim como a IgSF encontrada, a proteína IZUMO, também integrante da IgSF, está presente na membrana interna acrossomal do espermatozoide e exerce papel importante na fusão entre os gametas [64,65]. Considerando que a IZUMO não foi ainda identificada em equinos, a IgSF encontrada no extrato da membrana plasmática pode exercer alguma função relacionada a interação entre os gametas, sendo este o primeiro relato nesta espécie. Ainda, a proteína lactotransferrina encontrada foi correlacionada positivamente com a qualidade seminal de elefantes asiáticos [66], contudo a associação desta proteína com as características seminais necessita de outras investigações.

CONCLUSÃO

A utilização de dois grupos distintos de fertilidade possibilitou o melhor entendimento dos parâmetros correlacionados positivamente com a fertilidade. A utilização de diferentes abordagens proteômicas possibilitou a identificação de proteínas exclusivas relacionadas com animais de alto e baixo índice de concepção, como a proteínas ligadoras de zinco (produto do gene *PEX12*), SPATA21, clusterina, inibidor de acrosina, SP-1, SMOK, fosfolipase C, lactotransferrina e membro 3 da superfamília das imunoglobulinas e podem servir como biomarcadores de fertilidade de garanhões da raça Quarto de Milha. Os parâmetros de cinética espermática e identificação das

proteínas abordadas neste estudo, juntamente com exame andrológico adequado, podem fornecer informações a respeito da fertilidade do garanhão.

REFERÊNCIAS

1. Kumar P, Kumar D, Singh I. Seminal plasma proteome: promising biomarkers for bull fertility. *Agric Res* 2012; 1:78–86.
2. Baas JW, Molan PC, Shannon P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1983; 68:275-80.
3. Scheit KH, Shivaji S, Bhargava PM. Seminalplasmin, an Antimicrobial Protein from Bull Seminal Plasma, Inhibits Growth, and Synthesis of Nucleic Acids and Proteins in *S. cerevisiae*. *J Biochem* 1985; 97: 463-471.
4. Gwathmey TM, Igotz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2006; 75:501-7.
5. Clark DA. Seminal advances in immunology of reproduction. *Biol Reprod* 2011; 85:224-227.
6. Troedsson MHT, Desvouses AS, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:171-186.
7. Doty A, Buhi WC, Benson S, Scoggin KE, Pozor M, Macpherson M, Mutz M, Troedsson MHT. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biol Reprod* 2011; 85: 157-164.
8. Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:159-70.
9. Herwig R, Knoll C, Planyavsky M, Pourbiabany A, Greilberger J, Bennett KL. Proteomic analysis of seminal plasma from infertile patients with oligoasthenoteratozoospermia due to oxidative stress and comparison with fertile volunteers. *Fertil Steril* 2013; 100:355-366.
10. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol* 2006; 7:40.
11. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP, Jarvi KA. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res* 2011; 10:941–53.
12. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, Castagnola M, Marana R. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril* 2012; 97: 67-73.
13. Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, de Graaf SP. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal

- plasma. *J Proteomics* 2013; 91: 13-22.
14. Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB & Fayrer-Hosken RA. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Therio* 1999; 52: 863-873.
 15. Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Therio* 2010; 74: 956–967.
 16. Reinert M, Calvete J, Sanz L, Maan K, Topfer-Petersen E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* 1996; 242:636-640.
 17. Greube A, Muller K, Topfer-Petersen E, Herrmann A, Muller P. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: the stallion seminal plasma protein SP-1/2. *Biochemistry* 2004; 43:464-472.
 18. Ekhlas-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 45-57.
 19. Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, Leeb T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet* 2007; 38: 259-264.
 20. Macpherson ML, Simmen RCM, Simmen FA, Hernandez J, Sheerin BR, Varner DD, et al. Insulin-like growth factor-i and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. *Biol Reprod* 2002; 67: 648-654.
 21. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434: 234-238.
 22. Hung PH, Suarez SS. Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 2012; 87:88.
 23. Gamboa S, Ramalho-Santos J. Snare proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Therio* 2005; 64: 275–291.
 24. Fayer-Hosken RA, Caudle AB, Shur BD. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 74-78.
 25. Meyers SA. Equine sperm–oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod Sci* 2001; 68: 291-303.
 26. Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in defined culture medium. *Biol Reprod* 1983; 28: 235-247.
 27. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
 28. Rajeev SK, Reddy KVR. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod* 2004; 19:234-242.
 29. Baker SS, Cardullo RA, Thaler CD. Sonication of mouse sperm membranes reveals

- distinct protein domains. *Biol Reprod* 2002; 66:57-64.
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685
 31. Schevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; 1: 2856 - 2860.
 32. Villén J, Gygi SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2008; 3: 1630–1638.
 33. Love CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Therio* 2001; 76: 547–557.
 34. Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 9-17.
 35. Al-Qarawi AA, Abdel-Rahman HA, El-Mougy SA, El-Belely MS. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. *Anim Reprod Sci* 2002; 74: 1-9.
 36. Broekhuijse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci* 2012; 90: 779-789.
 37. Kenney RM, Evenson DP, Garcia MC, Love CC. Relationships between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate. *Biol Reprod Mono* 1995; 1: 647-653.
 38. Rodríguez-Martínez H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod* 2013; 10: 148-159.
 39. Perreault SD, Naish SJ, Zirkin BR. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol Reprod* 1987; 36: 239-244.
 40. Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*. 1994; 50:626–640.
 41. Henkel R, Bittner J, Weber R, Huther F, Miska W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril* 1999; 71: 1138–1143.
 42. Riffo M, Leiva S, Astudillo J. Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int J Androl* 1992; 15: 229-37.
 43. Gavella M, Lipovac V. In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. *Andrologia* 1998; 30: 317–323.
 44. Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 389-393.
 45. Chia S, Ong C, Chua L, Ho L, Tay S. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl* 2000; 21:53–57.
 46. Silverstroni L, Menditto A, Modesti A, Scarpa S. Zinc uptake in human seminal spermatozoa: characterization and effects on cell membranes. *Arch Androl* 1989; 23:

97–103.

47. Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma - isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. *Acta Biochim Pol* 2011; 58: 171-7.
48. Russell LD, Peterson RN, Hunt W, Strack LE. Post-testicular surface modifications and contributions of reproductive tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 1984; 30:959-978.
49. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immun* 2002; 53:109-119.
50. Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1993; 49:1202-1207.
51. Arienti G, Carlini E, De Cosmo AM, Di Profio P, Palmerini CA. Prostate-like particles in stallion semen. *Biol Reprod* 1998; 59:309-313.
52. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins J N, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:311–326.
53. Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 2008; 107:237-48.
54. Giesecke K, Hamann H, Stock KF, Woehlke A, Sieme H, Distl O. Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. *Anim Genet* 2008; 40:359-65.
55. L'Hôte D, Serres C, Laissue P, Oulmouden A, Rogel-Gaillard C, Montagutelli X, Vaiman D. Centimorgan-range onestep mapping of fertility traits using interspecific recombinant congenic mice. *Genetics* 2007; 176:1907–21.
56. Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983; 258:7714-20.
57. Ibrahim NM, Foster DN, Crabo BG. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *J Androl* 2001; 22:891-902.
58. Erkens JHF, J. H. G. Daas JHG. Seminal plasma acrosin inhibitor busi-i content is correlated to bull fertility. *Reprod Dom Anim* 1994; 29:387–395.
59. Cui YH, Zhao RL, Wang Q, Zhang ZY. Determination of sperm acrosin activity for evaluation of male fertility. *Asian J Androl* 2000; 2:229-32.
60. Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY, Quintana S, Diamond MP, Strader LF, Krawetz SA. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007; 16:763-73.
61. Herrmann BG, Koschorz B, Wertz K, McLaughlin KJ, Kispert A. A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance. *Nature* 1999; 402:141-6.
62. Vanderhaeghen P, Schurmans S, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and

- chromosomal mapping of olfactory receptor genes expressed in the male germ line: evidence for their wide distribution in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:283–7.
63. Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC. *Reproduction* 2004; 127:431-439.
64. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434:234-238.
65. Gupta SK, Bansal P. Vaccines for immunological control of fertility. *Reprod Med Biol* 2010; 9:61-71.
66. Kiso WK, Selvaraj V, Nagashima J, Asano A, Brown JL, Schmitt D, Leszyk J, Travis AJ, Pukazhenthir BS. Lactotransferrin in Asian Elephant (*Elephas maximus*) seminal plasma correlates with semen quality. *PLOS one* 2013; 8; 1-11.

Arquivo suplementar 1: Proteínas identificadas no plasma seminal de garanhões férteis.

Proteínas	Número de Acesso	Massa Molecular Teórica	Cobertura de Sequência
Aminomethyltransferase, mitochondrial	gi 11132475	44 kDa	2,73%
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	gi 1174470	81 kDa	1,70%
FERM domain-containing protein 6.	gi 34098515	72 kDa	2,57%
hCG1793600, isoform CRA_a, partial	gi 119606994	27 kDa	13,00%
hCG1999621, partial	gi 119585288	12 kDa	12,30%
hCG2032628, partial	gi 119587905	19 kDa	6,42%
hCG2040720, partial	gi 119598727	8 kDa	17,80%
hCG2045706	gi 119622608	6 kDa	27,50%
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	gi 1172047	56 kDa	2,22%
Metal transporter CNM1	gi 157412265	104 kDa	1,58%
Multidrug resistance protein 1B	gi 126927 (+12)	141 kDa	1,02%
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C	gi 219842199	18 kDa	5,49%
Period circadian protein homolog 1	gi 118572686	136 kDa	0,93%
PREDICTED: ataxin-10 isoform X1	gi 655897275	53 kDa	2,53%
PREDICTED: calpain-15	gi 641731196	117 kDa	0,74%
PREDICTED: cdc42 effector protein 4	gi 640797344	34 kDa	3,43%
PREDICTED: cell death activator CIDE-A, partial	gi 635100330	42 kDa	2,62%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 39	gi 640819842	110 kDa	1,06%
PREDICTED: dynein heavy chain 9, axonemal	gi 634868312	514 kDa	0,20%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRIM17-like	gi 664751775	54 kDa	2,32%
PREDICTED: FERM and PDZ domain-containing protein 3	gi 655877256	188 kDa	0,70%

Arquivo suplementar 1 (Continua)

PREDICTED: hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial isoform	gi 641714027	35 kDa	3,37%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: A disintegrin and metalloproteinase	gi 640805014	114 kDa	1,24%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: age-related maculopathy	gi 635057063	18 kDa	5,42%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: EVI5-like protein	gi 655887699	95 kDa	1,69%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: myosin-6	gi 655864030	190 kDa	0,92%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative zinc finger protein 852	gi 655833526	61 kDa	1,85%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serotransferrin-like	gi 664708399	110 kDa	1,69%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: unconventional myosin-XV	gi 664746629	373 kDa	0,39%
PREDICTED: MAP7 domain-containing protein 1 isoform X1	gi 634867141	94 kDa	2,00%
PREDICTED: myotubularin-related protein 4 isoform X1	gi 664708292	135 kDa	0,91%
PREDICTED: NLR family member X1	gi 634835883	108 kDa	0,82%
PREDICTED: phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	gi 640800728	257 kDa	0,52%
PREDICTED: probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial isoform X1	gi 664757668	102 kDa	1,22%
PREDICTED: protein CREG2	gi 634829034	32 kDa	2,76%
PREDICTED: protein PTHB1 isoform X2	gi 641692393	98 kDa	1,93%
PREDICTED: protein Shroom3	gi 655857636	212 kDa	0,61%
PREDICTED: spermatogenesis-associated protein 31D1-like	gi 640795915	147 kDa	0,76%
PREDICTED: T-cell surface antigen CD2	gi 641712466	39 kDa	3,15%
PREDICTED: translational activator of cytochrome c oxidase 1	gi 640793147	26 kDa	6,28%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100353975	gi 655883689	384 kDa	0,52%
PREDICTED: XIAP-associated factor 1 isoform X3	gi 664721080	19 kDa	5,81%
PREDICTED: zinc finger protein 256-like	gi 641737163	63 kDa	2,19%
PREDICTED: zinc finger protein 260-like isoform X3	gi 291410057	82 kDa	1,68%
PREDICTED: zinc finger protein 717-like isoform X1	gi 655894793	73 kDa	1,43%
Protein FAM13C	gi 341940679	67 kDa	1,83%

Arquivo suplementar 1 *(Continua)*

Protein FAM71B	gi 544584807	69 kDa	2,56%
Protocadherin-16 precursor	gi 242397490	346 kDa	0,40%
Similar to RIKEN cDNA 8030451K01, isoform CRA_a	gi 119629017	16 kDa	8,67%
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	gi 17367415	271 kDa	0,54%
T-box transcription factor TBX1	gi 84028272	52 kDa	3,34%
Tuberous sclerosis 1	gi 119608427	130 kDa	0,86%
Uncharacterized protein C1orf226	gi 189040660	29 kDa	3,31%

Arquivo suplementar 2: Proteínas identificadas no plasma seminal de garanhões subférteis.

Proteínas	Número de Acesso	Massa Molecular Teórica	Cobertura de Sequência
Apolipoprotein L5	gi 17433287	47 kDa	3,00%
Atlastin-1	gi 115502455	64 kDa	1,61%
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2, isoform CRA_a	gi 119608737	220 kDa	1,26%
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1	gi 133922603	56 kDa	3,76%
CGI-115 protein	gi 119613735	31 kDa	6,03%
Chromosome 1 open reading frame 33, isoform CRA_a	gi 119615279	28 kDa	10,00%
Chromosome 10 open reading frame 79, isoform CRA_a	gi 119569990	106 kDa	1,28%
Chromosome 14 open reading frame 172, isoform CRA_a, partial	gi 119602229	21 kDa	5,08%
Copper-transporting ATPase 1	gi 12229551	162 kDa	1,01%
CP110 protein, isoform CRA_a	gi 119570672	111 kDa	1,31%
CST complex subunit STN1	gi 292630944	42 kDa	4,09%
Diacylglycerol kinase delta	gi 116241328	135 kDa	0,66%
Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	gi 81881649	35 kDa	3,42%
Fibrillin-1 precursor	gi 118197277	312 kDa	0,63%
hCG1732230, partial	gi 119592679	34 kDa	6,07%
hCG1736453, partial	gi 119600550	102 kDa	1,12%
hCG1797565, isoform CRA_a	gi 119623182	113 kDa	1,67%
hCG21296, isoform CRA_c	gi 119626686	237 kDa	1,24%
Importin-4	gi 41688588	119 kDa	1,02%
Integrin, alpha L	gi 119572628	119 kDa	1,84%
Keratin, type I cytoskeletal 42	gi 154090941	50 kDa	5,53%
KIAA0971, isoform CRA_b	gi 119590801	81 kDa	1,83%
Leprecan-like 2, isoform CRA_a	gi 119609137	82 kDa	2,58%
Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2 homolog	gi 123791330	147 kDa	2,37%
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10	gi 119577341	104 kDa	1,57%
Myocilin	gi 75040042	55 kDa	4,08%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

N-acetyltransferase 10	gi 81878475	115 kDa	2,25%
NADH dehydrogenase subunit 4	gi 608788162	52 kDa	5,88%
Nephronophthisis 1, isoform CRA_a	gi 119571016	83 kDa	1,78%
Neurofibromin 2, isoform CRA_a	gi 119580218	70 kDa	1,68%
Nuclear receptor co-repressor 1, isoform CRA_a	gi 119624897	270 kDa	1,31%
O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	gi 119625690	103 kDa	2,17%
Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	gi 162138894	58 kDa	4,72%
PREDICTED: 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial	gi 635085756	49 kDa	2,61%
PREDICTED: acrosin inhibitor 1-like	gi 664764280	9 kDa	16,90%
PREDICTED: AF4/FMR2 family member 2	gi 640800954	98 kDa	1,69%
PREDICTED: amphoterin-induced protein 1	gi 641712280	54 kDa	3,06%
PREDICTED: anaphase-promoting complex subunit 1	gi 641735258	216 kDa	1,90%
PREDICTED: ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 1	gi 634861137	65 kDa	3,13%
PREDICTED: apolipoprotein L3-like, partial	gi 641738401	35 kDa	5,81%
PREDICTED: basic proline-rich protein-like	gi 634841502	70 kDa	4,92%
PREDICTED: bridging integrator 2 isoform X1	gi 664707699	54 kDa	5,68%
PREDICTED: calpain-11 isoform X1	gi 664762818	95 kDa	1,54%
PREDICTED: ceruloplasmin-like	gi 641733586	119 kDa	2,50%
PREDICTED: chromosome-associated kinesin KIF4A isoform X1	gi 291407643	140 kDa	1,38%
PREDICTED: CLOCK-interacting pacemaker	gi 640776705	43 kDa	3,76%
PREDICTED: clusterin	gi 664720953	52 kDa	4,68%
PREDICTED: coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog B	gi 664759159	28 kDa	7,38%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 34, partial	gi 664701965	38 kDa	6,36%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 57-like	gi 635093908	38 kDa	3,73%
PREDICTED: contactin-6 isoform X1	gi 655879492	112 kDa	1,17%
PREDICTED: cytoskeleton-associated protein 2	gi 291409003	77 kDa	3,50%
PREDICTED: diacylglycerol kinase kappa	gi 655885772	137 kDa	0,98%
PREDICTED: dnaJ homolog subfamily C member 14 isoform X1	gi 640811190	79 kDa	3,98%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase MARCH7 isoform X2	gi 664709923	78 kDa	2,13%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	gi 640776809	173 kDa	1,13%
PREDICTED: extended synaptotagmin-3	gi 641693367	99 kDa	2,71%
PREDICTED: GLTSCR1-like protein	gi 640815181	112 kDa	2,19%
PREDICTED: glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 2	gi 291402270	55 kDa	3,93%
PREDICTED: granzyme M	gi 641718939	28 kDa	4,20%
PREDICTED: interferon-induced protein 44	gi 634863991	50 kDa	2,49%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: amiloride-sensitive sodium channel	gi 641722409	77 kDa	1,76%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK	gi 655602402	156 kDa	1,07%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: BH3-like motif-containing cell	gi 664755221	11 kDa	8,82%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nitric oxide synthase, inducible	gi 291405518	130 kDa	2,35%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: programmed cell death protein 6	gi 640830907	21 kDa	13,00%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein	gi 640791203	65 kDa	4,15%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 19	gi 664724887	40 kDa	4,05%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 256-like	gi 664776431	64 kDa	3,53%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 677-like	gi 664700497	87 kDa	1,47%
PREDICTED: malignant T-cell-amplified sequence 1-like	gi 291388758	20 kDa	9,39%
PREDICTED: melanoma-associated antigen E2	gi 664772291	60 kDa	2,68%
PREDICTED: myelin P2 protein	gi 635048880	15 kDa	9,09%
PREDICTED: neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3 isoform	gi 635134084	57 kDa	2,40%
PREDICTED: paladin	gi 655867218	99 kDa	2,15%
PREDICTED: polycystic kidney disease 2-like 2 protein	gi 641692197	72 kDa	2,15%
PREDICTED: probable phospholipid-transporting ATPase IM	gi 641705258	135 kDa	1,52%
PREDICTED: prostamide/prostaglandin F synthase isoform X2	gi 635112315	23 kDa	6,91%
PREDICTED: protein dispatched homolog 1 isoform X1	gi 291402341	171 kDa	1,11%
PREDICTED: protein SIX6OS1	gi 641697511	68 kDa	1,72%
PREDICTED: protein TALPID3 isoform X1	gi 640797483	171 kDa	1,80%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: protein-tyrosine kinase 6 isoform X1	gi 641730227	51 kDa	2,67%
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase haspin, partial	gi 664744235	80 kDa	1,93%
PREDICTED: signal-regulatory protein beta-1 isoform 3-like isoform	gi 664769155	44 kDa	2,20%
PREDICTED: solute carrier organic anion transporter family member	gi 634822348	71 kDa	3,73%
PREDICTED: transcription elongation factor A protein 3	gi 641714265	39 kDa	4,29%
PREDICTED: transmembrane 7 superfamily member 3 isoform X1	gi 635064241	64 kDa	2,81%
PREDICTED: ubiquitin-protein ligase E3B	gi 291413950	123 kDa	0,84%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103247157	gi 635147173	27 kDa	7,26%
PREDICTED: UPF0565 protein C2orf69 homolog	gi 641711100	43 kDa	2,62%
PREDICTED: VEGF coregulated chemokine 1	gi 635039389	14 kDa	10,90%
PREDICTED: zinc finger protein 154-like	gi 641727333	69 kDa	3,64%
PREDICTED: zinc finger protein 496	gi 291413915	61 kDa	1,85%
PREDICTED: zinc transporter ZIP9 isoform X1	gi 634852262	32 kDa	7,49%
Protein FAM81B	gi 296439348	52 kDa	5,97%
Protein FAM83D	gi 25452903	64 kDa	4,62%
RAB41, member RAS homolog family	gi 119625752	25 kDa	9,01%
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	gi 3183542	106 kDa	0,92%
Recombination activating protein 1, partial	gi 646161004	41 kDa	5,88%
Rho GTPase-activating protein 15	gi 166977444	54 kDa	6,37%
Tetraspanin-8	gi 116589	26 kDa	13,10%
UDP-Gal	gi 119599981	40 kDa	3,78%
UPF0501 protein KIAA1430	gi 160395565	61 kDa	2,22%

Arquivo suplementar 3: Proteínas identificadas do extrato de membrana plasmática de espermatozoides de garanhões férteis .

