

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DO SÊMEN SUÍNO E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE

(Characterization of the swine semen proteomic profile and its relationship with freezability)

Ricardo TONIOLLI¹; Dayanne Barboza GUIMARÃES¹; Tatyane Bandeira BARROS²; Lina Raquel Santos ARAÚJO¹

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) da Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus do Itaperi, Fortaleza/CE, CEP: 60.740-000;

²Laboratório de Biologia Geral da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro Brasileira. *E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

RESUMO

O sêmen suíno criopreservado possui emprego comercial limitado devido à perda de qualidade espermática, que ocorre durante o processo de congelamento e de descongelamento. A célula espermática suína possui peculiaridades que contribuem para esta alta sensibilidade às baixas temperaturas, tais como estrutura e composição da membrana plasmática. Além disso, estudos recentes apontam a relação da presença de proteínas a nível de membrana espermática e de plasma seminal, com a criotolerância das células espermáticas. Portanto, esta revisão faz uma abordagem sobre a íntima relação entre o perfil proteico do sêmen e a sua congelabilidade, característica do sêmen, que pode variar de animal para animal e até entre ejaculados de um mesmo varrão. Pesquisas têm identificado diversas proteínas, que aparecem em maiores concentrações no sêmen de alta congelabilidade. A técnica de proteômica apresenta um grande potencial ligado à reprodução, podendo ser utilizada na identificação de marcadores de fertilidade ou de ejaculados aptos ao processo de congelamento/descongelamento, evitando, assim, gastos, sejam eles de manutenção de reprodutores com sêmen de baixa qualidade para a congelamento ou de processamento do sêmen para criopreservação.

Palavras-chave: Biomarcadores, criotolerância, criopreservação, proteômica seminal.

ABSTRACT

Cryopreserved swine semen has limited commercial use due to the loss of sperm quality that occurs during the freezing and thawing processes. The porcine sperm cell has peculiarities that contribute to high sensitivity to low temperatures, such as the structure and composition of the plasma membrane. In addition, recent studies point to the relationship between the presence of proteins at the level of sperm membrane and seminal plasma with the cryotolerance of sperm cells. Therefore, this review addresses the intimate relationship between the protein profile of the semen and its freezability. The freezability of the semen can vary from animal to animal and even between ejaculations of the same boar. Research has identified several proteins that appear in higher concentrations in semen with high freezability. The proteomics technique has a great potential linked to reproduction and can be used to identify fertility markers or ejaculates suitable for the freezing / thawing process, thus avoiding expenses, be they for the maintenance of boar with low quality semen for freezing or semen processing for cryopreservation.

Key words: Biomarkers, cryotolerance, cryopreservation, seminal proteome.

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira se mantém em destaque no cenário mundial ocupando o quarto lugar de maior produtor e exportador de carne suína (ABPA, 2020). Para alcançar esta posição vários esforços foram somados incluindo avanços em nutrição, sanidade, técnicas de manejo, melhoramento genético e emprego de biotécnicas de reprodução. Assim, o emprego de biotécnicas reprodutivas aliadas ao desenvolvimento de animais com elevado potencial produtivo, favoreceu a um maior progresso genético do rebanho suíno tecnificado brasileiro a fim de atender as exigências impostas pelo mercado (FÁVERO e FIGUEIREDO, 2009).

Os conhecimentos zootécnicos e de fisiologia reprodutiva têm trazido grandes avanços na biotecnologia da reprodução. Contudo, a inseminação artificial, com a utilização de sêmen congelado para a espécie suína ainda não é uma realidade para o setor de produção. Isso ocorre pelo menos em virtude de resultados divergentes, obtidos no campo na criopreservação do sêmen suíno (CARDOSO *et al.*, 2013; YESTE *et al.*, 2017).

A criopreservação é uma biotécnica capaz de superar o limite temporal no uso do sêmen; mas, para a espécie suína, sua utilização ainda apresenta problemas de redução da capacidade fertilizante da população espermática, fazendo com que ejaculados de machos da mesma espécie apresentem diferentes resultados de fertilidade após congelamento (BARROS *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2015; TONIOLLI *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018). Por isso, estudos de base genética, envolvendo técnicas como a proteômica, objetivando melhorar a qualidade do espermatozoide e a fertilidade de ejaculados suínos após congelamento, têm sido desenvolvidos.