Proteína	Número de Acesso	Massa Molecular Teórica	Cobertura de Sequência
Adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2	gi 119570618	21 kDa	4,39%
Adenylate cyclase 4, isoform CRA_c	gi 119586429	16 kDa	6,16%
Anaphase-promoting complex subunit 2	gi 341940216	95 kDa	2,75%
AP-1 complex subunit beta-1	gi 341940229	104 kDa	2,97%
ATG7 autophagy related 7 homolog, isoform CRA_a	gi 119584497	78 kDa	1,99%
bicaudal D homolog 1, isoform CRA_a	gi 119608938	100 kDa	1,60%
Bile salt export pump	gi 12585136	146 kDa	1,14%
Bone morphogenetic protein receptor type-2	gi 10719913	115 kDa	2,41%
CD48 antigen	gi 114873	28 kDa	6,67%
Chromosome 16 open reading frame 24	gi 119606152	25 kDa	7,23%
Chromosome 8 open reading frame 44, isoform CRA_a	gi 119607323	18 kDa	15,70%
Coiled-coil domain-containing protein 4	gi 327478588	58 kDa	2,25%
Complement component C8 beta chain	gi 61211636	66 kDa	2,21%
COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein	gi 119614955	18 kDa	5,19%
D site of albumin promoter binding protein, isoform	gi 119572757	21 kDa	4,95%
Deltex homolog 2	gi 525343981	62 kDa	2,26%
Deoxyribonuclease I-like 3, isoform CRA_a	gi 119585762	36 kDa	7,21%
Dxtra spindle poles like 1, isoform CRA_a	gi 119617087	233 kDa	0,85%
Glucose-6-phosphate translocase	gi 51592076	46 kDa	7,69%
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A precursor	gi 140971205	165 kDa	2,12%
Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase, isoform CRA_b	gi 119613716	172 kDa	0,99%
Glyceronephosphate O-acyltransferase	gi 119590359	77 kDa	3,97%
G-protein signalling modulator 1	gi 119608624	59 kDa	2,81%
hCG1641134, isoform CRA_a	gi 119569349	38 kDa	3,86%
hCG1981156, isoform CRA_a	gi 119582799	12 kDa	9,35%
hCG2019100, isoform CRA_a	gi 119596293	19 kDa	11,20%
hCG2036582, isoform CRA_b	gi 119627501	366 kDa	0,60%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

hCG2038714, partial	gi 119617686	17 kDa	4,94%
hCG41091, isoform CRA_a	gi 119580153	182 kDa	1,37%
Hect domain and RLD 6, isoform CRA_b	gi 119626424	116 kDa	1,07%
Heparan sulfate proteoglycan 2, isoform CRA_a	gi 119615400	381 kDa	0,25%
Histocompatibility minor 13	gi 157823209	40 kDa	4,12%
Homeobox D1	gi 119631485	34 kDa	5,18%
Immunoglobulin heavy chain variable region, partial	gi 630868442	12 kDa	10,10%
Immunoglobulin light chain variable region, partial	gi 662565264	12 kDa	23,40%
Inhibin alpha chain	gi 124273	39 kDa	2,50%
Interferon-inducible GTPase 5	gi 122138669	51 kDa	5,81%
Interleukin-17B	gi 20143876	20 kDa	14,40%
Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1	gi 119589802	36 kDa	6,65%
KIAA1529, isoform CRA_a	gi 119579244	191 kDa	0,91%
Kinesin family member 4A, isoform CRA_a	gi 119625746 (+11)	140 kDa	0,89%
LAG1 longevity assurance homolog 2, isoform CRA_a	gi 119573882	45 kDa	5,26%
Laminin subunit alpha-1 precursor	gi 117168301	338 kDa	0,88%
LIM domain 7, isoform CRA_a	gi 119600955 (+24)	155 kDa	0,88%
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	gi 48427849	92 kDa	2,04%
MAX gene-associated protein	gi 527504082	332 kDa	0,40%
MDAC1	gi 119592778	19 kDa	9,60%
Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	gi 544584757	31 kDa	7,17%
Methyltransferase-like protein 6	gi 81910851	33 kDa	6,62%
Mitogen-activated protein kinase 13	gi 12644541	42 kDa	5,48%
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2, isoform CRA_b	gi 119613699	38 kDa	2,69%
mutL homolog 3 (, isoform CRA_a	gi 119601617	163 kDa	0,97%
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	gi 115502490	24 kDa	10,50%
NADH dehydrogenase subunit 5 (mitochondrion)	gi 608788079	68 kDa	4,64%
Nitric oxide synthase 3	gi 119574454	133 kDa	1,08%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

Non-specific lipid-transfer protein	gi 54036166	59 kDa	3,66%
Nuclear distribution gene C homolog	gi 119628185 (+11)	38 kDa	4,23%
Nuclear transcription factor, X-box binding 1, isoform CRA_a	gi 119578911	125 kDa	2,40%
Omega-amidase NIT2;	gi 122143922	31 kDa	10,50%
Peroxiredoxin-6	gi 5902791	25 kDa	7,59%
Phospholipase C-beta-2	gi 158513398	135 kDa	0,93%
PREDICTED: 1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase isoform X1	gi 634821682	238 kDa	0,95%
PREDICTED: 40S ribosomal protein S10	gi 664742702	18 kDa	11,90%
PREDICTED: acyl-coenzyme A thioesterase THEM5	gi 641712534	27 kDa	4,92%
PREDICTED: ADP-ribose pyrophosphatase, mitochondrial	gi 634878583	30 kDa	6,30%
PREDICTED: afadin	gi 664699290	192 kDa	1,35%
PREDICTED: alpha-(1,3)-fucosyltransferase 10	gi 291386086	56 kDa	1,87%
PREDICTED: alpha-2-macroglobulin	gi 634838029	168 kDa	0,73%
PREDICTED: amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]	gi 640781598	86 kDa	1,46%
PREDICTED: anoctamin-6	gi 641700513	108 kDa	3,01%
PREDICTED: arf-GAP with dual PH domain-containing protein 2	gi 641713456	36 kDa	5,57%
PREDICTED: arylacetamide deacetylase-like	gi 634846297	46 kDa	4,76%
PREDICTED: ATP synthase subunit s-like protein isoform X1	gi 635039195	30 kDa	5,34%
PREDICTED: ATP-binding cassette sub-family B member 10	gi 634841722	92 kDa	1,97%
PREDICTED: basic proline-rich protein-like	gi 664700640	24 kDa	6,55%
PREDICTED: beta/gamma crystallin domain-containing protein 3	gi 635122483	330 kDa	0,27%
PREDICTED: beta-parvin	gi 641727191	35 kDa	4,81%
PREDICTED: biorientation of chromosomes in cell division protein	gi 664701919	335 kDa	0,32%
PREDICTED: brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange	gi 641690750	240 kDa	0,64%
PREDICTED: C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	gi 664748155	101 kDa	3,10%
PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	gi 640803577	65 kDa	4,60%
PREDICTED: calpain-11 isoform X1	gi 664762818	95 kDa	2,84%
PREDICTED: cardiomyopathy-associated protein 5, partial	gi 664739604	467 kDa	0,24%
PREDICTED: caspase recruitment domain-containing protein 6	gi 634875237	115 kDa	1,28%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

PREDICTED: cell division cycle-associated protein 2	gi 640816456	112 kDa	0,98%
PREDICTED: centromere protein C isoform X1	gi 635042408	108 kDa	1,56%
PREDICTED: centromere protein U isoform X1	gi 664716971	48 kDa	4,42%
PREDICTED: choline transporter-like protein 2 isoform X2	gi 641731906	80 kDa	1,28%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 18	gi 634835008	192 kDa	0,84%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 24 isoform X1	gi 635108696	38 kDa	8,12%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 40	gi 664711440	135 kDa	0,92%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 93 isoform X1	gi 655826796	74 kDa	1,73%
PREDICTED: collagen alpha-1(VII) chain	gi 634888715	299 kDa	0,40%
PREDICTED: collagen alpha-1(XIX) chain-like	gi 664774383	66 kDa	2,66%
PREDICTED: collagen alpha-1(XV) chain	gi 635072360	142 kDa	2,02%
PREDICTED: cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1	gi 655680672	59 kDa	2,15%
PREDICTED: cyclin-dependent kinase 12 isoform X3	gi 291405938	163 kDa	0,67%
PREDICTED: cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1	gi 640801615	57 kDa	4,80%
PREDICTED: cytochrome P450 2J2-like	gi 634879130	27 kDa	6,44%
PREDICTED: cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	gi 641717760	493 kDa	0,56%
PREDICTED: dapper homolog 3-like	gi 655901061	25 kDa	5,37%
PREDICTED: death-associated protein kinase 3 afer	gi 634876653	53 kDa	6,17%
PREDICTED: DNA repair and recombination protein RAD54B	gi 634831604	97 kDa	1,51%
PREDICTED: dynein heavy chain 8, axonemal	gi 634844331	520 kDa	0,33%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase CHFR isoform X1	gi 635069462	74 kDa	3,45%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase MIB1	gi 640784713	134 kDa	1,63%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56 afer	gi 634823085	81 kDa	2,14%
PREDICTED: FAST kinase domain-containing protein 2	gi 634822040	80 kDa	3,74%
PREDICTED: fer-1-like protein 5	gi 664770082	239 kDa	0,63%
PREDICTED: filaggrin	gi 655846601	179 kDa	0,54%
PREDICTED: follistatin-related protein 1	gi 634856595	35 kDa	6,86%
PREDICTED: glycoprotein hormones alpha chain	gi 634826214	14 kDa	13,30%
PREDICTED: heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	gi 635030501	80 kDa	3,55%

Arquivo suplementar 3 (*Continua*)

PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3-like	gi 640796250	35 kDa	6,73%
PREDICTED: hornerin-like	gi 655902964	45 kDa	3,22%
PREDICTED: hydrocephalus-inducing protein homolog, partial	gi 664726912	528 kDa	0,26%
PREDICTED: hypoxia-inducible factor 1-alpha isoform X1	gi 641697495	80 kDa	1,96%
PREDICTED: inner nuclear membrane protein	gi 634853456	88 kDa	3,66%
PREDICTED: integrator complex subunit 2	gi 641716525	134 kDa	1,16%
PREDICTED: intraflagellar transport protein 81 homolog	gi 641704285	79 kDa	3,85%
PREDICTED: IQ and AAA domain-containing protein 1 isoform X1	gi 635061722	97 kDa	2,16%
PREDICTED: kinesin-like protein KIF27, partial	gi 664749494	150 kDa	0,92%
PREDICTED: Krueppel-like factor 10 cuniculus	gi 655689215	57 kDa	4,54%
PREDICTED: Krueppel-like factor 11 isoform X1	gi 635082653	55 kDa	5,27%
PREDICTED: laminin subunit beta-2-like	gi 641694319	162 kDa	0,59%
PREDICTED: la-related protein 4	gi 641701093	81 kDa	1,50%
PREDICTED: leucine-rich repeat and calponin homology	gi 640812520	32 kDa	9,96%
PREDICTED: leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein	gi 634883637	189 kDa	1,32%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 28S ribosomal protein S6	gi 655873428	14 kDa	10,40%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: aldehyde dehydrogenase X	gi 655600437	59 kDa	3,08%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ankyrin repeat domain-containing	gi 635094634	28 kDa	10,40%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: caspase-12-like	gi 655603032	50 kDa	2,02%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: coiled-coil domain-containing	gi 655758534	39 kDa	3,20%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: disheveled-associated activator of	gi 664774356	108 kDa	1,40%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: double-stranded RNA-binding protein	gi 640801892	56 kDa	5,08%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: dynein heavy chain	gi 664730311	539 kDa	0,42%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: fibrinogen C domain-containing	gi 655897059	50 kDa	3,69%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: fibronectin type III and SPRY	gi 655850638	53 kDa	4,03%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: formin-1	gi 664724677	154 kDa	0,65%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glutathione peroxidase 1	gi 635118737	22 kDa	13,90%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nebulin	gi 655827380	878 kDa	0,30%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nik-related protein kinase	gi 641730564	180 kDa	1,64%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: olfactory receptor 4F17-like	gi 634898427	34 kDa	2,95%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: potassium channel subfamily U	gi 641710652	127 kDa	1,67%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative ciliary rootlet	gi 640790322	260 kDa	0,94%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: relaxin-3 receptor 2	gi 641727964	42 kDa	4,96%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: selenoprotein M	gi 664768372	13 kDa	23,30%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine/threonine-protein kinase	gi 635029485	52 kDa	3,10%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: structure-specific endonuclease	gi 640824500	223 kDa	0,74%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: testis- and ovary-specific PAZ	gi 634872786	188 kDa	0,48%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein	gi 640817719	48 kDa	5,76%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein	gi 664709845	88 kDa	3,75%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 517	gi 664734403	55 kDa	2,41%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein OZF-like	gi 634896539	56 kDa	2,63%
PREDICTED: membrane-spanning 4-domains subfamily A member 14	gi 655603912	107 kDa	1,92%
PREDICTED: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 isoform	gi 635110291	144 kDa	1,08%
PREDICTED: modulator of retrovirus infection homolog	gi 640793986	17 kDa	7,10%
PREDICTED: MORC family CW-type zinc finger protein 1 isoform X1	gi 635121998	113 kDa	1,93%
PREDICTED: nebulin-related-anchoring protein isoform X1	gi 641707162	197 kDa	0,98%
PREDICTED: negative regulator of reactive oxygen species	gi 664749197	77 kDa	3,90%
PREDICTED: nuclear protein MDM1	gi 640816001	98 kDa	1,87%
PREDICTED: nuclear receptor subfamily 1 group I member 2	gi 641711390	44 kDa	2,11%
PREDICTED: nucleolar protein 56 fuscus].	gi 641701273	66 kDa	3,20%
PREDICTED: nucleolar protein 6 isoform X1	gi 635073081	128 kDa	2,79%
PREDICTED: olfactory receptor 10AG1-like, partial	gi 655604077	36 kDa	10,30%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

PREDICTED: olfactory receptor 4E2	gi 635141743	36 kDa	2,88%
PREDICTED: olfactory receptor 51L1	gi 664702271	37 kDa	2,40%
PREDICTED: olfactory receptor 8H1-like	gi 291385142	36 kDa	2,86%
PREDICTED: orexin receptor type 1	gi 641730059	47 kDa	6,35%
PREDICTED: peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial	gi 291413482	23 kDa	7,25%
PREDICTED: perilipin-4 isoform X1	gi 635035238	120 kDa	1,08%
PREDICTED: peroxisome biogenesis factor 6	gi 641723436	98 kDa	1,74%
PREDICTED: phosphoglucomutase-1 isoform X1	gi 634828608	64 kDa	2,41%
PREDICTED: piggyBac transposable element-derived protein 1 isoform	gi 655839812	85 kDa	1,21%
PREDICTED: pleckstrin homology-like domain family B member 2	gi 655854988	155 kDa	0,58%
PREDICTED: plectin isoform X1	gi 635050768	539 kDa	0,27%
PREDICTED: PML-RARA-regulated adapter molecule 1, partial	gi 640811062	102 kDa	3,46%
PREDICTED: pogo transposable element with ZNF domain isoform X1	gi 634876237	156 kDa	1,98%
PREDICTED: potassium channel subfamily K member 17 isoform X1	gi 635095370	45 kDa	3,48%
PREDICTED: PR domain zinc finger protein 5, partial	gi 640826529	70 kDa	3,09%
PREDICTED: probable phospholipid-transporting ATPase FetA	gi 641703319	134 kDa	1,54%
PREDICTED: procollagen C-endopeptidase enhancer 2	gi 291399915	46 kDa	3,12%
PREDICTED: proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	gi 635087049	129 kDa	0,98%
PREDICTED: proline-rich AKT1 substrate 1 isoform X1	gi 635040543	29 kDa	6,88%
PREDICTED: protein AATF	gi 641716553	64 kDa	2,47%
PREDICTED: protein FAM151B	gi 664756236	32 kDa	7,39%
PREDICTED: protein FAM181B	gi 640780668	23 kDa	9,69%
PREDICTED: protein phosphatase 1D	gi 664750743	69 kDa	1,73%
PREDICTED: protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1	gi 664747468	73 kDa	2,02%
PREDICTED: protein SFI1 homolog isoform X1	gi 655873986	143 kDa	0,91%
PREDICTED: protein Z-dependent protease inhibitor	gi 640785358	38 kDa	4,57%
PREDICTED: purine nucleoside phosphorylase-like	gi 634877178	33 kDa	2,77%
PREDICTED: putative IQ motif and ankyrin repeat domain-containing	gi 641734904	54 kDa	2,45%
PREDICTED: putative methyl-CpG-binding domain protein 3-like 3	gi 664780668	20 kDa	8,84%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

PREDICTED: putative N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase	gi 655602011	84 kDa	1,20%
PREDICTED: putative transferase CAF17, mitochondrial	gi 664751773	29 kDa	7,06%
PREDICTED: rab GTPase-activating protein 1-like isoform X3	gi 641709956	43 kDa	5,14%
PREDICTED: rab11 family-interacting protein 1 isoform X1	gi 635047601	130 kDa	0,98%
PREDICTED: rap guanine nucleotide exchange factor 6 isoform X1	gi 634856140	181 kDa	1,61%
PREDICTED: ras-related protein Rab-1B isoform X1	gi 635012062	25 kDa	10,50%
PREDICTED: RB1-inducible coiled-coil protein 1	gi 655667183	182 kDa	1,07%
PREDICTED: regulator of G-protein signaling 6 isoform X1	gi 655873841	70 kDa	3,47%
PREDICTED: ribonuclease P protein subunit p29	gi 291409788	26 kDa	3,64%
PREDICTED: RING finger protein 17	gi 664760717	163 kDa	1,05%
PREDICTED: RUN and FYVE domain-containing protein 1-like, partial	gi 640778800	69 kDa	3,09%
PREDICTED: sclerostin domain-containing protein 1	gi 664722653	23 kDa	11,70%
PREDICTED: SCP2 sterol-binding domain-containing protein 1	gi 634868775	17 kDa	13,50%
PREDICTED: secreted frizzled-related protein 4 afer	gi 634873961	42 kDa	7,78%
PREDICTED: seminal plasma protein HSP-1	gi 664722410	17 kDa	15,20%
PREDICTED: serine protease 33-like, partial	gi 664782906	17 kDa	9,26%
PREDICTED: serine protease 55-like isoform X1	gi 635046568	43 kDa	6,82%
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase DCLK1	gi 634882971	58 kDa	2,88%
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase VRK2	gi 640796360	58 kDa	1,57%
PREDICTED: serine-protein kinase ATM isoform X1	gi 664752520	351 kDa	0,88%
PREDICTED: SHC-transforming protein 4	gi 635135929	69 kDa	2,54%
PREDICTED: sterile alpha motif domain-containing protein 9-like	gi 655837551	184 kDa	2,53%
PREDICTED: structural maintenance of chromosomes flexible hinge	gi 641695086	216 kDa	0,94%
PREDICTED: SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent	gi 635065237	71 kDa	3,88%
PREDICTED: synaptonemal complex central element protein 2	gi 641731774	20 kDa	20,70%
PREDICTED: synaptotagmin-like protein 2 isoform X1	gi 664705238	129 kDa	2,17%
PREDICTED: T-box transcription factor TBX2	gi 664705544	67 kDa	1,28%
PREDICTED: tether containing UBX domain for GLUT4 afer	gi 634829916	61 kDa	1,79%
PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 37 isoform X1	gi 640775431	175 kDa	0,83%

Arquivo suplementar 3 (Continua)

PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 5	gi 641736217	49 kDa	3,19%
PREDICTED: torsin-1A-interacting protein 1 isoform X1	gi 635132235	68 kDa	2,33%
PREDICTED: TRAF-interacting protein isoform X1	gi 635118831	53 kDa	4,48%
PREDICTED: transcription factor jun-B	gi 641731694	36 kDa	8,65%
PREDICTED: transcription initiation factor TFIID subunit 4-like	gi 655900489	64 kDa	5,38%
PREDICTED: transcriptional regulator ATRX	gi 641736508	277 kDa	0,70%
PREDICTED: transmembrane protein 44 isoform X1	gi 635086321	48 kDa	3,20%
PREDICTED: trichohyalin	gi 640777686	65 kDa	2,30%
PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform X1	gi 640808740	98 kDa	1,93%
PREDICTED: UBX domain-containing protein 2A isoform X4	gi 635082193	25 kDa	8,97%
PREDICTED: uncharacterized protein C9orf43 homolog	gi 640798637	52 kDa	1,74%
PREDICTED: uncharacterized protein CXorf38 homolog isoform X1	gi 635143053	37 kDa	4,39%
PREDICTED: uncharacterized protein KIAA1210 homolog	gi 664780434	149 kDa	2,06%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103205835	gi 634877220	47 kDa	4,58%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103239535	gi 635069598	37 kDa	3,28%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103248236 isoform X1	gi 635017106	28 kDa	12,10%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103249322	gi 640781082	91 kDa	2,11%
PREDICTED: very low-density lipoprotein receptor isoform X1	gi 655600467	96 kDa	1,03%
PREDICTED: WD repeat-containing protein 48 isoform X1	gi 634861863	76 kDa	3,40%
PREDICTED: wiskott-Aldrich syndrome protein-like	gi 664776807	13 kDa	10,00%
PREDICTED: zinc finger CCHC domain-containing protein 4	gi 634880966	47 kDa	2,45%
PREDICTED: zinc finger protein 211 isoform X1	gi 635041924	70 kDa	1,48%
PREDICTED: zinc finger protein 280C	gi 640803370	83 kDa	3,12%
PREDICTED: zinc finger protein 469	gi 641699584	285 kDa	0,64%
PREDICTED: zinc finger protein 740 isoform X1	gi 664747683	25 kDa	4,44%
Prostaglandin D2 receptor 2	gi 6831524	43 kDa	4,19%
Protein kinase C, theta, isoform CRA_a, partial	gi 119606798 (+15)	53 kDa	2,39%
Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta, isoform	gi 119603796 (+11)	46 kDa	2,63%
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	gi 94710282	156 kDa	1,66%

Arquivo suplementar 3 (*Continua*)

Putative stereocilin-like protein	gi 190410951	192 kDa	1,35%
R-spondin-4 isoform 1 precursor	gi 100817773	26 kDa	10,10%
Scribbled homolog, isoform CRA_a	gi 119602602	83 kDa	1,32%
SEC24 related gene family	gi 119594061	113 kDa	1,55%
Sperm motility kinase	gi 160184892	55 kDa	2,27%
Stabilin-1	gi 61247906	276 kDa	0,82%
Sulfhydryl oxidase 2	gi 115311850	78 kDa	3,76%
Targeting protein for Xklp2	gi 292630907	86 kDa	1,61%
Transcriptional protein SWT1	gi 341942100	103 kDa	1,43%
Transmembrane protease serine 2	gi 115502469	54 kDa	3,25%
Triple functional domain protein	gi 257051075	348 kDa	0,61%
Tyrosine-protein kinase BAZ1B	gi 239938603	171 kDa	1,96%
Unconventional myosin-Ia	gi 13431670	97 kDa	1,90%
WNK lysine deficient protein kinase 1, isoform CRA_f	gi 119609364	204 kDa	0,47%
Zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2	gi 119586973	40 kDa	4,24%
Zinc finger protein 287	gi 342187317	87 kDa	1,45%
Zinc finger protein 828	gi 114149935	89 kDa	3,33%

Arquivo suplementar 4: Proteínas identificadas do extrato de membrana plasmática de espermatozoides de garanhões subférteis.

Proteína	Número de Acesso	Massa Molecular Teórica	Cobertura de Sequência
39S ribosomal protein L14, mitochondrial	gi 81904744	16 kDa	11,00%
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	gi 123344	97 kDa	1,24%
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, isoform	gi 119606803	58 kDa	2,58%
Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	gi 117949774	87 kDa	1,41%
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	gi 122140077	50 kDa	4,35%
Aggrin	gi 399021	209 kDa	0,66%
Ankyrin repeat and MYND domain containing 1, isoform CRA_e	gi 119591597	123 kDa	0,90%
Aprataxin and PNK-like factor	gi 73619701	55 kDa	1,60%
Aquaporin 7, isoform CRA_a	gi 119578909	37 kDa	2,63%
Aryl hydrocarbon receptor, isoform CRA_a	gi 119614092	96 kDa	1,18%
AT rich interactive domain 3B, isoform CRA_a	gi 119619733	61 kDa	3,04%
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	gi 114402	60 kDa	2,17%
ATPase, Class I, type 8B, member 1, isoform CRA_a	gi 119583458	144 kDa	1,04%
Axin 1, isoform CRA_a	gi 119606241	92 kDa	1,21%
bA299N6.3, isoform CRA_a	gi 119595570	22 kDa	5,15%
Bassoon (presynaptic cytomatrix protein), isoform CRA_a	gi 119585396	416 kDa	0,31%
Brain-specific angiogenesis inhibitor 3, isoform CRA_a	gi 119569221	169 kDa	0,67%
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B, isoform CRA_a	gi 119590085	112 kDa	2,06%
Cadherin-6 precursor	gi 25453400	88 kDa	1,90%
cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4A	gi 116242706	98 kDa	1,35%
Cation channel, sperm associated 1, isoform CRA_a	gi 119594894	82 kDa	2,94%
Centrosomal protein of 120 kDa	gi 205696376	113 kDa	1,01%
Centrosomal protein of 290 kDa	gi 109255234	290 kDa	0,48%
Chromosome 1 open reading frame 174, isoform CRA_a	gi 119591898	26 kDa	4,12%
Chromosome 1 open reading frame 65	gi 119613662	72 kDa	2,41%
Chromosome 1 open reading frame 93, isoform CRA_b	gi 119576488	24 kDa	4,95%

Arquivo suplementar 4 (Continua)

Chromosome 16 open reading frame 9, isoform CRA_e	gi 119606255	69 kDa	1,26%
Chromosome 17 open reading frame 64	gi 119571790	23 kDa	10,10%
Chromosome 6 open reading frame 85, isoform CRA_a	gi 119575536	87 kDa	2,46%
Cohesin subunit SA-3	gi 341942076	141 kDa	0,81%
Coiled-coil domain-containing protein 71	gi 81902049	46 kDa	4,62%
Coiled-coil domain-containing protein 92	gi 81879330	35 kDa	4,46%
cutC copper transporter homolog , isoform CRA_a	gi 119570239	29 kDa	3,66%
Disco-interacting protein 2 homolog A	gi 341940507	165 kDa	1,44%
DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	gi 30913111	52 kDa	1,88%
E3 ubiquitin-protein ligase HECW1	gi 341941078	179 kDa	0,69%
E3 ubiquitin-protein ligase RLIM	gi 259016319	66 kDa	1,67%
E3 ubiquitin-protein ligase UBR2	gi 73622074	199 kDa	0,68%
EGF-like module-containing mucin-like hormone	gi 44887878	77 kDa	1,74%
Family with sequence similarity 102, member B	gi 119576727	39 kDa	4,17%
Family with sequence similarity 44, member A	gi 119613122	330 kDa	0,26%
Fanconi anemia group M protein homolog	gi 78099255	226 kDa	0,74%
Filamin-B isoform b	gi 145966915	277 kDa	0,54%
FLJ43860 protein, isoform CRA_b, partial	gi 119612639	75 kDa	2,56%
FLJ44112 protein, partial	gi 119617981	88 kDa	1,69%
Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3, isoform CRA_b	gi 119578058	47 kDa	2,69%
GIPC PDZ domain containing family, member 2	gi 119626758	34 kDa	4,13%
Granzyme M (lymphocyte met-ase 1)	gi 119581593	27 kDa	7,00%
hCG1641825, isoform CRA_b	gi 119583782	18 kDa	8,77%
hCG1645746, partial	gi 119619486	25 kDa	6,17%
hCG1647962, isoform CRA_b	gi 119631974	23 kDa	8,81%
hCG1750329, isoform CRA_a, partial	gi 119629856	75 kDa	2,12%
hCG1786738, isoform CRA_a	gi 119597868	123 kDa	1,00%
hCG1793136	gi 119614615	14 kDa	7,26%
hCG1794073, partial	gi 119624646	21 kDa	5,91%

Arquivo suplementar 4 (Continua)

hCG1811342	gi 119577038	7 kDa	22,60%
hCG1820680, partial	gi 119584000	12 kDa	9,90%
hCG1986107, partial	gi 119609473	44 kDa	3,30%
hCG2010431, partial	gi 119629898	31 kDa	3,34%
hCG2038722, partial	gi 119618931	11 kDa	12,10%
hCG2039480, isoform CRA_a	gi 119585090	15 kDa	13,30%
hCG2040252, partial	gi 119609417	11 kDa	11,10%
hCG2044122, isoform CRA_a	gi 119601342	15 kDa	8,21%
hCG2045679	gi 119622016	8 kDa	18,10%
hCG2045744	gi 119626525	5 kDa	17,80%
Hemicentin 1 precursor	gi 154689979	612 kDa	0,44%
HSCARG protein, isoform CRA_a	gi 119605707	33 kDa	6,02%
Hypothetical protein HSPC268, isoform CRA_b	gi 119604321	13 kDa	11,50%
Immunoglobulin superfamily, member 3, isoform CRA_a	gi 119577061	135 kDa	1,26%
Importin subunit alpha-8	gi 353558936	57 kDa	3,64%
Inactive testicular serine protease 1	gi 81908405	41 kDa	4,63%
Kalirin	gi 160380715	337 kDa	0,27%
Kelch-like protein 22	gi 109892504	72 kDa	1,74%
keratin 5b, isoform CRA_b	gi 119617056	57 kDa	2,69%
Kinesin-like protein KIF2B	gi 75066639	76 kDa	1,64%
KPL2 protein, isoform CRA_b	gi 119576325	71 kDa	2,75%
Lactotransferrin	gi 342187156	78 kDa	2,26%
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	gi 294862450	286 kDa	0,83%
Loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1, isoform CRA_d	gi 119616666	13 kDa	9,92%
Low density lipoprotein receptor-related protein 5, isoform CRA_a	gi 119595111	179 kDa	0,68%
Lysyl oxidase homolog 2	gi 82654955	87 kDa	1,16%
Mitochondrial ribosomal protein L49, isoform CRA_b	gi 119594761	19 kDa	12,00%
Mitochondrial tumor suppressor 1, isoform CRA_e	gi 119584212	29 kDa	5,56%
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting	gi 119580733	3 kDa	36,00%

Arquivo suplementar 4 (Continua)

Modulator of apoptosis 1	gi 37999782	39 kDa	4,55%
MON1 homolog A (yeast), isoform CRA_a	gi 119585441	55 kDa	4,90%
Myelin basic protein	gi 126796	18 kDa	5,92%
Myosin-7	gi 127748	223 kDa	0,72%
N-acetyltransferase 5, isoform CRA_a	gi 119630618	19 kDa	13,30%
NGFI-A-binding protein 2	gi 341941152	57 kDa	2,48%
Nucleolar complex associated 3 homolog	gi 119570426	93 kDa	1,50%
Nucleoporin 155kDa, isoform CRA_a	gi 119576361	155 kDa	2,01%
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	gi 2498208	78 kDa	2,14%
peroxisomal biogenesis factor 3	gi 119568251	42 kDa	2,95%
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1, isoform CRA_d	gi 119608131	24 kDa	8,65%
Platelet glycoprotein V	gi 3183011	63 kDa	2,29%
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1	gi 341941036	75 kDa	2,25%
POU domain, class 1, transcription factor 1	gi 119589272	33 kDa	5,50%
PREDICTED: 39S ribosomal protein L41, mitochondrial	gi 291413693	15 kDa	7,41%
PREDICTED: double-strand break repair protein MRE11A	gi 291384059	80 kDa	1,70%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase RNF34 isoform X1	gi 291406929	41 kDa	4,02%
PREDICTED: exocyst complex component 4	gi 291391078	110 kDa	0,82%
PREDICTED: lipoyltransferase 1, mitochondrial [Oryctolagus	gi 291386220	42 kDa	2,14%
PREDICTED: protein Mdm4 isoform X1	gi 291402561	55 kDa	2,04%
PREDICTED: protein RRP5 homolog	gi 291404761	209 kDa	0,69%
PREDICTED: serine-rich coiled-coil domain-containing protein 1	gi 291401427	99 kDa	1,22%
PREDICTED: thyroid receptor-interacting protein 11-like	gi 291390788	88 kDa	1,66%
PREDICTED: transmembrane protein 2	gi 291383366	154 kDa	0,80%
PREDICTED: uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161 homolog	gi 291383073	81 kDa	2,39%
PREDICTED: zinc finger FYVE domain-containing protein 26	gi 291406481	283 kDa	0,51%
Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD2	gi 109892196	88 kDa	1,42%
Probable global transcription activator SNF2L1	gi 115311627	123 kDa	2,47%

Arquivo suplementar 4 (Continua)

Probable G-protein coupled receptor 113	gi 408360120	109 kDa	1,21%
Progesterin and adipoQ receptor family member 6	gi 51701771	38 kDa	3,21%
prolyl-tRNA synthetase	gi 119627074	53 kDa	3,58%
Protein FAM110D	gi 189031302	29 kDa	4,07%
Protein Hook homolog 3;	gi 41688584	83 kDa	1,39%
Protein Mis18-alpha	gi 81904542	23 kDa	5,39%
Protein SFI1 homolog	gi 123788825	144 kDa	1,23%
Protein yippee-like 1	gi 27805787	13 kDa	9,32%
PTPRF interacting protein, binding protein 2 (	gi 119589058	98 kDa	1,83%
Putative HERC2-like protein 3	gi 205785731	129 kDa	0,78%
Ras-related protein Rab-26	gi 76363309	29 kDa	4,62%
Ras-related protein Rab-8B; Flags: Precursor	gi 13638434	24 kDa	8,70%
Ras-responsive element-binding protein 1	gi 152060560	184 kDa	1,53%
Rho family GTPase 3, isoform CRA_a	gi 119631929	27 kDa	3,69%
ribosomal protein L10a, isoform CRA_a	gi 119624236	25 kDa	5,99%
RING finger protein 10	gi 117949776	90 kDa	0,99%
RNA binding motif protein, X-linked, isoform CRA_a	gi 119608859	42 kDa	4,35%
serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	gi 119582219	121 kDa	1,50%
Serine/arginine-rich splicing factor 5	gi 1168968	31 kDa	5,95%
Serpin I2	gi 20139983	46 kDa	4,94%
Sex comb on midleg-like protein 4	gi 189046184	44 kDa	5,64%
SH3 domain-containing protein 21	gi 81894677	60 kDa	2,00%
Sialic acid binding Ig-like lectin 7, isoform CRA_a	gi 119592392	41 kDa	3,74%
Similar to RIKEN cDNA A230078I05 gene, isoform CRA_a	gi 119591177	39 kDa	3,89%
Sirtuin	gi 119581644	15 kDa	6,72%
Slit homolog 2, isoform CRA_a	gi 119613198	170 kDa	0,92%
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	gi 116241260	112 kDa	2,07%
Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 13	gi 119584931	61 kDa	1,63%
Solute carrier family 9, member 11, isoform CRA_a	gi 119611352	129 kDa	2,05%

Arquivo suplementar 4 (Continua)

Sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	gi 119589132	37 kDa	4,63%
Stromelysin-1	gi 116857	54 kDa	2,31%
Syntenin-2 [Pan troglodytes].	gi 525344492	30 kDa	5,09%
Thymine-DNA glycosylase, isoform CRA_a	gi 119618133	48 kDa	2,82%
Toll-like receptor 3, isoform CRA_a	gi 119625033	104 kDa	0,89%
Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa, isoform CRA_c	gi 119581067	174 kDa	1,24%
Topoisomerase (DNA) II beta 180kDa, isoform CRA_a	gi 119584761	183 kDa	0,56%
Translation factor GUF1, mitochondrial	gi 317411681	75 kDa	1,94%
Transmembrane 9 superfamily member 1, isoform CRA_a	gi 119586477	69 kDa	2,81%
Transmembrane protein 126B	gi 81904762	25 kDa	11,30%
Tripartite motif-containing 35, isoform CRA_b	gi 119583962	57 kDa	1,83%
tRNA pseudouridine synthase-like	gi 218525914	32 kDa	3,09%
Troponin I type 2 (skeletal, fast), isoform CRA_a	gi 119622872	19 kDa	6,83%
Tuftelin-interacting protein 11	gi 193806525	96 kDa	2,28%
Ubiquinone biosynthesis protein COQ7 homolog	gi 116243179	24 kDa	12,00%
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 45 isoform 1	gi 22779926	90 kDa	2,09%
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	gi 44888442	123 kDa	0,83%
Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast), isoform CRA_b	gi 119623443	35 kDa	4,23%
Uncharacterized protein C3orf20 homolog	gi 81899984	104 kDa	1,29%
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog, isoform CRA_c	gi 119568354	85 kDa	1,58%
X-linked retinitis pigmentosa GTPase	gi 44888535	152 kDa	0,98%
Zinc finger and SCAN domain-containing protein 5C.	gi 187668014	56 kDa	2,82%
Zinc finger protein 135 (clone pHZ-17), isoform CRA_d	gi 119592961	55 kDa	2,93%
Zinc finger protein 608, isoform CRA_b	gi 119569244	148 kDa	1,30%
Zinc finger protein 692, isoform CRA_b	gi 119577944	52 kDa	2,74%
Zinc finger protein 705F.	gi 187666010	35 kDa	3,67%

Capítulo 3

Trabalho a ser enviado para a revista **Andrology** (Normas para publicação especificadas no Anexo I)

ARTIGO 2 - Caracterização do proteoma do plasma seminal e membrana espermática de equinos

¹P. N. Guasti, ^{1,2}F. F. Souza, ¹C. Scott, ²L. D. Santos, ¹F. O. Papa

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, Brasil

²Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, Brasil

Correspondência: Priscilla N. Guasti, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu –SP, 18618-970, Brasil.

E-mail: priguasti@gmail.com

RESUMO

Durante a ejaculação, proteínas do plasma seminal (PS) se associam a membrana plasmática (MP) de espermatozoides e influenciam a funcionalidade espermática e interação entre os gametas. No entanto, a identidade da maioria das proteínas da membrana plasmática da célula espermática na espécie equina permanece desconhecida. O presente estudo teve como objetivo a caracterização do proteoma do plasma seminal e da membrana plasmática de espermatozoides por eletroforese 2D e espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF MS/MS e LC-ESI Q-TOF MS/MS - *shotgun*). O PS e MP apresentaram predominância de polipeptídeos com massa molecular abaixo de 35 kDa, com a identificação de 14 e 13 *spots* nos géis 2D, respectivamente. Dentre estas, proteínas ribossomais foram detectadas nas duas amostras. A análise proteômica de *shotgun* identificou 66 proteínas no plasma seminal e 291 proteínas no extrato de membrana plasmática. Foram identificadas proteínas envolvidas no processo reprodutivo como as kallikrein, SP-1, SP-2, proteínas com domínio Fn-2 e Fn-3, receptores olfatórios, SPATA, entre outras. Doze diferentes tipos proteicos foram comuns ao extrato da MP e do PS, os quais foram relacionados a atividade de

transcrição, atividade enzimática e metabolismo celular. Em conclusão, uma série de proteínas da MP podem ser originárias do plasma seminal e podem estar relacionadas à funcionalidade espermática e na interação entre os gametas. Ainda, a utilização de uma abordagem proteômica moderna possibilitou a identificação de grande parte das proteínas do plasma seminal e da membrana plasmática de espermatozoides, o que facilita futuras investigações de suas funções na reprodução equina.

Palavras-chave: proteínas do plasma seminal, proteína de membrana plasmática, espermatozoide equino, proteoma seminal, plasma seminal equino.

INTRODUÇÃO

Após sua formação no ambiente testicular, a célula espermática necessita passar por um processo de maturação para que seja capaz de fertilizar o oócito. Durante o trânsito epididimário, as interações entre as substâncias secretadas e a membrana plasmática do espermatozoide permitem modificações morfofuncionais substanciais para a aquisição da motilidade e capacidade fecundante (Dacheux et al., 2003; Gatti et al., 2004).

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e apesar de apresentarem detectáveis níveis de transcrição e tradução na célula adulta (produção ativa de transcritos após a meiose) (Gur & Breitbart, 2008), estas possuem limitada habilidade de biossíntese de novos componentes (Amman et al., 1993). Durante o trânsito epididimário e ejaculação, proteínas provenientes do lúmen do epidídimo e do plasma seminal se aderem ao espermatozoide, promovendo o remodelamento da estrutura dos domínios proteicos da superfície da membrana plasmática (Manásková et al., 2003; Dacheux & Dacheux, 2014). As modificações pós-testiculares são essenciais em certas etapas do processo de fecundação como a capacitação espermática, estabelecimento do reservatório espermático, modulação da resposta imune uterina e interação dos gametas (Topfer-Petersen et al., 2005; Caballero et al., 2009).

O plasma seminal contém diferentes tipos de proteínas que são expressas e sintetizadas nas glândulas acessórias: próstata, glândulas bulbouretrais e vesículas seminais (Manásková et al., 2003). Em equinos, a quantidade de proteínas existentes no plasma seminal é relativamente baixa (10 mg/ml) quando comparada com outros mamíferos (20-60mg/ml) (Töpfer-petersen et al., 2005). Possuem como característica a

formação de agregados multiprotéicos, compostos por proteínas de 11 a 30 kDa, correspondendo a 70% das proteínas totais do plasma seminal equino (von Fellenberg et al., 1985). A maioria das proteínas seminais pertence a três grupos, proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) e as espermadesinas; todas são encontradas no plasma seminal e no espermatozoide equino (Töpfer-petersen et al., 2005).

As investigações sobre o proteoma do plasma seminal (PS) equino são baseadas, em sua maioria, em técnicas de eletroforese unidimensional (1D SDS PAGE), bidimensional (2D SDS-PAGE) acopladas a espectrometria de massas. O primeiro estudo envolvendo o perfil proteico do plasma seminal equino foi realizado por Amann et al. (1987), no qual foram detectadas 27 proteínas com massa molecular entre 13-122 kDa, por eletroforese unidimensional. Frazer & Bucci (1996a), caracterizaram o proteoma do PS equino com 1D SDS-PAGE e detectaram 14 bandas de massa molecular variando entre 14-120 kDa. Os mesmos autores, em outro estudo, utilizando eletroforese 2D SDS-PAGE, detectaram 30 *spots* no plasma seminal e concluíram que cerca de 85% das proteínas totais do plasma seminal são representadas por pequenos polipeptídios com massa molecular < 33 kDa (Frazer & Bucci, 1996b).

Brandon et al. (1999) correlacionaram as proteínas do PS com a fertilidade de garanhões utilizando 2D SDS-PAGE e detectaram o total de 18 *spots* no gel de poliacrilamida. Outro grupo ao analisar o proteoma do PS e do espermatozoide em relação à fertilidade utilizando 2D SDS-PAGE e espectrometria de massas tandem (MS/MS) e cromatografia líquida (LC) reportou 108 proteínas no plasma seminal e 182 proteínas no espermatozoide equino, no entanto, somente as proteínas de interesse foram identificadas (Novak et al., 2010).

Karekoski e colaboradores (2011) analisaram a composição proteica do plasma seminal em diferentes frações do ejaculado de garanhões utilizando 1D SDS-PAGE. Foi observado que as proteínas com massa molecular entre 60-70 kDa foram mais abundantes na fração seminal contendo poucos espermatozoides quando comparada com a fração seminal rica em espermatozoides ou com o ejaculado inteiro. Jobim et al. (2011) detectaram 25 proteínas no plasma seminal com massa molecular de 10-85 kDa e pI de 3,2 a 7,5, utilizando 2D SDS-PAGE. Recentemente, Druart et al. (2013) caracterizaram e compararam o proteoma do plasma seminal de diferentes espécies de mamíferos, incluindo o garanhão, por meio de 1D SDS-PAGE e análise *shotgun* (2D LC-MS/MS). O gel SDS-PAGE revelou que 84,5% das proteínas totais do plasma

seminal possuem massa molecular abaixo de 25 kDa e a análise *shotgun* identificou 59 proteínas no plasma seminal equino.

A variabilidade dos resultados obtidos em relação ao plasma seminal é um reflexo do tipo de preparação da amostra e abordagem proteômica disponível no momento da pesquisa. Além disso, a composição proteica do plasma seminal equino apresenta grande variabilidade individual entre garanhões (Zahn, 2005) e entre as frações dos ejaculados (Karekoski et al. 2011), dificultando a obtenção de resultados consistentes em relação a estes componentes.

As proteínas são os constituintes mais abundantes das células, correspondendo entre 35 a 85% do seu peso seco, de acordo com o tipo celular (Rebouças, 1999). No entanto, o proteoma da célula espermática na espécie equina, mais precisamente da membrana plasmática é pouco estudado. Meyers (2001) demonstrou que uma proteína específica da membrana plasmática, PH-20, localizada na cabeça do espermatozoide, possui atividade de hialuronidase e se distribui na região acrossomal durante o processo de capacitação. Do mesmo modo, a enzima galactosiltransferase está presente na membrana plasmática de equinos, e pode servir com receptor durante a interação inicial entre os gametas (Fayrer-Hosken et al., 2005). As proteínas do grupo Fn-2 interagem com os fosfolípidios da membrana plasmática do espermatozoide durante a maturação pós-testicular e momento da ejaculação (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005). No entanto, o perfil protéico da membrana plasmática de espermatozoides equinos ainda não foi caracterizado.

Pesquisas sobre a caracterização das proteínas do plasma seminal e da membrana plasmática do espermatozoide e a interação destes componentes em relação à fertilidade são essenciais para elucidar a função real do plasma seminal no processo de fertilização, uma vez que já foi comprovado que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo equino são capazes de fertilizar o oócito (Papa et al., 2008, Heise et al., 2010) e possuem índices de concepção superiores ou similares aos espermatozoides do ejaculado (Monteiro et al., 2011).

Desta forma, os objetivos deste estudo foram caracterizar o perfil proteico do plasma seminal e membrana plasmática de espermatozoides de garanhões e identificar proteínas em comum entre as duas amostras biológicas utilizando 2D SDS PAGE MS/MS e análise de *shotgun* (LC-ESI QTOF-MS/MS).

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional, sob o número de protocolo 153/2012-CEUA.