No processo de criopreservação das células espermáticas suínas, rotineiramente o plasma seminal é descartado utilizando-se crioprotetores já consagrados para preservação de espermatozoides de outras espécies de mamíferos, garantindo manutenção da fertilidade de células espermáticas. No entanto, recentemente têm-se evidenciado efeitos positivos do plasma seminal sobre a fertilidade dos espermatozoides suínos, sobretudo em relação à sua composição proteica. Dessa forma, o plasma seminal é capaz modular a função espermática e melhorar parâmetros de fertilidade de espermatozoides de varrões descongelados (RECUERO *et al.*, 2019).

A variação individual que cada animal pode apresentar em relação à capacidade de fertilização, pode ser influenciada por vários componentes do plasma seminal e da própria célula espermática (PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017). Contudo, muitos destes componentes e suas funções ainda são desconhecidos e as diferenças individuais no conteúdo destas substâncias estabilizadoras podem também explicar as diferenças na congelabilidade do ejaculado de cada reprodutor (AURICH *et al.*, 1996; VALENCIA *et al.*, 2017; VALENCIA *et al.*, 2020). Assim, a proteômica surge como uma tecnologia importante, disponível aos pesquisadores da era posgenômica, devido ao papel central das proteínas e interações proteína-proteína na função celular (COX e MANN, 2007; YESTE, 2016; LAZARI *et al.*, 2019). Desta forma, esta revisão faz uma abordagem sobre a íntima relação entre o perfil protéico do sêmen e a sua congelabilidade.

DESENVOLVIMENTO

Criopreservação e variabilidade genética no sêmen suíno

As pesquisas sobre a criopreservação de sêmen desenvolvidas nos últimos anos resultaram em avanços originados de estudos sobre a avaliação de diferentes crioprotetores, embalagens de congelamento, diluentes e curvas de congelamento/descongelamento (YESTE, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2018). No entanto, o emprego de sêmen congelado ainda apresenta índices reprodutivos insatisfatórios.

Uma biotécnica de criopreservação compreende todo o processo de manipulação do ejaculado: coleta, diluição, resfriamento, crioproteção, congelamento, armazenamento em nitrogênio líquido e descongelamento (AMAN *et al.*, 1993; YESTE *et al.*, 2017). Os danos induzidos pelo processo de criopreservação podem ocorrer em qualquer uma dessas etapas, pois todas elas podem levar a alterações celulares e bioquímicas nos espermatozoides (RATH *et al.*, 2009).

Um dos principais fatores que interferem no processo de congelamento são as particularidades da membrana do espermatozoide suíno, que possui uma menor porcentagem de colesterol, distribuídas principalmente na monocamada interna (WATSON, 1995), bem como uma grande concentração de ácidos graxos insaturados (CEROLINI *et al.*, 2000). Aliado a isso, a criopreservação ainda sofre grandes variações de resultados quando se correlaciona com a sua aplicação entre raças, indivíduos, entre ejaculados de um mesmo indivíduo (CORCINI *et al.*, 2012) e até mesmo entre frações de um mesmo ejaculado (LI *et al.*, 2018a).

O genoma do reprodutor suíno mantém estreita relação com as características espermáticas, tais como: volume ejaculado, concentração de espermatozoides, motilidade total e progressiva avaliadas no sêmen in natura. Treze genes de oito janelas de nucleotídeos de polimorfismo único foram considerados candidatos para as características seminais. O gene ABCC3 foi relacionado ao volume do ejaculado, os genes KCNA3, RBM15 e ITGB1 à concentração espermática, o gene WRNIP1 à motilidade total, os genes FAM189A2, C9orf135, FXN e FAM83D à motilidade progressiva e os genes HSD17B11 e HSD17B13 à motilidade total e progressiva. Neste sentido, a identificação de possíveis genes, ligados às diferentes características seminais de reprodutores, pode contribuir para a evolução do conhecimento da base genética de suínos aperfeiçoando o processo de seleção de animais a serem utilizados em Centrais de Inseminação Artificial (GAGGINI, 2017).