Coleta de sêmen e preparação das amostras de plasma seminal

Foram utilizados 10 garanhões da raça Quarto de Milha, com idade de 10 a 15 anos, com histórico reprodutivo conhecido e fertilidade comprovada. Os animais estavam alocados em centrais de reprodução e a coleta de sêmen era realizada em dias alternados durante a estação de monta. Para a realização do experimento, três ejaculados de cada animal foram coletados com vagina artificial, com intervalo de 1 dia. Três ejaculados de cada animal foram coletados com vagina artificial.

O sêmen foi filtrado para remoção do gel e uma alíquota 10 mL foi refitada e submetida a centrifugação por $600 \times g$, 10 minutos, para obtenção e análise proteômica do plasma seminal, o qual foi acrescido de um coquetel com inibidores de proteases (S8820; Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Dez alíquotas de 1 mL de sêmen foram acrescidas de um coquetel com inibidores de proteases para a extração das proteínas de membrana espermática. As amostras destinadas a análise proteômica foram armazenadas em botijões criogênicos (-196°C) para o transporte.

Após a descongelação das amostras de plasma seminal, estas foram novamente submetidas à centrifugação a $15,000 \times g$ por 60 minutos à 4°C e as proteínas do plasma seminal foram quantificadas pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA), de acordo com metodologia descrita por Smith et al. (1985).

Preparação e extração das proteínas da membrana espermática

Após a descongelação, 500×10^6 de espermatozoides foram separados e acrescidos com coquetel de inibidores de proteases para a extração de proteínas da membrana espermática. Foram realizadas três lavagens ($700 \times g$, 5 min, 4°C) com coquetel de inibidores de protease e 0,1 mg/mL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (P7626; Sigma-Aldrich, Missouri, USA). As proteínas de membrana foram extraídas com 0,5% (v/v) de Nonidet P-40 (74385; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (Rajeev & Reddy, 2004) e sonicador (Digital Sonifier Model 450; Branson Ultrasonics Corporation, Connecticut, USA), utilizando probe 3.0 mm, 20% amplitude em 10 pulsos de 30 segundos e pausa de 1 minuto entre os pulsos (Baker et al., 2002 com modificações). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas por $10,000 g$ por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante

contendo as proteínas da membrana espermática solubilizadas foi coletado.

A determinação de proteína total extraída da membrana espermática foi realizada por meio de ensaio de BCA. Em seguida, as amostras foram submetidas à liofilização (FTS Systems TDS-00209-A; Pennsylvania, USA), em função da baixa quantidade de proteínas encontrada nas amostras.

Eletroforese Bidimensional

Para cada animal utilizou-se um pool das três coletas seminais, com intuito de eliminar a variabilidade dos ejaculados. Para a primeira dimensão, fitas de IPG de 7 cm com gradiente imobilizado de pH 3-10 não linear (17-6001-12; GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK); foram reidratadas por 16 horas com alíquotas de 150 µg de proteína do plasma seminal ou extrato de membrana espermática, diluídas em solução de reidratação (17-6003-19; GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) acrescida de 0,7 µL de anfólitos (17-6004-40; GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). A reidratação das fitas ocorreu de forma passiva à temperatura ambiente. A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no aparelho Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, California, USA) a temperatura de 20°C. O programa constituiu de corrente de 50µA/fita, a 250 V por uma hora, 2000 V por uma hora, 4000 V por uma hora, 4000 V até serem acumulados 15000 V/hora e 4000 V por uma hora. Após a IEF, as fitas foram equilibradas, por 20 minutos sob leve agitação, em solução de equilíbrio (6 M uréia, 2% SDS, 0,375 M Tris-HCL (pH 8,8), 20% glicerol) contendo 130 mM ditiotreitol e em seguida, 20 minutos, na mesma solução de equilíbrio, porém contendo 135 mM iodoacetamida (IAA).

A segunda dimensão foi realizada em mini-cuba vertical (Mini-PROTEAN3 Dodeca Cell; Bio-Rad Laboratories, California, USA) em gel de 12% de poliacrilamida (8.3 x 7.3 cm). Foram realizadas duas réplicas de cada amostra e utilizado um padrão de massa molecular de 10 a 260 kDa (26634; Thermo Scientific, Illinois, USA). As fitas e o marcador de massa molecular foram cobertos com solução selante de agarose (124 mM Tris, 1 M Glicina, 0,5% SDS, 0,5% agarose, 0,001% bromofenol azul). O tampão de corrida utilizado foi o mesmo descrito por Laemmli (1970), 1 x concentrado para o anodo e 3 x concentrado para o catodo. A voltagem foi fixada em 50 V até a amostra migrar da fita, e a seguir a voltagem foi fixada em 150 V até o final da corrida. A miliamperagem permaneceu livre. O tempo de corrida para os géis foi de 90 a 110 minutos.

As proteínas foram coradas com Comassie Coloidal Brilliant Blue G-250 (CBB 27815; Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Os géis foram fixados em uma solução contendo 40% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético glacial por 60 minutos e lavados com água destilada duas vezes por 10 min. Para a detecção das proteínas, os géis foram mantidos por 16 horas em uma solução corante [20% (v/v) metanol, 10% (w/v) sulfato de amônia, 2% (v/v) ácido fosfórico e 0.1% (w/v) CBB]. Após 3 lavagens em água destilada (10 min cada), os géis foram armazenados em 1% (v/v) solução de ácido acético para análise da imagem e seleção dos *spots* para sequenciamento.

Os géis foram scaneados com ImageScanner III e com o software LabScan Version 6.0 (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK). A análise dos géis foi realizada com o software ImageMaster 2D Platinum Version 7.0 (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK).

Identificação proteica por espectrometria de massas e banco de dados

MALDI-TOF/TOF

Digestão proteica em gel

Os principais *spots* do plasma seminal e da membrana plasmática foram excisadas do gel (Fig. 1) e descorados em lavagens com solução 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mM bicarbonato de amônia até a remoção total do CBB.

A digestão proteica foi realizada segundo metodologia descrita por Schevchenko et al. (2006). Os *spots* foram completamente desidratados com 100% (v/v) de ACN, reidratados e reduzidos com 20 mM DTT, mantidos à 56°C por 40 min. O sobrenadante foi descartado e os géis foram reidratados e alquilados com 55 mM IAA, no escuro, por 30 minutos à temperatura ambiente e novamente desidratados com 100% (v/v) de ACN. A digestão proteica foi realizada com a solução de tripsina (V511A, Promega, Wisconsin, EUA; 20 ng/μL tripsina em 25 mM de bicarbonato de amônio) e incubação por 12 horas à 37°C. A ação da tripsina foi interrompida com a adição da solução bloqueadora contendo 5% (v/v) ácido fórmico 96% em 50% (v/v) ACN. Os peptídeos foram eluídos do gel com 1% (v/v) ácido fórmico (96%) em 60% (v/v) metanol por 15 minutos à 40°C, duas vezes. Em seguida, a eluição foi realizada em solução 1% (v/v) ácido fórmico (96%) em 50% (v/v) ACN por 15 minutos à 40°C, duas vezes; e uma vez, em solução contendo 100% (v/v) ACN. Os sobrenadantes contendo os peptídeos foram coletados em todos os passos da eluição, armazenados em tubos de vidro (186000385C;

Waters, USA) conjuntamente e concentrados em concentrador a vácuo (Concentrator plus 5301; Eppendorf, Hamburg Alemanha). As amostras foram ressuspensas em 10 µL de 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) e os peptídeos foram purificados e dessalinizados em micro colunas de fase reversa (ZipTip, resina C18; Millipore, Massachusetts, USA), conforme o protocolo do fabricante. As amostras foram então novamente concentradas a vácuo.

Sequenciamento peptídico por MALDI

Após a última concentração, as amostras digeridas do gel 2D foram ressuspensas em 2 µL de 50% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) TFA em água ultrapura. Para aplicação na placa de MALDI foram utilizados 2 µL e 1 µL de matriz (ácido α -ciano-4-hidrocinâmico em 50% (v/v) ACN:H₂O acrescido de 0,1% (v/v) TFA). A análise dos fragmentos peptídicos foi realizada com equipamento MALDI TOF/TOF MS/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometer AB Sciex 5800; Framingham, EUA), no modo automático, juntamente com calibração interna, utilizando CAL Mix1 (AB Sciex 5800, Framingham, USA). Os espectros de massas foram obtidos em modo refletor positivo a 400 Hz no modo MS e 1000 Hz, no modo MS/MS. A voltagem da fonte de ionização foi de 5500 kV no modo MS e MS/MS, sendo aplicados 1000 *shots/spectro*, no modo MS e 2500 *shots/spectro*, no modo MS/MS. O programa utilizado para obtenção dos resultados da espectrometria foi o AB Sciex MALDI TOF/TOF series Explorer version 4.1.0 (AB Sciex 5800, Framingham, USA).

LC- ESI -QTOF (Análise shotgun)

Digestão proteica em solução

A digestão das amostras complexas de plasma seminal e de extrato de membrana plasmática dos espermatozoides foi realizada de acordo com protocolo de Villén e Gigy, (2008).

Foi realizado um pool de todos os ganhões nas amostras correspondentes ao plasma seminal e extrato da membrana plasmática, para evitar variabilidade individual de cada animal. O total de 100 µg de PS e MP foi ressuspensado em uréia 8M (1:1), reduzidos em solução final de 5 mM DTT por 25 minutos a 56°C e alquilados em solução final de IAA 14 mM por 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. Em seguida, foi acrescida uma solução de DTT 5 mM na concentração final por 15

minutos a temperatura ambiente protegido da luz. As amostras foram então diluídas em 50 mM de AmBic (1:5) e adicionou-se uma solução de cloreto de cálcio 1 mM na concentração final. A tripsina foi diluída em 50 mM de Ambic, adicionada na proporção 1:50 (enzima:substrato) e incubada por 16 horas à 37°C. Para o bloqueio da ação enzimática foi adicionado 0,4 % de ácido trifluoroacético (TFA) e verificado se o pH < 2.0. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $2500 \times g$ por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e procedeu-se a dessalinização dos peptídeos utilizando as colunas de fase reversa (SepPack C18, WAT054955; Waters Corporation, Massachusetts, USA), de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante.

Sequenciamento peptídico por ESI-QTOF

Para análises de espectrometria de massas do tipo ESI-QTOF foi utilizado o equipamento de espectrometria de massas do tipo electrospray (ESI) quadropolo, modelo MicrQ-TOF III (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA), acoplado ao cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan).

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 μ m). As condições de eluição foi otimizada em gradiente linear de 0 a 85% do solvente B por 60 minutos, fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras foram mantidos a 25°C e 10°C, respectivamente. O volume de injeção dos compostos de referência e das amostras foi de 2 μ L. O espectrômetro de massas atuou com 4.5 kV com temperatura de solvatação de 180°C, modo positivo em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 1000 m/z, fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0.8 bar. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila 50% (v/v) e TFA 0,1% (v/v) e foram injetadas em fluxo constante de 0,3mL/min. Para as análises de MS/MS foi utilizada o gás nitrogênio como gás de colisão. A energia de colisão utilizada foi de 1 a 200 eV. O equipamento ESI-Q-ToF foi calibrado no intervalo de massa/carga de 50 a 3000, utilizando calibrantes internos, sendo que a calibração externa foi realizada na presença de formiato de sódio.

Análise dos dados

Para os dados obtidos por MALDI, a busca dos íons MS/MS foi realizada com sistema de pesquisa Mascot (Matrix Science, Londres, UK) utilizando a taxonomia *Mammalia* do banco de dados NCBI nr_1.1 (863226 sequências). A tolerância de massa

foi 0,5 Da para íons precursores e fragmentos. Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease com permissão para a perda de 2 clivagens, massa molecular monoisotópica, modificações fixas da cisteína (carbamidometilação) e modificações variáveis da metionina (oxidação). Os resultados do Mascot foram submetidos ao programa Protein Pilot Software 4.0 (AB Sciex, Framingham, USA) para realizar as análises dos conjuntos de dados, de forma a validar os peptídeos base MS/MS e identificação de proteínas.

Para os dados obtidos por ESI, a busca dos íons MS/MS foi realizada com sistema de pesquisa Mascot (Matrix Science, Londres, UK) utilizando a taxonomia *Mammalia* do banco de dados NCBI nr_1.1 (863226 sequências). Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease com permissão para a perda de 1 clivagem; modificações fixas da cisteína (carbamidometilação) e modificações variáveis da metionina (oxidação); massa molecular monoisotópica; erro de tolerância de peptídeos (MS) $\pm 0,3$ Da e erro de tolerância (MS/MS) $\pm 0,5$ Da; protonação + 1. Os dados foram exportados e analisados pelo software Scaffold Version 4.3.4 (Proteome Software, Portland, USA) para realizar as análises dos conjuntos de dados, de forma a validar os peptídeos base MS/MS e identificação de proteínas.

Ontologia gênica

Para obtenção da anotação da ontologia gênica (GO) em relação a localização celular, função molecular e processo biológico, os dados obtidos por espectrometria de massas MALDI foram inseridos no banco de dados UniprotKB (www.uniprot.org.br) e os resultados da análise *shotgun* foram analisados pelo software Scaffold 4 (v 4.3.4; Proteome Software, Portland, EUA).

RESULTADOS

2D SDS-PAGE do plasma seminal e extrato da membrana plasmática

O perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e extrato da membrana plasmática demonstrou predominância de proteínas com massa molecular abaixo de 25 kDa e 35 kDa, respectivamente. Nas condições descritas deste estudo, foram detectados no total 56 *spots* nos géis de plasma seminal e 43 *spots* no extrato da membrana plasmática.

Foram constatadas cinco constelações proteicas marcantes nos géis do plasma seminal, observados em todos os animais. A constelação 1 constitui cerca de 3 *spots* com massa molecular variando de 68 a 69 kDa e pI 5,9 a 6,3. A constelação 2 foi composta de 8 *spots* com massa molecular entre 24 e 28 kDa e pI 5,1 a 6,8. Estes dois conjuntos apareceram de forma uniforme em todos os animais. A constelação 3 foi representada por cerca de 4 *spots* conectados, com intensidade variável de acordo com o animal, com a mesma massa molecular (24 kDa) e variável pI (8,4 ~ 9,3). A constelação 4 foi representada por duas fileiras de polipeptídeos. A primeira fileira foi representada por dois *spots* isolados (MM 18 kDa e pI 3,6; MM 18 kDa e pI 5,2), por uma marcação com cerca de 3 *spots* (MM 18 kDa, pI ~ 4,4) e um *spot* adjacente de massa molecular 18 kDa e pI 5,1. A divisão destes *spots* foi mais evidente em 3 animais e somente como um conjunto de *spots* em 7 animais. A segunda fileira foi representada por cerca de 3 *spots* com massa molecular variável de 15 a 16 kDa e pI 3,7 a 4,8. A constelação 5 constitui-se de uma cadeia de 4 *spots* que migraram aproximadamente até a mesma massa molecular (MM ~ 14 kDa) com pI variável de 5,2 a 7,8.

Na membrana plasmática três constelações proteicas, bem delimitadas, foram observadas em todos os animais e foram similares aos conjuntos proteicos do plasma seminal. A constelação 1 foi composta por 2 cadeias de polipeptídeos. A primeira cadeia possuía 2 *spots* com mesma massa molecular e diferentes pI (14 kDa e pI 3,5 e 5,1); 3 *spots* próximos com massa molecular 14 kDa (foi possível visualizar a divisão destes *spots* em todos animais, com exceção de 4 réplicas de 4 animais) e 1 *spot* adjacente com massa molecular 15 kDa e pI 5,1. A segunda cadeia polipeptídica foi formada por 2 *spots* isolados com massa molecular 11 kDa e pI 3,5 e 4,7 e 3 *spots* próximos com massa molecular 11 kDa e pI 4,2, sendo possível delimitar estes *spots* apenas em 5 animais. A constelação 2 foi composta por 4 *spots*, os quais possuíam mesma massa molecular (11 kDa) e pI (5,3 a 6,9). A constelação 3, assim como a constelação 3 do plasma seminal, foi composto por *spots* conectados (MM 28 kDa; pI 9,5) e apareceram com intensidade variada ou somente como um *spot* dependendo do animal (Fig. 1).

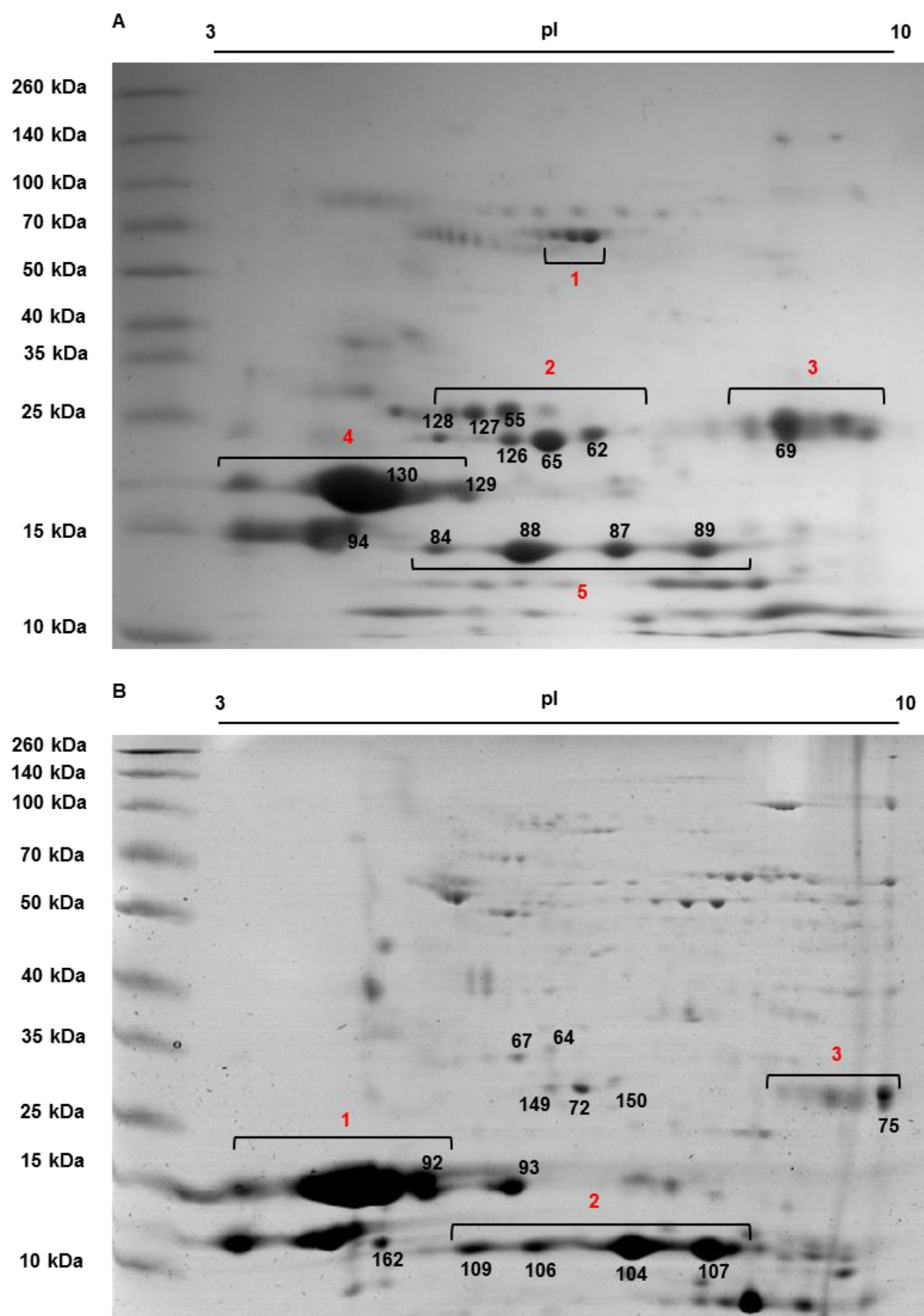


Fig. 1 Mapa 2D SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal (A) e da membrana plasmática (B) de equinos em gel de poliacrilamida 12%. Os números em vermelho correspondem as constelações proteicas.

MALDI-TOF/TOF MS/MS

Os *spots* principais foram submetidos à identificação por MALDI-TOF/TOF MS/MS. Foram identificados 14 *spots* no plasma seminal e 13 *spots* na membrana plasmática (Tabela 1 e 2). O eescore das proteínas identificadas variou de 41 a 60.

Tabela 1 Proteínas do plasma seminal equino identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). Os *spots* se referem aos demonstrados no gel 2D da Fig. 2.

Spot ID	Proteína	Acesso NCBI	kDa/pI experimental	Cobertura de sequência
127	60S ribosomal protein L29-like	ref XP_003085986.1	28/5,5	73%
65	60S ribosomal protein L29-like	ref XP_003085986.1	24/5,8	73%
62	60S ribosomal protein L29-like	ref XP_003085986.1	25/6,2	56%
55	Hypothetical protein XP_860135	ref XP_865228.1	28/5,6	46%
87	Immunoglobulin heavy chain variable region	gb AAD20481.1	14/6,3	41%
89	Kif3b protein	gb AAH65132.1	14/7,3	23%
69	Nucleolar protein 7, 27kDa	emb CAI19840.1	24/9,4	47%
88	NZ-3 antigen	pir JC7702	14/5,7	16%
130	Phospholipase A2, group IVB	emb CAX15787.1	18/5,1	5%
94	rCG27487, isoform CRA_b	gb EDL95180.1	16/4,9	49%
84	Similar to transcription factor TFIID subunit TAFII28	ref XP_001380196.1	14/5,3	29%
126	T-cell receptor beta chain V-D-J-C0 regions	pir A26395	24/5,6	41%
128	T-cell receptor beta-chain	gb AAA40265.1	28/5,4	51%
129	Zinc finger protein 572	ref XP_002759282.1	18/5,4	11%

Foi verificada a presença de proteínas ribossomais nas amostras de plasma seminal e membrana plasmática.

Foram identificados diversos *spots* como uma única proteína (T-cell receptor beta-chain e 60S ribosomal protein L29-like).

Os termos de ontologia gênica das amostras de plasma seminal e extrato de membrana plasmática estão descritos na Fig.2.

Tabela 2 Proteínas da membrana plasmática de espermatozoide equino identificadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). Os *spots* se referem aos demonstrados no gel 2D da Fig. 1.