Estudos como o de Barros *et al.* (2012) constataram o efeito do macho na qualidade espermática pós-descongelamento em parâmetros espermáticos, como a motilidade e porcentagem de acrossomas normais. Segundo Bortolozzo *et al.* (2005), essa variabilidade na resposta dos machos suínos ao congelamento constitui-se numa das diversas limitações ao emprego comercial do sêmen congelado na suinocultura moderna e os fatores que influenciam as diferenças observadas na sobrevivência espermática e aos processos de congelamento/descongelamento ainda não estão bem elucidados (ROCA *et al.*, 2006).

Devido à grande variabilidade na resposta do ejaculado de machos suínos à congelamento, aos altos custos por dose produzida (o sêmen suíno congelado requer duas a três vezes mais espermatozoides por dose) e o processamento seminal trabalhoso, a inseminação artificial com sêmen congelado tende a se restringir à exportação de sêmen entre países e à

formação de bancos de sêmen de raças ou linhagens de alto valor genético, ou que se encontram em via de extinção ou em risco sanitário (BARROS *et al.*, 2012).

Segundo Toniolli *et al.* (2014), a disponibilização do sêmen congelado em suínos trará um grande impulso aos programas de Inseminação Artificial (IA), permitindo o acesso de pequenos produtores a machos geneticamente superiores, independente da distância que os separa das Centrais de IA.

Proteômica e diferenças no perfil proteico do sêmen

A proteômica é o estudo dos produtos proteicos expressos pelo genoma. Essa biotécnica surgiu como uma tecnologia importante disponível aos pesquisadores da era pós genoma, devido ao papel central das proteínas e interações proteína-proteína na função celular (COX e MANN, 2007). Ela também melhora o entendimento dos eventos moleculares e como eles afetam a função biológica da célula espermática (BREWIS e GADELHA, 2010). Em virtude da importância das proteínas, já que estas moléculas estão presente em todas as células, constitui-se ponto fundamental sob aspecto estrutural e funcional nos organismos vivos. Cada proteína costuma ser especializada para uma determinada função, conhecê-la significa entender determinado processo biológico presente em um indivíduo.

O estudo dessas proteínas e a sua compreensão, identificação, quantificação e caracterização permitem identificar as funções de diversos tipos celulares, incluindo o espermatozoide. O estudo proteico do espermatozoide é bem mais simples, quando comparado ao das células somáticas. Isso ocorre em virtude da célula espermática ser altamente polarizada e especializada com uma quantidade mínima de citosol e organelas (BOERKE *et al.*, 2007).

As diferenças de fertilidade observadas entre animais, muitas vezes, não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen (DEN DAAS *et al.*, 1992). Análises proteômicas, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais.

Várias proteínas já foram identificadas em espermatozoides de diferentes espécies usando abordagens proteômicas. Clinicamente, as proteínas espermatozoides podem ser usadas como marcadores para a infertilidade masculina devido a diferentes perfis proteicos identificados em espermatozoides de animais machos férteis e inférteis. Além disso, evidências mostraram que as condições de preservação do esperma *in vitro* também podem mudar os perfis de proteínas do esperma (LI *et al.*, 2016).

Estudos proteômicos, como o de Roncoletta *et al.* (1999) observaram uma diminuição da heterogenicidade proteica, após criopreservação seminal em touros, assim como a manutenção ou adição de algumas proteínas de membrana, o que demonstrou uma expressiva alteração na composição proteica da membrana espermática frente aos processos de diluição e criopreservação. Essas alterações podem levar a variações dos padrões de fertilidade dos animais.

Além de variações relacionadas ao indivíduo, existem os fatores ambientais que também podem exercer efeitos sobre a qualidade espermática, como o clima ao qual os doadores de sêmen são expostos. Shiomí (2018) e Martín-Hidalgo *et al.* (2020) constataram

sutis diferenças sazonais no perfil proteômico de espermatozoides suínos, coletados no verão e no inverno. Foram identificadas 1028 proteínas, das quais 85 delas foram mais abundantes no inverno, enquanto 23 foram menos abundantes no verão (MARTIN-HIDALGO *et al.*, 2020).

Já Moura *et al.* (2006) comprovaram a relação existente entre a expressão de determinadas proteínas presentes nas glândulas sexuais acessórias de touros Holstein e a taxa de fertilidade para esta raça. A proteína espermadesina foi maior em touros com baixa fertilidade; enquanto aqueles com alto escore de fertilidade apresentavam 2,3 vezes mais teores da proteína osteopontina do que os touros com baixa fertilidade. Já em suínos, a espermadesina AQN-1 não foi relacionada à criotolerância do sêmen (VALENCIA *et al.*, 2020).