Spot ID	Proteína	Acesso NCBIInr	kDa/pI experimental	Cobertura de sequência
149	Coiled-coil domain-containing protein KIAA1407-like	ref XP_002813320.1	28/5,7	9%
67	Forkhead box P2	gb ABW76642.1	32/5,5	62%
150	Gene B-50 protein	pir I52645	29/6,2	70%
64	GTP-binding protein RAB18	gb AAK14832.1	33/5,7	45%
75	Kit ligand, isoform CRA_b	gb EDL21654.1	28/9,6	41%
92	MHC class II antigen	gb ACT91028.1	15/5,1	45%
72	MHC class II antigen beta	gb AAP33672.2	28/5,9	65%
104	Neuron navigator 2 isoform 3	ref XP_508328.2	11/6,3	4%
107	Protein FAM110A-like	ref XP_002925445.1	11/7,0	34%
109	Ribosomal protein L35a-like	ref XP_002702905.1	11/5,3	24%
162	Similar to seminal plasma protein 2	ref XP_001501767.2	11/4,9	15%
93	Unnamed protein product	dbj BAE00496.1	14/5,5	14%
106	Unnamed protein product	dbj BAB24583.1	11/5,6	10%

LC-ESI-QTOF MS/MS

Foram identificadas 66 proteínas no plasma seminal e 291 proteínas no extrato da membrana plasmática. A lista completa de proteínas identificadas está descrita no arquivo Suplementar 1 e 2.

Foram encontrados 12 tipos proteicos em comum entre o plasma seminal e extrato de membrana plasmática, as quais foram representadas por proteínas ribossomais, proteínas HCG, calpaínas, proteínas do ciclo de divisão celular (CDC), domínio coiled-coil, dineínas, ubiquitina E3, zinc finger proteins, fosfatidilinositol, citocromo c oxidase, proteínas FAM, fator de transcrição t-box.

Os termos de ontologia gênica quanto aos processos biológicos e funções moleculares encontram-se na Fig. 3. Cerca de 63% das proteínas identificadas não possuem definições quanto a ontologia gênica.

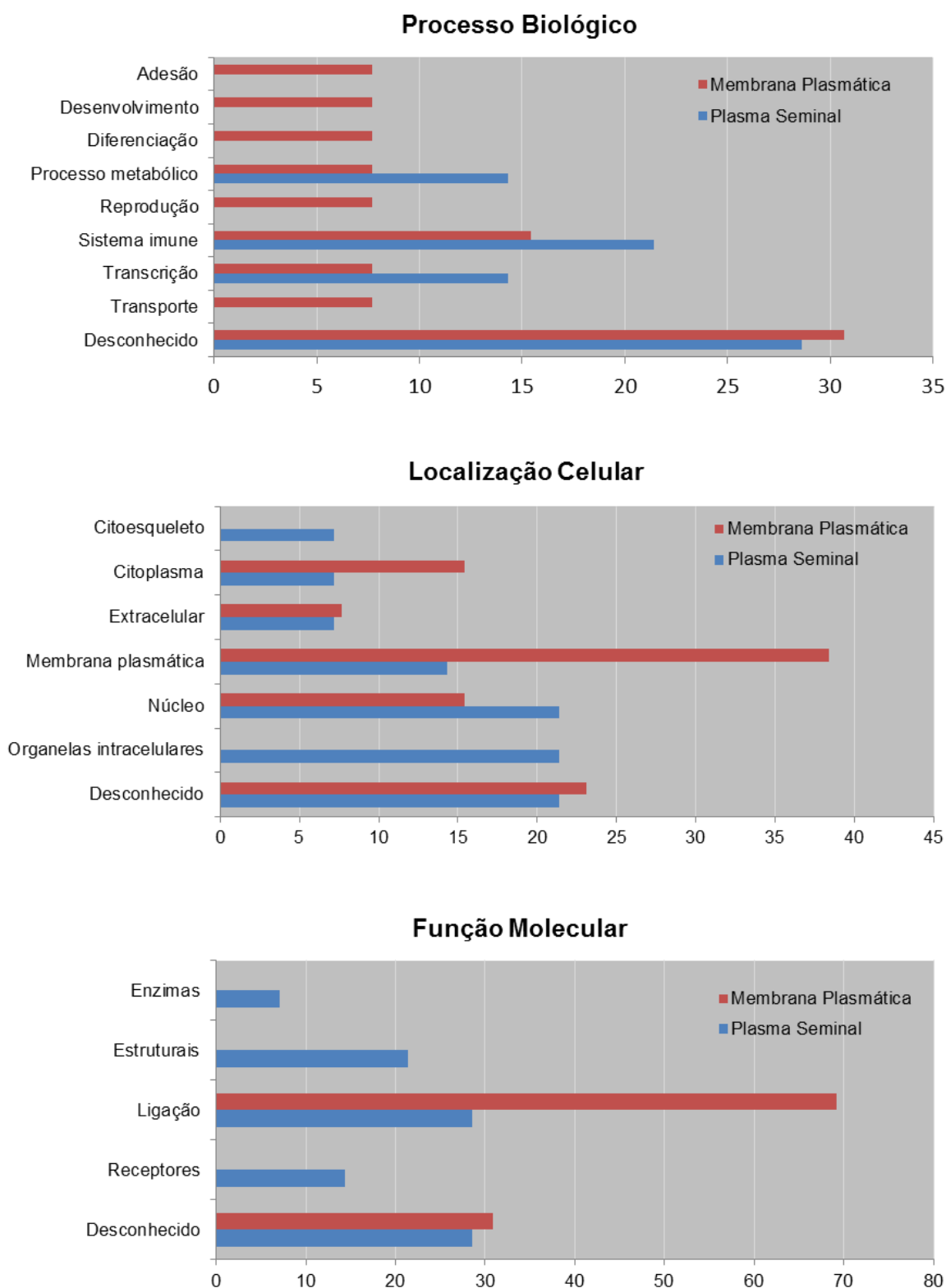


Fig. 2. Frequência (%) das categorias de processo biológico, localização celular e função molecular das proteínas do plasma seminal (A) e extrato de membrana plasmática (B) identificadas por MALDI TOF/TOF. As proteínas foram categorizadas de acordo com o banco de dados UniprotKB (www.uniprot.br).

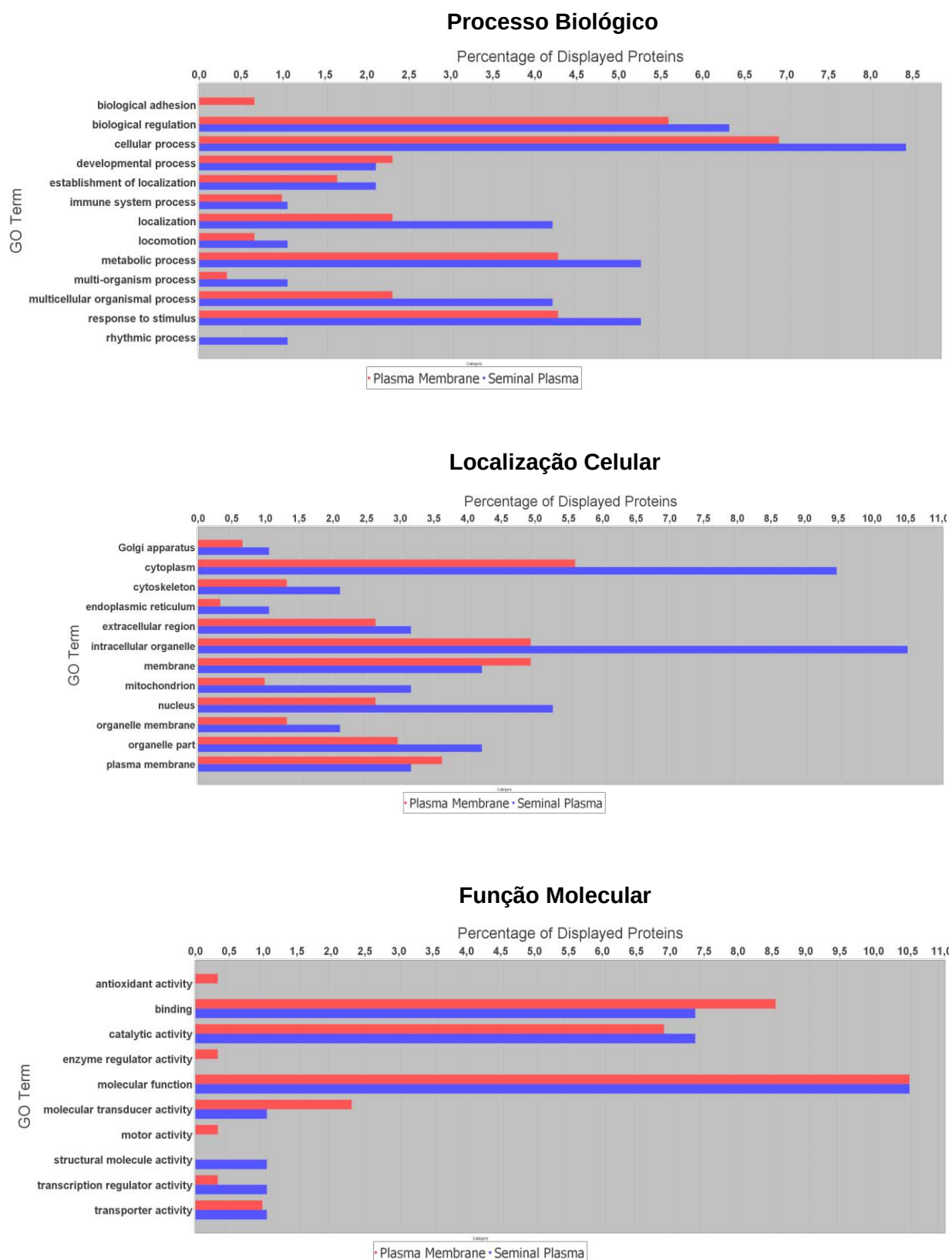


Fig. 3 Processos biológicos e funções moleculares do proteoma do plasma seminal (A) e extrato de membrana plasmática de espermatozoides equinos (B) identificado por LC-ESI QTOF e analisados no programa Scaffold Software 4.3.4.

Em relação a localização celular, as proteínas do plasma seminal foram classificadas em 48% de origem intracelular e 14% como proteínas de membrana. No extrato de membrana plasmática, foram encontradas 20% de proteínas de membrana e 17% proteínas intracelulares. Em ambas as amostras, 3% corresponderam a proteínas secretadas.

DISCUSSÃO

A abordagem proteômica utilizada neste estudo possibilitou a identificação das proteínas do plasma seminal e membrana plasmática em equinos e serve como base para outros estudos relacionados ao proteoma reprodutivo desta espécie, possibilitando a elucidação das funções biológicas destas proteínas e sua participação no metabolismo espermático e na fecundação.

Perfil protéico 2D SDS-PAGE

No perfil eletroforético do plasma seminal predominou proteínas de baixa massa molecular, corroborando com os dados de Frazer & Bucci (1996b) e Calvete et al. (1994) e foi observado que cerca de 80% das proteínas do PS equino são compostas por fragmentos com massa molecular abaixo de 35 kDa. O número de *spots* detectados no estudo de Novak et al. (2010) foi superior ao encontrado neste estudo, em vista da utilização da coloração com prata, a qual possibilita a identificação de *spots* contendo menos que 1 ng de proteína total (Weiss et al., 2009). A coloração utilizada neste estudo, comassie coloidal, possui menor sensibilidade (~10 ng) quando comparado com a coloração com prata, o que pode ter influenciado na ausência dos *spots*.

As constelações proteicas do plasma seminal encontradas neste estudo são similares aquelas demonstrados por Frazer & Bucci (1996b), com exceção da constelação 4 correspondente a constelação b dos referidos autores. Em ambos os estudos, o grupamento possui duas fileiras de polipeptídeos. No entanto, a constelação b, descrita por Frazer & Bucci (1996b), foi composta por 10 *spots* e neste estudo a constelação 4 por 8 *spots*. Provavelmente, os dois *spots* ausentes não puderam ser visualizados devido ao tamanho do gel utilizado (8.3 x 7.3 cm), o que impossibilitou a separação adequada dos fragmentos protéicos.

A identificação de diferentes *spots* como uma única proteína no plasma seminal (T-cell receptor beta-chain e 60S ribosomal protein L29-like) sugere a presença de

isoformas e a presença de diferentes isoformas com diferentes valores de ponto isoelétrico e massa molecular sugerem a ocorrência de modificações pós-traducionais.

A composição proteica de membranas espermáticas tem sido estudada em diversas espécies como em bovinos (Roncoletta et al., 2006), suínos (Ash et al., 1994) e humanos (Rajeev & Reedi, 2004). Em equinos, raros estudos descrevem proteínas isoladas da membrana espermática (Fayer-Hosken et al., 1991; Meyers, 2001; Gamboa & Santos, 2005) e de acordo com nosso conhecimento este é o primeiro relato a respeito do perfil proteico da membrana de espermatozoides desta espécie. Dacheux & Dacheux (2014) avaliaram o perfil protéico da membrana plasmática de espermatozoides do epidídimo equino. No entanto, não é possível comparar os nossos resultados com os dos autores em vista da diferente abordagem proteômica utilizada (1D SDS-PAGE) e não houve caracterização das proteínas.

A quantidade de *spots* observados neste estudo foi inferior ao número descrito por Novak et al. (2010), os quais estudaram a célula espermática de equinos. Tal diferença pode ser justificada pela metodologia utilizada. Novak et al. (2010) correlacionaram o perfil proteico dos espermatozoides com a fertilidade de garanhões. No entanto, a extração de proteínas espermáticas descrita por estes autores foi realizada utilizando-se um tampão de lise contendo agentes redutores, caotrópicos e detergente, o que promove a quebra de todas as membranas celulares e possibilita a presença de proteínas de compartimentos intracelulares juntamente com as proteínas da membrana espermática (Xu et al., 1994). Em humanos, tal fato foi comprovado por Xu et al. (1994) que observaram que o perfil 2D de membranas espermáticas é relativamente mais simples do que o perfil proteico de espermatozoides, na qual cerca de 85% da proteínas possui origem do citoplasma e de organelas subcelulares.

Apesar de Baker et al. (2002) terem demonstrado que a sonicação é o melhor método para identificação de polipeptídeos da membrana espermática, no presente estudo foram utilizados detergente e sonicação para a extração das proteínas da membrana o que também promoveu a contaminação do extrato com proteínas intracelulares, como observado nos resultados obtidos no MALDI TOF-TOF, porém em menor porcentagem.

Identificação por MALDI TOF/TOF

A maioria dos organismos não possui o genoma completamente sequenciado e apenas um pequeno número de sequências proteicas está disponível no banco de dados

(Chen et al., 2011). Em equinos, o genoma tem sido amplamente descrito (Caetano et al., 1999; Wade et al., 2009), no entanto, a maioria das proteínas encontra-se não caracterizada. Neste estudo, os dados obtidos no MALDI TOF/TOF foram submetidos a análise utilizando a taxonomia *Equus caballus* (Uniprot/Swiss-Prot) e somente 6 proteínas foram identificadas no plasma seminal e na membrana plasmática e 21 proteínas não foram caracterizadas. Desta forma, optamos por utilizar a taxonomia *Mammalia* na base de dados de proteínas NCBI nr, o que ocorre na maioria dos estudos que envolvem espécies que o proteoma não é totalmente conhecido (Druart et al., 2013; Rego et al., 2014).

A presença de proteínas ribossomais foi constatada no plasma seminal e na membrana plasmática do espermatozoide equino. A proteína ribossomal L35-like identificada na membrana plasmática pode ser um resquício do desenvolvimento da célula espermática, uma vez que partículas *ribossomo-like* são encontradas em regiões específicas da membrana acrossomal de espermátides (Mollenhauer & Morre, 1978) ou podem participar do processo de síntese proteica neste tipo celular. Já foi demonstrado que a célula espermática de mamíferos traduz mRNA nuclear codificado por meio de ribossomos tipo mitocondrial (Gur & Breibart, 2008). Além disso, uma grande parte das proteínas ribossomais são bifuncionais, ou seja, não são componentes integrais do ribossomo e exercem outras funções não relacionadas a síntese de proteínas (Wool, 1996). Estas proteínas já foram detectadas no plasma seminal de humanos (Sharma et al., 2013), no entanto, sua função neste fluido é desconhecida.

No plasma seminal, a fosfolipase A2 (PLA2) identificada pode estar envolvida na desestabilização da estrutura da membrana plasmática, processo fundamental na capacitação e reação acrossomal. Os produtos resultantes da ativação da PLA2 atuam como fusogênicos na membrana celular, permitindo a liberação de enzimas hidrolíticas, estas essenciais para a penetração do espermatozoide nas camadas acelulares que rodeiam o ócito (Roldan & Frago, 1993). Além disso, a fosfolipase A2 participa da biossíntese de prostaglandinas seminais (Kunze & Bohn, 1978). Em equinos, a PLA2 detectada no plasma seminal possui pI de 5,6 (Wurl & Kunze, 1985) sendo próximo ao valor de pI encontrado neste estudo (5,1). Visto a importância da PLA2 na função espermática e a presença desta proteína no plasma seminal equino sugere-se que esta possa um marcador molecular de fertilidade, já que a PLA2 do plasma seminal de touros foi correlacionada a fertilidade (Moura et al., 2006).

As imunoglobulinas (Ig) são encontradas no plasma seminal de diversas

espécies, tais como humanos (Rumke et al. 1974), búfalos indianos (Kulkarni et al., 1984) e cachacos (González-Cadavid, 2014). Em humanos, a concentração seminal de Ig é dependente da concentração sérica e a passagem de Igs ocorre através da transudação da circulação sanguínea (Rumke et al., 1974). Em maiores concentrações, as imunoglobulinas seminais estão associadas à infertilidade (Luckas et al., 1998). Em concentrações basais, estes efeitos não são observados, no entanto, não há estudos relatando o papel das imunoglobulinas no plasma seminal, provavelmente estas possuam efeito antimicrobiano no fluido das glândulas acessórias, devido a sua função imunológica. Ademais, o plasma seminal em equinos é mediador da resposta inflamatória pós-coital (Troedsson et al., 2005) e apesar da ejaculação ocorrer no óstio externo cervical, o sêmen entra no útero devido da alta pressão do processo ejaculatório (Senger, 2003). Em vista disso, as Igs do plasma seminal encontradas neste estudo podem participar da regulação da endometrite pós-coital em éguas.

A superfamília das imunoglobulinas (IgSF) são moléculas de adesão celular (expressas na superfície celular) caracterizada pela presença de um ou mais domínios com características semelhantes às imunoglobulinas (Harpaz & Chothia, 1994). A proteína transmembrana Izumo, integrante da IgSF, está presente na membrana interna acrossomal do espermatozoide e parece exercer papel fundamental na fusão entre os gametas (Inoue et al., 2005; Gupta & Bansal, 2010). Desta forma, a subunidade de Ig identificada no plasma seminal pode pertencer a IgSF, exercendo funções relacionadas a adesão celular e participando de alguma forma no processo de fertilização.

As *zinc-finger proteins* provavelmente constituem a maior família de fatores de transcrição; é frequentemente encontrada no plasma seminal de humanos (Kumar et al., 2009; Milardi et al., 2012; Vernekar et al., 2014) e foi considerada como uma proteína ligadora de heparina (HBP, Kumar et al., 2009). No entanto, não há relatos da presença desta proteína no plasma seminal equino e neste fluido podem representar resquícios do processo de espermatogênese ou alguma função desconhecida relacionada a fecundação e na formação da célula espermática (Kumar et al., 2009). Como mencionado anteriormente, as HBPs tem papel fundamental na ligação entre os gametas, podendo também ser importante na espécie equina, já que foi identificada no plasma seminal dos animais estudados.

Na membrana plasmática, de 14 proteínas identificadas oito possuem propriedades de ligação, como: *protein FAM110A*, *neuron navigator 2*, *MHC class II antigen*, *MHC class II antigen beta*, *gene B-50 protein*, *forkhead box*, *GTP-binding*

protein, kit ligand. Possivelmente, estas proteínas estão envolvidas nas etapas da fertilização tais como, reconhecimento do epitélio uterino, zona pelúcida e reconhecimento e interação entre gametas, em vista da função molecular e localização na membrana espermática.

A proteína do plasma seminal 2 (SP-2) identificada na membrana plasmática é secretada principalmente pela ampola e em menor proporção pela cauda do epidídimo e pertence ao grupo das proteínas com módulos de fibronectina tipo II (Fn-2). As SP-2 são homólogas as proteínas de ligação a heparina do plasma seminal bovino (BSP), que estão envolvidas na capacitação espermática (Ekhalasi-Hundrieser et al., 2005). Durante a ejaculação, essas proteínas interagem com os resíduos de colina dos fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide (Desnoyers & Manjunath, 1993), estimulando o efluxo de fosfolipídios e colesterol (Thérien et al., 1999). Desta forma, apesar da SP-2 estar presente no plasma seminal equino, esta proteína não foi detectada no fluido das glândulas anexas com a abordagem MALDI, pois apenas um seletor número de *spots* foi selecionado para identificação.

Identificação por ESI Q-TOF

Em condições fisiológicas, o fluido seminal possui função crucial na sobrevivência do espermatozoide e a interação deste fluido com as células espermáticas pode influenciar o sucesso da fertilização. A compreensão sobre a composição do plasma seminal é fundamental para o entendimento da fisiologia da reprodução e sua análise proteômica reflete o estado fisiológico/patológico do testículo, epidídimo e outras glândulas sexuais acessórias (Milardi et al., 2012).

Neste estudo, com a abordagem proteômica utilizada foi possível identificar 66 proteínas no plasma seminal. Druart et al. (2013) utilizaram uma tecnologia mais moderna para sequenciamento de aminoácidos (cromatografia líquida bidimensional e espectrometria de massas tandem) e identificaram 59 proteínas no plasma seminal equino. Certamente, que a qualidade das identificações encontradas por Druart et al. (2013) foi superior as identificações as deste estudo devido a alta sensibilidade do equipamento utilizado pelos autores. No entanto, a abordagem utilizada neste estudo possibilitou a identificação de 7 proteínas adicionais reportadas no estudo anterior. Até o momento, esta é mais extensa lista do proteoma do plasma seminal equino já identificado.

Grande número de proteínas identificadas no plasma seminal equino apresentou-

se apenas como proteínas previstas, o que limitou as informações sobre a ontologia gênica, ou seja, informações sobre seus processos biológicos, localização celular e funções moleculares. Dentre os polipeptídeos classificados foi observado maior proporção de proteínas relacionadas a regulação biológica e processos celulares. Com relação as proteínas ligadas a reprodução, destacam-se a proteína kallikrein-1E2 e proteínas associadas a espermatogênese.

As *kallikreins* são serina proteases e a *kallikrein* glandular, encontrada neste estudo, é secretada pela próstata e é expressa sob controle androgênico. As proteínas do plasma seminal equino SP-6 e SP-8 pertencem à família *kallikrein*, na qual a sequência do N-terminal de ambas as isoformas são homólogas ao antígeno prostático específico (PSA) humano (Topfer-Petersen et al., 2005). Novak et al. (2010) indicaram que o volume de fluido seminal e secreção prostática possa ter uma relação inversa a fertilidade, uma vez que observaram correlação negativa desta proteína com a fertilidade de garanhões.

As proteínas associadas à espermatogênese (SPATA) identificadas neste estudo possivelmente tem origem do fluido testicular (Drabovich et al., 2014) e podem ser candidatas a biomarcadores de infertilidade masculina (Drabovich et al., 2011). Além disso, a SPATA1 foi associada positivamente com a taxa de gestação por estro de éguas (Giesecke et al., 2008), o que confirma a sua importância como biomarcador nesta espécie.

No extrato de membrana plasmática, uma expressiva quantidade de proteínas foi identificada. Foi constatada a presença de proteínas de origem citoplasmática, indicando contaminação das amostras com componentes intraespermáticos. A ausência de um passo posterior para a purificação das proteínas da membrana pode ter sido a causa da contaminação das amostras, em vista dos resultados obtidos por Baker et al. (2002), que afirmaram que a utilização de um gradiente de separação isola as proteínas de cada compartimento da célula espermática. Experiências anteriores no nosso laboratório demonstraram que o uso do gradiente requer grande número de células para a recuperação de quantidade adequada de proteína total, para a utilização na eletroforese bidimensional, o que justificou nossa escolha.

Semelhante ao plasma seminal, muitas proteínas foram identificadas como previstas, dificultando a classificação quanto a ontologia gênica. Entretanto, diversas proteínas possuíram relação com a funcionalidade espermática como SP-1, receptores olfatórios, fosfatases, fibronectinas tipo III, caspases, proteína rica em cisteína, *heat*

shock proteins, inibina, receptor de prostaglandina, proteínas tirosina kinase, entre outras.

A SP-1 identificada na análise *shotgun* e assim como a SP-2 na abordagem MALDI na MP pertencem ao grupo das proteínas com módulos de Fn-2, estão envolvidas na capacitação espermática (Ekhalasi-Hundrieser et al., 2005).

Foram identificadas proteínas fibronectina tipo III (Fn-3) na MP. Kumar et al. (2009) identificaram proteínas com afinidade a heparina (HPB) no plasma seminal bovino, e dentre estas a Fn-3. As HPBs podem estar diretamente envolvidas nas etapas da fertilização com a capacitação espermática e reação acrossomal, podendo servir como biomarcadores de fertilidade (Kumar et al., 2009). Possivelmente estas proteínas tem origem do plasma seminal devido a sua função e localização no fluido das glândulas sexuais anexas na espécie bovina. Na espécie equina, esta foi a primeira descrição deste tipo proteico na MP, contudo sua função permanece desconhecida.

Foram detectados 4 tipos de receptores olfatórios (RO) na membrana plasmática. A proteína G acoplada o RO faz parte de uma extensa família multigene, na qual a expressão ectópica tem sido correlacionada a células testiculares e germinativas (Parmentier et al., 1992), já que não foi mucosa olfatória de cães (Vanderhaeghen et al., 1993). As proteínas RO parecem ter expressão nas espermátides redondas e alongadas; e na peça intermediária do espermatozoide maduro, indicando que as ROs testiculares estão envolvidas na maturação espermática, migração ou fertilização (Vanderhaeghen et al., 1993).

Com relação ao padrão comum entre as duas amostras biológicas, as classes proteicas similares presentes no plasma seminal e na membrana plasmática possuíram em sua maioria atividades de transcrição, atividade enzimática e metabolismo celular. Supostamente estas proteínas podem ter se associado a membrana plasmática durante a ejaculação ou são resquícios da maturação espermática e contribuem com a manutenção e funcionalidade espermática. Interessantemente, o espermatozoide é uma célula especializada que apresenta produtos de transcrição e tradução (Gur & Breitbart, 2008), contudo a síntese proteica é limitada (Amman et al., 1993). Estes resultados sugerem que as proteínas com atividades de transcrição, as quais foram encontradas em maior quantidade, podem estar envolvidas nesta síntese, durante a capacitação, no trato reprodutivo da fêmea anterior a fertilização e na embriogênese (Gur & Breitbart, 2008).

CONCLUSÃO

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a relatar de forma abrangente o proteoma do plasma seminal e do extrato de membrana plasmática de espermatozoides equinos. A análise proteômica revelou tipo proteicos semelhantes entre as duas amostras biológicas sugerindo que podem ser resquícios da maturação pós-testicular ou associações durante a ejaculação. Ademais, a identificação do proteoma seminal pode proporcionar um melhor entendimento sobre a fisiologia da fertilidade de garanhões e da identificação de marcadores moleculares de fertilidade.

AGRADECIMENTO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil.

REFERÊNCIAS

- Amann RP & Graham JK. (1993) Spermatozoal function. In: Equine reproduction (AO McKinnon & JL Voss, pp. 715-745. Philadelphia: Williams & Wilkins.
- Amann RP, Cristanelli MJ & Squires EL. (1985) Proteins in stallion seminal plasma. *J Reprod Fertil* 35, 113–120.
- Ash K, Berger T, Horner CM & Calvert CC. (1995) Identification of porcine sperm plasma membrane proteins that may play a role in sperm-egg fusion. *Zygote* 3, 163-70.
- Baker SS, Cardullo RA & Thaler CD. (2002) Sonication of mouse sperm membranes reveals distinct protein domains. *Biol Reprod* 66, 57-64.
- Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB & Fayrer-Hosken RA. (1999) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Therio* 52, 863-873.
- Caballero I, Vázquez JM, Mayor GM, Alminãna C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J & Martínez EA. (2009) PSP-I / PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Int J Androl* 32, 505–513.
- Caetano AR, Shiue Y & Murray JD. (1999) A comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). *Genome Res* 12, 1220 - 1240.
- Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E & Topfer-Petersen E. (1994) Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reprod Domest Anim* 29, 411 - 426.
- Chen J, Shi J, Tian D, Yang L, Luo Y, Yin D & Hu X. (2011) Improved protein identification using a species-specific protein/peptide database derived from expressed sequence tags. *POJ* 4, 257-263.
- Dacheux JL & Dacheux F. (2014) New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reprod* 147, 27-42.
- Dacheux JL, Gatti JL & Dacheux F. (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 61, 7 -17.

- Desnoyers L & Manjunath P. (1993) Interaction of a novel class of phospholipid-binding proteins of bovine seminal fluid with different affinity matrices. *Arch Biochem Biophys* 305, 341-349.
- Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. (2011) Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics* 10, M110.004127.
- Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. (2014) Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol* 11, 278-288.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG & de Graaf SP. (2013) Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* 91, 13-22.
- Ekhlas-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P & Töpfer-Petersen E. (2005) Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 70, 45-57.
- Fayrer-Hosken RA, Caudle AB & Shur BD. (1991) Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Mol Reprod Dev* 28, 74-78.
- Frazer GS & Bucci DM. (1996a) Characterization of the proteins in equine seminal plasma. *Therio* 46, 579 - 591.
- Frazer GS & Bucci DM. (1996b) Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Therio* 46, 1389 - 1402.
- Gamboa S, Ramalho-Santos J. (2005) Snare proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Therio* 64: 275-291.
- Gatti JL, Castela S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V & Dacheux JL. (2004) Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 82, 321-339.
- Giesecke K, Hamann H, Stock KF, Woehlke A, Sieme H, Distl O. (2009) Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. *Anim Genet* 40, 359-65.
- González-Cadavid V, Martins JAM, Moreno FB, Andrade TS, Santos ACL, Monteiro-Moreira ACO, et al. et Moreira RA. (1998) Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *J Reprod Immunol* 37(2), 171-180.
- Gupta SK, Bansal P. (2010) Vaccines for immunological control of fertility. *Reprod Med Biol* 9:61-71.
- Gur Y & Breitbart H. (2008) Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol and Cell Endoc* 282, 45-55.
- Harpaz H & Chothia C. (1994) Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol* 238; 528-539.
- Heise A, Kähn W, Volkmann DH, Thompson PN & Gerber D. (2010) Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 118, 48-53.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.
- Jobim MIM, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H & Mattos RC. (2011) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Therio* 76, 765 - 771.
- Kareskoski M, Sankari S, Johannisson A, Kindahl H, Andersson M & Katila T. (2011) The association of the presence of seminal plasma and its components with sperm longevity in fractionated stallion ejaculates. *Reprod Domest Anim* 46, 1073-1081.

- Kulkarni BA. (1984) Seminal plasma immunoglobulins of the Indian buffalo. *Arch Androl.* 13(1), 87-91.
- Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, Singh TP, Yadav S. (2009) Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J Biosci* 34, 899–908.
- Kunze H & Bohn E. (1978) Phospholipase A2 and prostaglandins in human seminal plasma. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 3, 159-165.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Luckas MJ, Buckett WM, Aird IA, Johnson PM & Lewis-Jones DI. (1998) Seminal plasma immunoglobulin concentrations in autoimmune male subfertility. *J Reprod Immunol* 37(2), 171-180.
- Maňásková P, Balinová P, Kraus M, Tichá M & Jonáková V. (2003) Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. *Am J Reprod Immunol* 50, 399 - 410.
- Meyers SA. (2001) Equine sperm–oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod Sci* 68, 291–303.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messina I, Pontecorvi A, De Marinis L, Castagnola M, Marana R. (2012) Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril* 97, 67-73.
- Mollenhauer HH & Morré DJ. (1978) Structural compartmentation of cytosol: zones of exclusion, zones of adhesion, cytoskeletal and intercisternal elements. *Subcell Biochem* 5, 327-359.
- Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua Jr JA, Melo CM, Maziero RR, Avanzi BR, Alvarenga MA & Guasti PN. (2011) Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 127, 197-201.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA & Killian GJ. (2006) Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl* 27, 201-211.
- Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR & Dixon WT. (2010) Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Therio* 74, 956–967.
- Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'aqua Jr JA, Zahn FS & Alvarenga MA. (2008) Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 107, 293-301.
- Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Schiffmann S, Lefort A, Eggerickx D. (1992) Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature* 355, 453–455.
- Rajeev SK & Reddy KV. (2004) Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod.* 19, 234-242.
- Rebouças NA. In: AIRES, M.M. (Org.). *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1999, p. 27.
- Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Corbet NJ, Corbet DH, Burns BM, Boe-Hansen GB & McGowan. (2014) Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci* 148, 1-17.
- Roldan ER & Fraggio C. (1993) Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem* 268, 13962 - 13970.

- Roncoletta M, Morani ESC, Esper CR, Barnabe VH & Franceschini PH. (2006) Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci* 91, 77–87.
- Rümke P. (1974) The origin of immunoglobulins in semem. *Clin Exp Immunol* 17, 287–297.
- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E. (2013) Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. *Reprod Biol Endocrin* 11, 38.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV & Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856 – 2860.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76–85.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. (1999) Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61, 590–598.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kkirchhoff C, Leeb T & Sieme H. (2005) The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci* 89, 159–170.
- Troedsson, MHT, Desvouses, AS, Alghamdi, AS, Dahms, B, Dow, CA, Hayna, J, Valesco, R, Collahan, PT, Macpherson, ML, Pozor, M, Buhi, WC. (2005) Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci* 89, 171–186.
- Vernekar VJ, Velhal SM, Kadam KM, Bandivdekar. (2014) Characterization of human seminal plasma protein fractions for anti-HIV activities. *JID* 113, 277–288.
- Vanderhaeghen P, Schurmans S, Vassart G, Parmentier M. (1997) Molecular cloning and chromosomal mapping of olfactory receptor genes expressed in the male germ line: evidence for their wide distribution in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 283–287.
- Villén J & Gygi SP. (2008) The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 3, 1630–1638.
- Von Fellenberg R, Zweifel HR, Grunig G & Pellegrini A. (1985) Proteinase inhibitors of horse seminal plasma: A high molecular mass, acid-soluble proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 366, 705 – 712.
- Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Imsland F, et al. et Lindblad-Toh K. (2009) Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865–867.
- Weiss, W, Weiland, F. & Görg, A. (2009), Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis, In: J. Reinders & A. Sickmann, eds, „Proteomics“, Vol. 564 of *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, pp. 59–82.
- Wool IG. (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 21, 164–165.
- Wurl M & Kunze H. (1985) Purification and properties of phospholipase A2 from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 834(3), 411–418.
- Xu C, Rigney DR & Anderson DJ. (1994) Two-dimensional electrophoretic profile of human sperm membrane proteins. *J Androl* 15, 595–602.
- Zahn FS, Papa FO, Melo CM, Brisola ML. (2005) Protein profile of equine seminal plasma: correlation to semen freezability. *Anim Reprod Sci* 89, 313–315.

Arquivo suplementar 1: Proteínas identificadas no plasma seminal de equinos.

Proteínas Identificadas	Número de Acesso	Massa Molecular	Probabilidade de Identificação	Número de Peptídeos Únicos	Cobertura de Sequência
Aminomethyltransferase, mitochondrial	gi 11132475	44 kDa	100%	1	2,73%
Contactin associated protein-like 4, isoform CRA_a	gi 119616016	145 kDa	100%	1	1,15%
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein	gi 1174470	81 kDa	100%	1	1,70%
FERM domain-containing protein 6	gi 34098515	72 kDa	100%	1	2,57%
hCG1641825, isoform CRA_a	gi 119583781	6 kDa	100%	1	27,60%
hCG1642128	gi 119616423	16 kDa	100%	1	10,80%
hCG1649526, isoform CRA_a, partial	gi 119583049	16 kDa	100%	1	8,11%
hCG1793600, isoform CRA_a, partial	gi 119606994	27 kDa	100%	1	13,00%
hCG1999621, partial	gi 119585288	12 kDa	100%	1	12,30%
hCG2032628, partial	gi 119587905	19 kDa	100%	1	6,42%
hCG2040720, partial	gi 119598727	8 kDa	100%	1	17,80%
Hcg2045706	gi 119622608	6 kDa	100%	1	27,50%
HemK methyltransferase family member 1, isoform CRA_a	gi 119585529	38 kDa	100%	1	3,55%
Kallikrein-1E2	gi 54036110	29 kDa	100%	1	3,83%
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	gi 1172047	56 kDa	100%	1	2,22%
Metal transporter CNNM1	gi 157412265	104 kDa	100%	1	1,58%
Multidrug resistance protein 1B	gi 126927	141 kDa	100%	1	1,02%
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A/B/C	gi 219842199	18 kDa	100%	1	5,49%
Period circadian protein homolog 1	gi 118572686	136 kDa	100%	1	0,93%
PREDICTED: 39S ribosomal protein L47	gi 640777981	30 kDa	100%	1	4,80%
PREDICTED: ataxin-10 isoform X1	gi 655897275	53 kDa	100%	1	2,53%
PREDICTED: calpain-15	gi 641731196	117 kDa	99%	1	0,63%
PREDICTED: cdc42 effector protein 4	gi 640797344	34 kDa	100%	1	3,43%
PREDICTED: cell death activator CIDE-A, partial	gi 635100330	42 kDa	100%	1	2,62%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 39	gi 640819842	110 kDa	100%	1	1,06%
PREDICTED: dynein heavy chain 9, axonemal	gi 634868312	514 kDa	100%	1	0,20%

Arquivo suplementar 1 (Continua)

PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRIM17-like	gi 664751775	54 kDa	100%	1	2,32%
PREDICTED: FERM and PDZ domain-containing protein 3	gi 655877256	188 kDa	100%	1	0,70%
PREDICTED: hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial isoform	gi 641714027	35 kDa	100%	1	3,37%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: A disintegrin and metalloproteinase	gi 640805014	114 kDa	100%	1	1,24%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: age-related maculopathy	gi 635057063	18 kDa	100%	1	5,42%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: coiled-coil domain-containing protein 106	gi 634852322	65 kDa	100%	1	1,97%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: EVI5-like protein	gi 655887699	95 kDa	100%	1	1,69%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: myosin-6	gi 655864030	190 kDa	100%	1	0,92%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative zinc finger protein 852	gi 655833526	61 kDa	100%	1	1,85%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serotransferrin-like	gi 664708399	110 kDa	100%	1	1,69%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: unconventional myosin-XV	gi 664746629	373 kDa	100%	1	0,39%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 208-like	gi 641737732	114 kDa	100%	1	1,21%
PREDICTED: MAP7 domain-containing protein 1 isoform X1	gi 634867141	94 kDa	100%	1	2,00%
PREDICTED: myotubularin-related protein 4 isoform X1	gi 664708292	135 kDa	100%	1	0,91%
PREDICTED: neuroblast differentiation-associated protein AHNK	gi 641736698	420 kDa	100%	1	0,28%
PREDICTED: NLR family member X1	gi 634835883	108 kDa	99%	1	0,82%
PREDICTED: phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	gi 640800728	257 kDa	100%	1	0,52%
PREDICTED: probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial isoform X1	gi 664757668	102 kDa	100%	1	1,22%
PREDICTED: protein CREG2	gi 634829034	32 kDa	99%	1	2,76%
PREDICTED: protein PTHB1 isoform X1	gi 641692391	98 kDa	100%	1	1,92%
PREDICTED: protein Shroom3	gi 655857636	212 kDa	100%	1	0,61%
PREDICTED: spermatogenesis-associated protein 21-like	gi 634834247	37 kDa	100%	1	3,99%
PREDICTED: spermatogenesis-associated protein 31D1-like	gi 640795915	147 kDa	100%	1	0,76%
PREDICTED: T-cell surface antigen CD2	gi 641712466	39 kDa	100%	1	3,15%
PREDICTED: translational activator of cytochrome c oxidase 1	gi 640793147	26 kDa	100%	1	6,28%

Arquivo suplementar 1 (Continua)

PREDICTED: uncharacterized protein KIAA1683 homolog	gi 634861167	248 kDa	100%	1	0,51%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100353975	gi 655883689	384 kDa	100%	1	0,52%
PREDICTED: XIAP-associated factor 1 isoform X3	gi 664721080	19 kDa	100%	1	5,81%
PREDICTED: zinc finger protein 256-like	gi 641737163	63 kDa	100%	1	2,19%
PREDICTED: zinc finger protein 260-like isoform X3	gi 291410057	82 kDa	100%	1	1,68%
PREDICTED: zinc finger protein 717-like isoform X1	gi 655894793	73 kDa	100%	1	1,43%
Protein FAM13C	gi 341940679	67 kDa	100%	1	1,83%
Protein FAM71B	gi 544584807	69 kDa	100%	1	2,56%
Protocadherin-16 precursor	gi 242397490	346 kDa	100%	1	0,40%
RIO kinase 1 (yeast)	gi 119575614	66 kDa	100%	1	2,99%
Similar to RIKEN cDNA 8030451K01, isoform CRA_a	gi 119629017	16 kDa	100%	1	8,67%
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	gi 17367415	271 kDa	100%	1	0,54%
T-box transcription factor TBX1	gi 84028272	52 kDa	100%	1	3,34%
Tuberous sclerosis 1	gi 119608427	130 kDa	100%	1	0,86%
Uncharacterized protein C1orf226	gi 189040660	29 kDa	100%	1	3,31%

Arquivo suplementar 2: Proteínas identificadas no extrato de membrana plasmática de espermatozoides equinos.

Proteínas Identificadas	Número de Acesso	Massa Molecular	Probabilidade de Identificação	Número de Peptídeos Únicos	Cobertura de Sequência
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2	gi 158513398	135 kDa	100%	1	0,93%
A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9, isoform CRA_d	gi 119597269	456 kDa	100%	1	0,41%
Adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2	gi 119570618	21 kDa	100%	1	4,39%
Adenylate cyclase 4, isoform CRA_a	gi 119586427	120 kDa	100%	1	0,84%
AKT1 substrate 1 (proline-rich), isoform CRA_b	gi 119572955	29 kDa	100%	1	6,88%
Anaphase-promoting complex subunit 2	gi 341940216	95 kDa	100%	1	2,75%
Angiomotin, isoform CRA_a	gi 119623031	118 kDa	100%	1	2,58%
AP-1 complex subunit beta-1	gi 341940229	104 kDa	100%	1	2,97%
ATG7 autophagy related 7 homolog, isoform CRA_a	gi 119584497	78 kDa	100%	1	1,99%
Bicaudal D homolog 1, isoform CRA_a	gi 119608938	100 kDa	100%	1	1,60%
Bile salt export pump	gi 12585136	146 kDa	100%	1	1,14%
Bone morphogenetic protein receptor type-2	gi 10719913	115 kDa	100%	1	2,41%
CD48 antigen	gi 114873	28 kDa	100%	1	6,67%
Cdc2-related kinase, arginine/serine-rich, isoform CRA_a	gi 119580980	164 kDa	100%	1	0,67%
Chromosome 16 open reading frame 24	gi 119606152	25 kDa	100%	1	7,23%
Chromosome 6 open reading frame 60, isoform CRA_a	gi 119568573	133 kDa	100%	1	1,23%
Chromosome 8 open reading frame 44, isoform CRA_a	gi 119607323	18 kDa	100%	1	15,70%
Coagulation factor X precursor	gi 189027044	52 kDa	100%	1	1,92%
Coiled-coil domain-containing protein 4	gi 327478588	58 kDa	100%	1	2,25%
Complement component C8 beta chain	gi 61211636	66 kDa	100%	1	2,21%
Cordon-bleu protein-like 1	gi 118568014	132 kDa	100%	1	1,00%
COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	gi 119614955	18 kDa	99%	1	5,19%
Creatine kinase S-type, mitochondrial precursor	gi 251823966	47 kDa	100%	1	3,34%
D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein, isoform	gi 119572757	21 kDa	100%	1	4,95%
Deltex homolog 2	gi 525343981	62 kDa	100%	1	2,26%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

Deoxyribonuclease I-like 3, isoform CRA_a	gi 119585762	36 kDa	100%	1	7,21%
DmX-like protein 1	gi 81911500	336 kDa	100%	1	0,76%
Doublecortin and CaM kinase-like 1, isoform CRA_a	gi 119628955	81 kDa	100%	1	2,06%
dpy-19-like 2, isoform CRA_a	gi 119617523	24 kDa	100%	1	4,81%
Extra spindle poles like 1, isoform CRA_a	gi 119617087	233 kDa	100%	1	0,85%
Follistatin-related protein 1	gi 341940715	35 kDa	100%	1	6,86%
Glucose-6-phosphate translocase	gi 51592076	46 kDa	100%	1	7,69%
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A precursor	gi 140971205	165 kDa	100%	1	2,12%
Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase, isoform CRA_b	gi 119613716	172 kDa	100%	1	0,99%
Glyceronephosphate O-acyltransferase	gi 119590359	77 kDa	100%	1	3,97%
G-protein signalling modulator 1, isoform	gi 119608624	59 kDa	100%	1	2,81%
hCG1641134, isoform CRA_a	gi 119569349	38 kDa	100%	1	3,86%
hCG19253, isoform CRA_a	gi 119597391	579 kDa	100%	1	0,57%
hCG19796, isoform CRA_c	gi 119581720	135 kDa	100%	1	1,60%
hCG1981156, isoform CRA_a	gi 119582799	12 kDa	100%	1	9,35%
hCG1998680, isoform CRA_a, partial	gi 119612917	92 kDa	100%	1	1,44%
hCG2019100, isoform CRA_a	gi 119596293	19 kDa	100%	1	11,20%
hCG2036582, isoform CRA_b	gi 119627501	366 kDa	100%	1	0,60%
hCG2036808, isoform CRA_c	gi 119613661	73 kDa	100%	1	2,33%
hCG2038714, partial	gi 119617686	17 kDa	99%	1	4,94%
hCG41091, isoform CRA_a	gi 119580153	182 kDa	100%	1	1,37%
Hect domain and RLD 6, isoform CRA_b	gi 119626424	116 kDa	100%	1	1,07%
Heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan), isoform CRA_a	gi 119615400	381 kDa	100%	1	0,25%
Histocompatibility minor 13	gi 157823209	40 kDa	100%	1	4,12%
Homeobox B2	gi 114053055	33 kDa	100%	1	5,57%
Homeobox D1	gi 119631485	34 kDa	100%	1	5,18%
Hypothetical protein LOC55610, isoform b, isoform CRA_a	gi 119597221	53 kDa	100%	1	2,18%
Immunoglobulin heavy chain variable region, partial	gi 630868442	12 kDa	100%	1	10,10%
Immunoglobulin light chain variable region, partial	gi 662565264	12 kDa	100%	1	23,40%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

Inhibin alpha chain	gi 124273	39 kDa	100%	1	2,50%
Interferon-inducible GTPase 5	gi 122138669	51 kDa	100%	1	5,81%
Interleukin-17B	gi 20143876	20 kDa	100%	1	14,40%
Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1	gi 119589802	36 kDa	100%	1	6,65%
KIAA1529, isoform CRA_a	gi 119579244	191 kDa	100%	1	0,91%
Kinesin family member 4A, isoform CRA_a	gi 119625746	140 kDa	100%	1	0,89%
LAG1 longevity assurance homolog 2, isoform CRA_a	gi 119573882	45 kDa	100%	1	5,26%
Laminin subunit alpha-1 precursor	gi 117168301	338 kDa	100%	1	0,88%
LIM domain 7, isoform CRA_a	gi 119600955	155 kDa	100%	1	0,88%
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	gi 48427849	92 kDa	100%	1	2,04%
MDAC1	gi 119592778	19 kDa	100%	1	9,60%
Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	gi 544584757	31 kDa	100%	1	7,17%
Methyltransferase-like protein 6	gi 81910851	33 kDa	100%	1	6,62%
Mitogen-activated protein kinase 13	gi 12644541	42 kDa	100%	1	5,48%
MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2, isoform CRA_b	gi 119613699	38 kDa	100%	1	2,69%
MORC family CW-type zinc finger 1	gi 119600120	113 kDa	100%	1	1,93%
MutL homolog 3 (E. coli), isoform CRA_a	gi 119601617	163 kDa	100%	1	0,97%
Myosin XVIIIIB, isoform CRA_a	gi 119580106	272 kDa	100%	1	0,45%
N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta	gi 119618088	118 kDa	100%	1	1,64%
NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 9, isoform CRA_a	gi 119592817	102 kDa	100%	1	1,79%
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	gi 115502490	24 kDa	100%	1	10,50%
NADH dehydrogenase subunit 5	gi 608788079	68 kDa	100%	1	4,64%
Nitric oxide synthase 3	gi 119574454	133 kDa	100%	1	1,08%
Non-specific lipid-transfer protein	gi 54036166	59 kDa	100%	1	3,66%
Nuclear distribution gene C homolog	gi 119628185	38 kDa	100%	1	4,23%
Nuclear transcription factor, X-box binding 1, isoform CRA_a	gi 119578911	125 kDa	100%	1	2,40%
Omega-amidase NIT2	gi 122143922	31 kDa	100%	1	10,50%
Peroxiredoxin-6	gi 5902791	25 kDa	100%	1	7,59%
Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140kDa	gi 119625924	134 kDa	100%	1	0,94%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: 1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase isoform X1	gi 634821682	238 kDa	100%	1	0,95%
PREDICTED: 40S ribosomal protein S10	gi 664742702	18 kDa	100%	1	11,90%
PREDICTED: acyl-coenzyme A thioesterase THEM5	gi 641712534	27 kDa	100%	1	4,92%
PREDICTED: ADP-ribose pyrophosphatase, mitochondrial	gi 634878583	30 kDa	100%	1	6,30%
PREDICTED: afadin	gi 664699290	192 kDa	100%	1	1,35%
PREDICTED: alpha-(1,3)-fucosyltransferase 10	gi 291386086	56 kDa	100%	1	1,87%
PREDICTED: alpha-2-macroglobulin	gi 634838029	168 kDa	100%	1	0,73%
PREDICTED: amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]	gi 640781598	86 kDa	100%	1	1,46%
PREDICTED: anoctamin-6	gi 641700513	108 kDa	100%	1	3,01%
PREDICTED: arf-GAP with dual PH domain-containing protein 2	gi 641713456	36 kDa	100%	1	5,57%
PREDICTED: arylacetamide deacetylase-like	gi 634846297	46 kDa	100%	1	4,76%
PREDICTED: ATP synthase subunit s-like protein isoform X1	gi 635039195	30 kDa	100%	1	5,34%
PREDICTED: ATP-binding cassette sub-family B member 10	gi 634841722	92 kDa	100%	1	1,97%
PREDICTED: basic proline-rich protein-like	gi 664700640	24 kDa	100%	1	6,55%
PREDICTED: beta/gamma crystallin domain-containing protein 3	gi 635122483	330 kDa	99%	1	0,27%
PREDICTED: beta-parvin	gi 641727191	35 kDa	100%	1	4,81%
PREDICTED: biorientation of chromosomes in cell division protein	gi 664701919	335 kDa	100%	1	0,32%
PREDICTED: brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange	gi 641690750	240 kDa	100%	1	0,64%
PREDICTED: C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	gi 664748155	101 kDa	100%	1	3,10%
PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	gi 640803577	65 kDa	100%	1	4,60%
PREDICTED: calpain-11 isoform X1	gi 664762818	95 kDa	100%	1	2,84%
PREDICTED: cardiomyopathy-associated protein 5, partial	gi 664739604	467 kDa	100%	1	0,24%
PREDICTED: caspase recruitment domain-containing protein 6	gi 634875237	115 kDa	100%	1	1,28%
PREDICTED: cell division cycle-associated protein 2	gi 640816456	112 kDa	100%	1	0,98%
PREDICTED: centromere protein C isoform X1	gi 635042408	108 kDa	100%	1	1,56%
PREDICTED: centromere protein U isoform X1	gi 664716971	48 kDa	100%	1	4,42%
PREDICTED: choline transporter-like protein 2 isoform X2	gi 641731906	80 kDa	100%	1	1,28%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 18	gi 634835008	192 kDa	100%	1	0,84%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 24 isoform X1	gi 635108696	38 kDa	100%	1	8,12%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 40	gi 664711440	135 kDa	100%	1	0,92%
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 93 isoform X1	gi 655826796	74 kDa	100%	1	1,73%
PREDICTED: collagen alpha-1(VII) chain	gi 634888715	299 kDa	100%	1	0,40%
PREDICTED: collagen alpha-1(XIX) chain-like	gi 664774383	66 kDa	100%	1	2,66%
PREDICTED: collagen alpha-1(XV) chain	gi 635072360	142 kDa	100%	1	2,02%
PREDICTED: cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1	gi 655680672	59 kDa	100%	1	2,15%
PREDICTED: cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1	gi 640801615	57 kDa	100%	1	4,80%
PREDICTED: cytochrome P450 2J2-like	gi 634879130	27 kDa	100%	1	6,44%
PREDICTED: cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1	gi 641717760	493 kDa	100%	1	0,56%
PREDICTED: dapper homolog 3-like	gi 655901061	25 kDa	100%	1	5,37%
PREDICTED: death-associated protein kinase 3	gi 634876653	53 kDa	100%	1	6,17%
PREDICTED: DNA repair and recombination protein RAD54B	gi 634831604	97 kDa	100%	1	1,51%
PREDICTED: dynein heavy chain 8, axonemal	gi 634844331	520 kDa	100%	1	0,33%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase CHFR isoform X1	gi 635069462	74 kDa	100%	1	3,45%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase MIB1	gi 640784713	134 kDa	100%	1	1,63%
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	gi 634823085	81 kDa	100%	1	2,14%
PREDICTED: FAST kinase domain-containing protein 2	gi 634822040	80 kDa	100%	1	3,74%
PREDICTED: fer-1-like protein 5	gi 664770082	239 kDa	100%	1	0,63%
PREDICTED: filaggrin	gi 655846601	179 kDa	100%	1	0,54%
PREDICTED: glycoprotein hormones alpha chain	gi 634826214	14 kDa	100%	1	13,30%
PREDICTED: heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	gi 635030501	80 kDa	100%	1	3,55%
PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3-like	gi 640796250	35 kDa	100%	1	6,73%
PREDICTED: hornerin-like	gi 655902964	45 kDa	100%	1	3,22%
PREDICTED: hydrocephalus-inducing protein homolog, partial	gi 664726912	528 kDa	100%	1	0,26%
PREDICTED: hypoxia-inducible factor 1-alpha isoform X1	gi 641697495	80 kDa	100%	1	1,96%
PREDICTED: inner nuclear membrane protein Man1	gi 634853456	88 kDa	100%	1	3,66%
PREDICTED: integrator complex subunit 2	gi 641716525	134 kDa	100%	1	1,16%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: intraflagellar transport protein 81 homolog	gi 641704285	79 kDa	100%	1	3,85%
PREDICTED: IQ and AAA domain-containing protein 1 isoform X1	gi 635061722	97 kDa	100%	1	2,16%
PREDICTED: kinesin-like protein KIF27, partial	gi 664749494	150 kDa	100%	1	0,92%
PREDICTED: Krueppel-like factor 10	gi 655689215	57 kDa	100%	1	4,54%
PREDICTED: Krueppel-like factor 11 isoform X1	gi 635082653	55 kDa	100%	1	5,27%
PREDICTED: laminin subunit beta-2-like	gi 641694319	162 kDa	100%	1	0,59%
PREDICTED: la-related protein 4	gi 641701093	81 kDa	100%	1	1,50%
PREDICTED: leucine-rich repeat and calponin homology	gi 640812520	32 kDa	100%	1	9,96%
PREDICTED: leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein	gi 634883637	189 kDa	100%	1	1,32%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 28S ribosomal protein S6,	gi 655873428	14 kDa	100%	1	10,40%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: aldehyde dehydrogenase X	gi 655600437	59 kDa	100%	1	3,08%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ankyrin repeat domain-containing	gi 635094634	28 kDa	100%	1	10,40%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: caspase-12-like	gi 655603032	50 kDa	100%	1	2,02%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: coiled-coil domain-containing	gi 655758534	39 kDa	100%	1	3,20%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: disheveled-associated activator of	gi 664774356	108 kDa	100%	1	1,40%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: double-stranded RNA-binding protein	gi 640801892	56 kDa	100%	1	5,08%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: dynein heavy chain	gi 664730311	539 kDa	100%	1	0,42%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: fibrinogen C domain-containing	gi 655897059	50 kDa	100%	1	3,69%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: fibronectin type III and SPRY	gi 655850638	53 kDa	100%	1	4,03%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: formin-1	gi 664724677	154 kDa	100%	1	0,65%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: glutathione peroxidase 1	gi 635118737	22 kDa	100%	1	13,90%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nebulin	gi 655827380	878 kDa	100%	1	0,30%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: nik-related protein kinase	gi 641730564	180 kDa	100%	1	1,64%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: olfactory receptor 4F17-like	gi 634898427	34 kDa	100%	1	2,95%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: potassium channel subfamily U	gi 641710652	127 kDa	100%	1	1,67%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative ciliary rootlet	gi 640790322	260 kDa	100%	1	0,94%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: relaxin-3 receptor 2	gi 641727964	42 kDa	100%	1	4,96%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: selenoprotein M	gi 664768372	13 kDa	100%	1	23,30%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine/threonine-protein kinase	gi 635029485	52 kDa	100%	1	3,10%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: structure-specific endonuclease	gi 640824500	223 kDa	100%	1	0,74%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: testis- and ovary-specific PAZ	gi 634872786	188 kDa	99%	1	0,48%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein	gi 640817719	48 kDa	100%	1	5,76%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein	gi 664709845	88 kDa	100%	1	3,75%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein 517	gi 664734403	55 kDa	100%	1	2,41%
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger protein OZF-like	gi 634896539	56 kDa	100%	1	2,63%
PREDICTED: membrane-spanning 4-domains subfamily A member 14	gi 655603912	107 kDa	100%	1	1,92%
PREDICTED: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 isoform	gi 635110291	144 kDa	100%	1	1,08%
PREDICTED: modulator of retrovirus infection homolog	gi 640793986	17 kDa	100%	1	7,10%
PREDICTED: nebulin-related-anchoring protein isoform X1	gi 641707162	197 kDa	100%	1	0,98%
PREDICTED: negative regulator of reactive oxygen species	gi 664749197	77 kDa	100%	1	3,90%
PREDICTED: nuclear protein MDM1	gi 640816001	98 kDa	100%	1	1,87%
PREDICTED: nuclear receptor subfamily 1 group I member 2	gi 641711390	44 kDa	99%	1	2,11%
PREDICTED: nucleolar protein 56	gi 641701273	66 kDa	100%	1	3,20%
PREDICTED: nucleolar protein 6 isoform X1	gi 635073081	128 kDa	100%	1	2,79%
PREDICTED: olfactory receptor 10AG1-like, partial	gi 655604077	36 kDa	100%	1	10,30%
PREDICTED: olfactory receptor 4E2	gi 635141743	36 kDa	100%	1	2,88%
PREDICTED: olfactory receptor 51L1	gi 664702271	37 kDa	99%	1	2,40%
PREDICTED: olfactory receptor 8H1-like	gi 291385142	36 kDa	100%	1	2,86%
PREDICTED: orexin receptor type 1	gi 641730059	47 kDa	100%	1	6,35%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial	gi 291413482	23 kDa	100%	1	7,25%
PREDICTED: perilipin-4 isoform X1	gi 635035238	120 kDa	100%	1	1,08%
PREDICTED: peroxisome biogenesis factor 6	gi 641723436	98 kDa	100%	1	1,74%
PREDICTED: phosphoglucomutase-1 isoform X1	gi 634828608	64 kDa	100%	1	2,41%
PREDICTED: piggyBac transposable element-derived protein 1 isoform	gi 655839812	85 kDa	100%	1	1,21%
PREDICTED: pleckstrin homology-like domain family B member 2	gi 655854988	155 kDa	99%	1	0,58%
PREDICTED: plectin isoform X1	gi 635050768	539 kDa	100%	1	0,27%
PREDICTED: pogo transposable element with ZNF domain isoform X1	gi 634876237	156 kDa	100%	1	1,98%
PREDICTED: potassium channel subfamily K member 17 isoform X1	gi 635095370	45 kDa	100%	1	3,48%
PREDICTED: PR domain zinc finger protein 5, partial	gi 640826529	70 kDa	100%	1	3,09%
PREDICTED: probable phospholipid-transporting ATPase FetA	gi 641703319	134 kDa	100%	1	1,54%
PREDICTED: procollagen C-endopeptidase enhancer 2	gi 291399915	46 kDa	100%	1	3,12%
PREDICTED: proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	gi 635087049	129 kDa	100%	1	0,98%
PREDICTED: protein AATF	gi 641716553	64 kDa	100%	1	2,47%
PREDICTED: protein FAM151B	gi 664756236	32 kDa	100%	1	7,39%
PREDICTED: protein FAM181B	gi 640780668	23 kDa	100%	1	9,69%
PREDICTED: protein phosphatase 1D	gi 664750743	69 kDa	100%	1	1,73%
PREDICTED: protein phosphatase 2C-like domain-containing protein 1	gi 664747468	73 kDa	100%	1	2,02%
PREDICTED: protein SFH1 homolog isoform X1	gi 655873986	143 kDa	100%	1	0,91%
PREDICTED: protein Z-dependent protease inhibitor	gi 640785358	38 kDa	100%	1	4,57%
PREDICTED: purine nucleoside phosphorylase-like	gi 634877178	33 kDa	99%	1	2,77%
PREDICTED: putative IQ motif and ankyrin repeat domain-containing	gi 641734904	54 kDa	100%	1	2,45%
PREDICTED: putative methyl-CpG-binding domain protein 3-like 3	gi 664780668	20 kDa	100%	1	8,84%
PREDICTED: putative N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase	gi 655602011	84 kDa	100%	1	1,20%
PREDICTED: putative transferase CAF17, mitochondrial	gi 664751773	29 kDa	100%	1	7,06%
PREDICTED: rab GTPase-activating protein 1-like isoform X3	gi 641709956	43 kDa	100%	1	5,14%
PREDICTED: rab11 family-interacting protein 1 isoform X1	gi 635047601	130 kDa	100%	1	0,98%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: rap guanine nucleotide exchange factor 6 isoform X1	gi 634856140	181 kDa	100%	1	1,61%
PREDICTED: ras-related protein Rab-1B isoform X1	gi 635012062	25 kDa	100%	1	10,50%
PREDICTED: RB1-inducible coiled-coil protein 1	gi 655667183	182 kDa	100%	1	1,07%
PREDICTED: regulator of G-protein signaling 6 isoform X1	gi 655873841	70 kDa	100%	1	3,47%
PREDICTED: ribonuclease P protein subunit p29	gi 291409788	26 kDa	99%	1	3,64%
PREDICTED: RING finger protein 17	gi 664760717	163 kDa	100%	1	1,05%
PREDICTED: RUN and FYVE domain-containing protein 1-like, partial	gi 640778800	69 kDa	100%	1	3,09%
PREDICTED: sclerostin domain-containing protein 1	gi 664722653	23 kDa	100%	1	11,70%
PREDICTED: SCP2 sterol-binding domain-containing protein 1	gi 634868775	17 kDa	100%	1	13,50%
PREDICTED: secreted frizzled-related protein 4	gi 634873961	42 kDa	100%	1	7,78%
PREDICTED: seminal plasma protein HSP-1	gi 664722410	17 kDa	100%	2	15,20%
PREDICTED: serine protease 33-like, partial	gi 664782906	17 kDa	100%	1	9,26%
PREDICTED: serine protease 55-like isoform X1	gi 635046568	43 kDa	100%	1	6,82%
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase VRK2	gi 640796360	58 kDa	99%	1	1,57%
PREDICTED: serine-protein kinase ATM isoform X1	gi 664752520	351 kDa	100%	1	0,88%
PREDICTED: SHC-transforming protein 4	gi 635135929	69 kDa	100%	1	2,54%
PREDICTED: sterile alpha motif domain-containing protein 9-like	gi 655837551	184 kDa	100%	2	2,53%
PREDICTED: structural maintenance of chromosomes flexible hinge	gi 641695086	216 kDa	100%	1	0,94%
PREDICTED: SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent	gi 635065237	71 kDa	100%	1	3,88%
PREDICTED: synaptonemal complex central element protein 2	gi 641731774	20 kDa	100%	1	20,70%
PREDICTED: synaptotagmin-like protein 2 isoform X1	gi 664705238	129 kDa	100%	1	2,17%
PREDICTED: T-box transcription factor TBX2	gi 664705544	67 kDa	99%	1	1,28%
PREDICTED: tether containing UBX domain for GLUT4	gi 634829916	61 kDa	100%	1	1,79%
PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 37 isoform X1	gi 640775431	175 kDa	100%	1	0,83%
PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 5	gi 641736217	49 kDa	100%	1	3,19%
PREDICTED: torsin-1A-interacting protein 1 isoform X1	gi 635132235	68 kDa	100%	1	2,33%
PREDICTED: TRAF-interacting protein isoform X1	gi 635118831	53 kDa	100%	1	4,48%
PREDICTED: transcription factor jun-B	gi 641731694	36 kDa	100%	1	8,65%

Arquivo suplementar 2 (Continua)

PREDICTED: transcription initiation factor TFIID subunit 4-like	gi 655900489	64 kDa	100%	1	5,38%
PREDICTED: transcriptional regulator ATRX	gi 641736508	277 kDa	100%	1	0,70%
PREDICTED: transmembrane protein 44 isoform X1	gi 635086321	48 kDa	100%	1	3,20%
PREDICTED: trichohyalin	gi 640777686	65 kDa	100%	1	2,30%
PREDICTED: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform X1	gi 640808740	98 kDa	100%	1	1,93%
PREDICTED: UBX domain-containing protein 2A isoform X4	gi 635082193	25 kDa	100%	1	8,97%
PREDICTED: uncharacterized protein C9orf43 homolog	gi 640798637	52 kDa	99%	1	1,74%
PREDICTED: uncharacterized protein CXorf38 homolog isoform X1	gi 635143053	37 kDa	100%	1	4,39%
PREDICTED: uncharacterized protein KIAA1210 homolog	gi 664780434	149 kDa	100%	1	2,06%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103205835	gi 634877220	47 kDa	100%	1	4,58%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103239535	gi 635069598	37 kDa	100%	1	3,28%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103248236 isoform X1	gi 635017106	28 kDa	100%	1	12,10%
PREDICTED: uncharacterized protein LOC103249322	gi 640781082	91 kDa	100%	1	2,11%
PREDICTED: very low-density lipoprotein receptor isoform X1	gi 655600467	96 kDa	100%	1	1,03%
PREDICTED: WD repeat-containing protein 48 isoform X1	gi 634861863	76 kDa	100%	1	3,40%
PREDICTED: wiskott-Aldrich syndrome protein-like	gi 664776807	13 kDa	100%	1	10,00%
PREDICTED: zinc finger CCHC domain-containing protein 4	gi 634880966	47 kDa	100%	1	2,45%
PREDICTED: zinc finger protein 211 isoform X1	gi 635041924	70 kDa	100%	1	1,48%
PREDICTED: zinc finger protein 280C	gi 640803370	83 kDa	100%	1	3,12%
PREDICTED: zinc finger protein 469	gi 641699584	285 kDa	100%	1	0,64%
PREDICTED: zinc finger protein 740 isoform X1	gi 664747683	25 kDa	100%	1	4,44%
Profilin-1	gi 62288870	15 kDa	100%	1	22,90%
Prostaglandin D2 receptor 2	gi 6831524	43 kDa	100%	1	4,19%
Prostaglandin reductase 1	gi 41688552	36 kDa	100%	1	4,86%
Protein kinase C, theta, isoform CRA_a, partial	gi 119606798	53 kDa	100%	1	2,39%
Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta, isoform	gi 119603796	46 kDa	100%	1	2,63%
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	gi 94710282	156 kDa	100%	1	1,66%
Putative Polycomb group protein ASXL3	gi 182671626	244 kDa	100%	1	0,66%
Putative stereocilin-like protein	gi 190410951	192 kDa	100%	1	1,35%

Arquivo suplementar 2 (*Continua*)

R-spondin-4 isoform 1 precursor	gi 100817773	26 kDa	100%	1	10,10%
Scribbled homolog, isoform CRA_a	gi 119602602	83 kDa	100%	1	1,32%
SEC24 related gene family, member D, isoform CRA_c	gi 119594061	113 kDa	100%	1	1,55%
Stabilin-1	gi 61247906	276 kDa	100%	1	0,82%
Sulfhydryl oxidase 2	gi 115311850	78 kDa	100%	1	3,76%
TAR DNA-binding protein 43 isoform 2	gi 56682929	34 kDa	100%	1	9,21%
Targeting protein for Xklp2	gi 292630907	86 kDa	100%	1	1,61%
Transcriptional protein SWT1	gi 341942100	103 kDa	100%	1	1,43%
Transmembrane protease serine 2	gi 115502469	54 kDa	100%	1	3,25%
Triple functional domain protein	gi 257051075	348 kDa	100%	1	0,61%
Tyrosine-protein kinase BAZ1B	gi 239938603	171 kDa	100%	1	1,96%
Tyrosine-protein kinase Lyn isoform A	gi 13540677	59 kDa	100%	1	2,54%
Uncharacterized protein KIAA1671	gi 27370348	35 kDa	100%	1	2,92%
Unconventional myosin-Ia	gi 13431670	97 kDa	100%	1	1,90%
WNK lysine deficient protein kinase 1, isoform CRA_b	gi 119609358	251 kDa	100%	1	0,38%
Zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2	gi 119586973	40 kDa	100%	1	4,24%
Zinc finger protein 287	gi 342187317	87 kDa	100%	1	1,45%
Zinc finger protein 608	gi 113199757	162 kDa	100%	1	1,79%
Zinc finger protein 828	gi 114149935	89 kDa	100%	1	3,33%

Capítulo 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes abordagens proteômicas utilizadas permitiram a identificação de proteínas exclusivas relacionadas com animais de alto e baixo índice de concepção, como a proteínas ligadoras de zinco (produto do gene *PEX12*), SPATA21, clusterina, inibidor de acrosina, SP-1, SMOK, fosfolipase C, lactotransferrina e membro 3 da superfamília das imunoglobulinas e podem servir como biomarcadores de fertilidade de garanhões da raça Quarto de Milha. Os parâmetros espermáticos e identificação das proteínas abordadas neste estudo, juntamente com exame andrológico adequado, podem fornecer informações a respeito da fertilidade do garanhão.

Com a utilização de abordagem proteômica moderna, análise *shotgun*, é possível identificar grande número de proteínas de amostras biológicas complexas. Este é o primeiro estudo a relatar de forma abrangente o proteoma do plasma seminal e do extrato de membrana plasmática de espermatozoides equinos.

Anexos

ANEXO I – Normas de Publicação do Periódico Biology of Reproduction

General Manuscript Guidelines

Equations. Equations must NOT be formatted using the default math editing tool in Word 2007. Instead, use the Design Science Equation Editor or MathType by clicking "Object" in the Insert ribbon and choosing either object type "Microsoft Equation 3.0" or "MathType Equation."

Figure and reference citations. Cite references, tables, figures, and supplemental data consecutively. Place reference numbers in square brackets, e.g., "as Smith [12] reported" or "as previously reported [3-5]." Authors will be charged for any alterations to References at proof stage.

File format. Preferred file formats are Microsoft Word and Corel WordPerfect.

Fonts. Only standard fonts such as Helvetica or Times New Roman should be used.

Genetic sequence deposits. Genetic sequences must be deposited to the appropriate database; this must be documented in footnote 1 on the title page.

Headers. Three levels of heads may be used. Level 1 is reserved for *BOR* section headers (e.g., *Abstract*, *Introduction*, *Materials and Methods*, etc.). Level 2 and 3 heads should consist of descriptive phrases.

Language. Choose U.S. English.

Line numbering. Manuscripts submitted without line numbering will be returned to authors for correction.

Line spacing. Double-space all text.

Manuscript length: There are currently no page or word limits for *BOR* manuscripts; however, to contain publishing costs and reduce reader fatigue, manuscripts must be concise and avoid reiteration and redundancies.

- Do not include information in the *Introduction* that is provided elsewhere in the manuscript.
- Do not present discussion in the *Results* section.
- Cite only essential references.
- Do not include sequence information that can be accessed through a publicly available database, such as GenBank or EMBL.
- Include only essential figures and format each figure so that it occupies no more space than is necessary to convey critical information.
- Do not reiterate information in figure legends that appears in *Materials and Methods* or *Results*. Do not include lengthy descriptive information in figure legends that is more appropriately incorporated in the text of the manuscript.
- Avoid unnecessary tables; do not put data in tabular form if the information can be presented adequately in a few sentences in the text. Very large tables should be submitted as Supplemental Data.

Nomenclature. Authors must adhere to the guidelines of the relevant species

nomenclature committees. Please see *BOR's* nomenclature guidelines for information.

Page numbering. Number pages at the top right.

Page setup. Choose letter-size, 8-1/2" x 11" paper. Set all margins at one inch.

Manuscript Formatting

Title page.

Title. Indicate the species studied, using italics as needed. Do not use abbreviations or acronyms. Spell out Greek characters.

Running title. A title of 50 or fewer characters, including spaces. This will appear as the running head of your published paper.

Summary sentence. A one-sentence summary of the manuscript's significance (limited to 250 characters). Do not use phrases such as "this paper demonstrates..." or "we show that..." Examples of appropriate summary statements are:

- The protein greatstuff (GTSF), which is produced by the developing oocyte, is essential for preimplantation embryo development beyond the two-cell stage.
- Photoperiod regulation of amino acid transport in the brain influences spawning behavior of guppies.
- Rat Sertoli cells promote high expression of *Clutz* mRNA and CLUTZ protein by spermatocytes; the phenotype of a null mutation in the *Clutz* gene is azoospermia.

Keywords. Title page keywords will appear on the first page of the final publication. There is no limit on the number of keywords that may be provided.

Authors and affiliations. List all authors and provide the full name (including departments and/or divisions) and location (i.e., city, state, country) of each institution where work was performed. Do not use abbreviations or acronyms, and do not provide street addresses. Use superscript Arabic numerals to key the authors to the institutions.

Grant support. Indicate financial support (i.e., funding agency names and grant or contract numbers, if applicable) in footnote 1. Do not include funding information in the Acknowledgment section.

Conference presentation (if applicable). If any research in the manuscript was presented elsewhere, indicate that here (e.g., "Presented in part at the 45th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 12-15 August 2012, State College, Pennsylvania.").

Correspondence. The corresponding author should be indicated in footnote 2; the footnote should give the complete contact information, including street address, for this person.

Additional footnotes. If two or more authors contributed equally to the work, or if an author's contact address has changed since the research was performed, this information should be provided in separate footnotes.

Abstract.

In a maximum of 250 words, summarize the purpose of the work, the methods used, and the conclusions. Do not present data or cite references. Avoid abbreviations and acronyms, and spell out Greek characters.

Introduction.

Provide a clear statement of the problem and cite the relevant literature on the subject. Do not include results or summary statements.

Materials and Methods.**Ethics.**

It must be stated and documented that investigations using experimental animals or subjects were conducted in accordance with the SSR's specific guidelines and standards.

Materials.

Brand names. Use generic names of chemicals, drugs, antibodies, reagents, enzymes, etc., when possible. Brand names should be used if the composition of that brand is critical to the methodology. If a brand name is given, the name of the manufacturer must also be provided. For example:

- Dynabeads mRNA DIRECT kit (Invitrogen)
- one-way ANOVA (PRISM software version 3.03; GraphPad)
- FSHR (1:1000 dilution; product no. ab65975; Abcam, Inc.)

Composition. Specify the composition of all solutions, buffers, mixtures, and culture media (including PBS) if a brand name and manufacturer are not provided.

Donated materials. Provide institutional affiliations of individuals or companies that donated supplies or reagents.

Trademark symbols. Do not use trademark or registered symbols with brand or company names.

Methods.

Concisely provide readers with sufficient information to replicate the work. Unpublished work may not be cited to provide validation of methodology. Include statistical methods used for data analysis. Use references to published methods if they are identical to methods used in the current study.

Results.

Present findings in appropriate detail, using the past tense. Refer to tables and figures in order, without discussion.

Nucleotide sequences should be submitted to GenBank, EMBL, or DNA Data Bank of Japan, and the accession number and date of accession noted in the text. Authors are encouraged to provide a link to the deposit rather than providing the complete sequence in the text.

Genomic and proteomic data should be deposited with the NCBI gene expression and hybridization array data repository (GEO). The GEO accession number and sequence deposit information should be referenced in footnote 1 after any funding information.

Discussion.

Provide a clear and concise interpretation of the results; avoid repeating the results.

Acknowledgment.

Acknowledge any non-financial assistance (e.g., statistical review, technical help, editorial assistance, animal husbandry, etc.).

References.

Acceptable works. Only published articles or articles accepted for publication may be used. Articles must have appeared in peer-reviewed publications or other published works that are accessible to most scientists. Articles that have been "conditionally accepted," "submitted," or are "in process" are not acceptable. If a paper has been accepted but has not been published in final form (i.e., full citation information is not yet available), please indicate that the paper is "in press" (see Journal article, published ahead of print).

- **Abstracts.** An abstract may be used as a reference only if it has been published in a regular issue of a readily available and indexed journal.
- **Internet/online references.** All online material must be cited completely and must include the web address and date of access by the authors. Many online sources provide a suggested citation.
- **Unpublished data.** Cite personal communications and unpublished data only if necessary. In the text, provide the name(s) of the individual(s) associated with the unpublished data. For example, "(Smith and Winter, unpublished data)."

Accuracy. Authors are responsible for the accuracy of all references. If reference changes are required at proof, authors will be charged for each alteration.

Order. All references should be cited in numerical order in the text using square brackets (e.g., "as Smith [12] reported" or "as previously reported [3-5]") and should appear in that order in the *References* section. If a reference citation appears only in a table or figure, number that reference last. For example, if there are 50 references in the text, four in a table, and two in a figure, the in-text references would be numbered 1-50, the references in the table would be numbered 51-54, and the references in the figure would be numbered 55-56.

- **TIP:** Search for "[" in your Word or PDF document to see a list of your in-text references. Use this list to ensure that your references are in numerical order.

Presentation. List up to 12 authors and/or editors of a publication. If there are more than 12 authors, list the only first 12 followed by "et al." Abbreviate journal names according to Serial Sources for the BIOSIS Database, Index Medicus, or PubMed's Journal Browser. Page numbers must be inclusive (e.g., 722–729, not 722–29).

- **NOTE:** EndNotes users may download a .ENS file in BOR style from the EndNotes web site (type "Biology of Reproduction" in the Publication Name field).

Abstract in *Biology of Reproduction*.

Vo TTB, Jeung EB. Calbindin-D9k expression in GH3 cells is a biomarker of xenoestrogenic potential of parabens. In: Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 31-August 3, 2010, Milwaukee, Wisconsin. Biol Reprod 2010; 83(suppl): Abstract 275.

Kwon DK, Koo OJ, Park SJ, Kang JT, Park HJ, Kim SJ, Moon JH, Saadeldin IM, Jang G, Lee BC. Optimizing porcine oocytes electrical activation by adjusting pre- and post-activation mannitol exposure time. In: Supplement to Biology of Reproduction for the Forty-Fourth Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 31-August 4, 2011, Portland, Oregon. Biol Reprod 2011; Suppl: Abstract 176.

Book.

Sokol RR, Rohlf FJ. Biometry. New York: WH Freeman and Co; 1981:253-261.

Book chapter.

Harrison RJ, Weir BJ. Structure of the mammalian ovary. In: Zuckerman S, Weit BJ (eds.), The Ovary, vol. 1, 2nd ed. New York: Academic Press; 1977:113-217.

Database.

Mouse Tumor Biology Database (MTB), Mouse Genome Informatics. Bar Harbor, ME: The Jackson Laboratory; 2004. <http://www.informatics.jax.org>. Accessed 11 October 2012.

Internet source.

Mammalian Reproductive Genetics [Internet]. Seattle, WA: University of Washington. <http://mrg.genetics.washington.edu>. Accessed 12 January 2012.

Journal article, 12 or fewer authors.

Demas GE, Nelson RJ. Photoperiod, ambient temperature, and food availability interact to affect reproductive and immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms* 1998; 13:253–262.

Journal article, more than 12 authors.

Okasaki Y, Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, Yamanaka I, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 2002; 420:563–573.

Journal article, published ahead of print.

Aitken-Palmer C, Hou R, Burrell C, Zhang Z, Wang C, Spindler R, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Protracted reproductive seasonality in the male giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) reflected by patterns in androgen profiles, ejaculate characteristics, and selected behaviors. *Biol Reprod* 2012; (in press). Published online ahead of print 4 April 2012; DOI 10.1095/biolreprod.112.099044.

Journal article, e-journal.

Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e48.

Patent.

Smith C, Jones K (inventors). The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services, assignee. Adreno-medullin peptides. U.S. patent 6 320 022; 2001.

Thesis or dissertation.

Wilson K. The effects of substance P, neurotensin and arginine vasopressin on reproductive function. London, UK: University of London; 1984. Thesis.

Terminology

Abbreviations. Do not use abbreviations in titles. Do spell out all abbreviations at first mention in the [Abstract](#) and in the body of the manuscript.

Beginning sentences. Do not begin sentences with very short abbreviations or acronyms, especially those that begin with a lower case letter. For example, hCG and cDNA should instead be "Human CG" and "Complementary DNA," respectively, when beginning a sentence.

Definitions. Do define all abbreviations and acronyms at first mention in the [Abstract](#) and in the body of the manuscript. Definitions are not needed for names of genes, gene products, proteins, and protein products.

Eponyms. Do not use the possessive form for an eponym. For example, do use Dulbecco Modified Eagle medium, not Dulbecco's Modified Eagle's medium; Hanks solution, not Hanks' solution; Student *t*-test, not Student's *t*-test; etc.

Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Do not use the nomenclature for polypeptide hormones proposed by the Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Do use follicle-stimulating hormone, not follitropin; luteinizing hormone, not lutropin; etc.

Latin terms. Do not italicize Latin terms such as *et al.*, *in situ*, *in vitro*, or *in vivo*. Do use italics for gene symbols and genus-species designations.

Nomenclature. Do read BOR's [nomenclature guidelines](#) carefully. The basic rules are:

- For mice and rats, gene symbols are in italics with only the first letter capitalized (e.g., *Kitl*); the protein symbol is the same as the gene symbol, except that all letters are capitalized and none are in italics (e.g., KITL).
- For humans, nonhuman primates, and domestic species, gene symbols are in italics with all letters capitalized (e.g., *KITLG*); the protein symbol is the same as the gene symbol, except that the letters are not in italics (e.g., KITLG).
- For fish, gene symbols are in italics with all letters in lower case (e.g., *cyc*); the protein symbol is the same as the gene symbol, except that the first letter is capitalized and none are in italics (e.g., Cyc).

Units of measure. Standard abbreviations for units of measure and abbreviations understood by scientists outside the field of reproductive biology may be used without definition: ml, g, IU, UV, i.v., EC, cpm, dpm, P, etc.

Figures

Borders. Do not use borders in or around figures.

Color. Figures reviewed in color will be published in color. If an author requests that a figure reviewed in color be published in black and white, additional editorial review will be required and may delay publication.

Consistency. Figures should have a consistent appearance throughout the paper.

Keys. A key should be used to explain symbols and patterns on graphs.

Labeling.

- **Abbreviations.** Any abbreviations that appear on the figure that have not been defined in the text must be defined in the [legend](#) or a key.
- **Decimal mark.** Please use a period (a.k.a., full stop), not a comma, to indicate the decimal mark.
- **Font.** Use only Times New Roman, Helvetica, or Symbol fonts whenever possible. If another font must be used, embed it within the document; otherwise it will be unlikely to display correctly on other machines.
- **Graph axes.** The x-axis and y-axis should be clearly labeled, and the units of measurement given.
- **Language.** Use U.S. English (see [General Manuscript Guidelines](#)).
- **Molecular standards.** Do not identify molecular standards with a kDa label; use Mr $\times 10^{-3}$ (molecular weight [relative molecular mass]) or kb (kilobase), as appropriate.
- **Nomenclature.** Use correct gene symbols and protein designations in figure

labels.

- **Type.** Type should be the same size (or proportional) on all figures within an article. Do not use a type size that is unnecessarily large or that is smaller than 8 points.

Lines. Pay particular attention to the quality of the lines, symbols, and patterns. Avoid using patterns in bars; use open and solid bars wherever possible. Do not use 3-dimensional graphs to show 2-dimensional data.

Numbering. Number figures consecutively with Arabic numerals (e.g., 1, 2, 3) in the order in which they are discussed in the text. This number should be included on each figure at least 0.5 cm (0.25") above or below the figure itself.

Panels. Multiple parts of a figure must be assembled together on one page with panel identifiers (e.g., A, B, C or a, b, c).

Print size. The maximum print area on a journal page is 18.3 cm wide x 24.5 cm long (7-1/4" x 9-5/8" or 43.5 picas x 58 picas). Figures will be reduced whenever possible to conserve space.

Scale bars. Include scale bars to indicate magnification of micrographs, if desired (see [Legends](#)).

ANEXO II – Normas de Publicação do Periódico Andrology

Format

Abstract Should be placed before the text of original articles and reviews. It should state at least the objectives, findings, and conclusions in a non-structured concise text (maximum 300 words).

Original studies should be clearly divided into the following sections: introduction; materials and methods; results; discussion with conclusions and references. Please remember to include acknowledgements (with funding information), disclosures, and author's contributions between the main text and reference list.

Abbreviations and units When first mentioned, cumbersome names should be suitably abbreviated for later reference in the paper. Doses of drugs should, if possible, be given as unit weight/body weight, e.g. nmol/kg. Concentrations can be given either in terms of molarity (e.g. nmol/l) or as ng/ml. The SI (Système International) units should be used. Molarity should refer to the active component.

In abbreviations and symbols, standardized terms should be used. Biochemical terminology should follow the recommendations in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society or the American Medical Association Manual of Style. For enzymes use the nomenclature recommended by IUPAC-IUB Commission as published in *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, New York, 1980. Upon request authors can obtain a more complete list of abbreviations, units etc. from the publisher.

Whenever reference is made to unpublished work of others, a letter of permission from the responsible investigator should be included. Reference to work which is planned or in progress should be avoided.

Illustrations All figures must be submitted in electronic form. You can upload digital versions of figures when submitting your manuscript online. Number and a short caption should be indicated upon submission. Ideally, these should be sent in the PICT format if created on a Mac, or WMF if created in Windows. Files saved as PS, EPS, GIF and TIF may also be used, but please be aware that it will not be possible to modify them. Avoid using tints and 3-dimensional bars. All photographs, drawings or graphs are referred to in the text as figures, abbreviated (Fig.), and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Figures should be planned to fit a width of the printed column, 80 mm, 1½ column (120 mm) or two columns (165 mm). Labelling should be in minimum 8pt Helvetica or Arial. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification (scale) bars should be given on micrographs. Prominence of lettering, lines, curves, and signs should correspond to the relative importance of each component. Details of the magnification bar should be noted in the figure legends. The preferred place of each figure should be marked in the manuscript. If your paper is accepted, it is important that all electronic artwork is supplied to the editorial office in the correct format and resolution. We recommend that you consult the publisher's illustration guidelines at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>) if you need advice on any aspect of preparing your artwork.

Colour Illustrations Authors of review articles will not be charged for colour work in their manuscript and therefore do not need to submit a colour work agreement form.

Costs of colour illustrations for all other articles must be borne by the authors. If there is colour work in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a colour work agreement form (SN_sub2000_F_CoW.pdf) to the postal address in the form before your paper can be published. However, in exceptional circumstances, the Editors may choose to waive part or all of these costs if the authors are able to make a convincing case. The authors of accepted articles are encouraged to suggest one of the figures for inclusion on the cover of *Andrology*. The selected cover figure will be published in colour free of charge.

In the event that an author does not want or is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Andrology* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should complete and return the above colour work agreement form to the Production Editor.

Legends Each figure must have a corresponding legend. The legend must be numbered with an Arabic number that corresponds to the illustration as it appears in the text. Each should begin with a short title for the figure. Legends to figures should contain sufficient information to be understood without reference to the text but are not meant to repeat details of methodology. Explain all symbols, arrows, numbers, or letters used in the figure and provide information on scale and/or magnification. For photomicrographs, include information on the method of staining or preparation. Figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Tables These should be numbered consecutively in Arabic numerals and cited in the text. An approximate location in the text should be indicated in the left margin of the manuscript. Each table should have a legend which makes its general meaning comprehensible without reference to the text.

References We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. The authors are responsible for the correctness of references. The references in the text should quote the surnames of the author/authors and the year of publication, 'Brown 1964', 'Brown & Smith (1968)' or (Brown et al. 1968) when there are more than two authors. The reference list should indicate only the publications mentioned in the text which should be listed in alphabetical order. List all authors if twenty or less. If more than 20 authors, list the first six and then add et al. *et* the last author or a group. Titles of journals should be abbreviated according to the style used in *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>).

Examples:

Monograph: Armitage P, Berry G & Matthews G. (2002) *Statistical Methods in Medical Research* (4th Edition), Blackwell Science, Oxford.

Single article: Corona G, Mannucci E, Forti G & Maggi M. (2009) Hypogonadism, ED, metabolic syndrome and obesity: a pathological link supporting cardiovascular diseases. *Int J Androl* 32, 587–598.

Single article with more than 20 authors: Corona G, Wu FC, Forti G, Lee DM,

O'Connor DB, O'Neill TW, et al. et EMAS Study Group (2012) Thyroid hormones and male sexual function. *Int J Androl* 35, 668-679.

Book chapter: Cooke PS, Sato T & Buchanan DL. (2001) Disruption of steroid hormone signaling by PCBs. In: PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects (eds L W Robertson & L G Hanson), pp. 257–263. The University Press of Kentucky, Kentucky.