O uso da proteômica na identificação de proteínas nas amostras dos fluídos das glândulas acessórias têm sido utilizada para determinar as possíveis relações existentes entre sua expressão e taxas de fertilidade em touros (MOURA *et al.*, 2006) e em suínos (YESTE, 2016; LAZARI *et al.*, 2019; BUSTAMANTE FILHO *et al.*, 2019). Assim, todos os fatores que possibilitem a redução de custos e tornem esta fonte proteica mais acessível merecem ser estudados. Para isto, a busca por novas alternativas em pesquisas é imprescindível, objetivando maximizar o uso desta nova biotécnica e proporcionar maiores taxas de sucesso.

Importância dos biomarcadores

A proteômica é uma importante técnica, utilizada na avaliação da infertilidade masculina de diferentes mamíferos domésticos e para diagnósticos clínicos do estado fisiológico dos órgãos reprodutivos individuais, permitindo a compreensão das interações do plasma seminal com a superfície dos espermatozoides. Além disso, indica possíveis marcadores de fertilidade e/ou congelabilidade (Quadro 01). A indicação desses marcadores permite ao criador redução de gastos, já que, ao saber que o ejaculado de um animal pode não apresentar bons resultados de congelabilidade, evitam-se os custos com o protocolo de criopreservação do sêmen desse referido animal (STRZEZEK *et al.*, 2005).

Nesse sentido, estudos desenvolvidos mostram que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliadas *in vivo* e *in vitro*. Tais proteínas podem ser consideradas como potenciais marcadores moleculares da fertilidade (KILLIAN *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2006). A expectativa de dispor de marcadores que auxiliem a indicação do potencial reprodutivo de um indivíduo tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, o que, provavelmente, poderá contribuir significativamente na escolha de reprodutores geneticamente superiores.

Com o objetivo de solucionar a problemática da criopreservação do sêmen de diversas espécies e diminuir os danos que este processo causa à célula espermática, vários esforços em diversas áreas do conhecimento científico, que vão desde a criobiologia até a biologia molecular, vêm sendo aplicados, produzindo uma gama de novos conhecimentos, como a busca por novos crioprotetores e marcadores moleculares de fertilidade.

Já foi observado que células e organismos multicelulares respondem a situações estressantes, induzindo ou aumentando a síntese de grupos de proteínas. Em casos de estresse como o choque térmico, essas proteínas foram identificadas como HSPs (*Heat shock proteins*) ou proteínas anticongelantes (KIM, 2016). Essa classe de proteínas provê a

resistência contra o estresse oxidativo (FUKUDA *et al.*, 1996) e média proteção celular durante estresse térmico, entre outras funções (CASAS *et al.*, 2010). Dessa forma, sua adição durante a criopreservação do sêmen suíno pode melhorar sua viabilidade e a integridade do acrossoma na descongelamento (KIM, 2016).

Quadro 01: Proteínas relacionadas à boa ou má criotolerância do sêmen suíno.

Varrões	Marcador	Localização	Referência
Bons congeladores	<i>Carbohydrate-binding</i>	Plasma seminal	Toniolli <i>et al.</i> , 2017
	Arilsulfatase A	Membrana espermática	Guimarães <i>et al.</i> , 2017
	Subunidade alfa 1 da <i>F-actin capping protein</i>	Membrana espermática	Guimarães <i>et al.</i> , 2017
	Aquaporinas (AQP3 e AQP7)	Membrana espermática	Prieto-Martinez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Niemann-Pick disease type C2 protein (NPC2)</i>	Plasma seminal	Valencia <i>et al.</i> , 2017
	Fibronectina-1 (FN 1)	Plasma seminal	Vilagran <i>et al.</i> , 2015
Maus congeladores	Fragmento Fc da proteína de ligação a IgG	Membrana espermática	Guimarães <i>et al.</i> , 2017
	<i>Lactadherina</i>	Membrana espermática	Guimarães <i>et al.</i> , 2017
	<i>Heat shock protein 90 alpha (HSP90)</i>	Plasma seminal	Prieto-Martinez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3)</i>	Citosol	Llavanera <i>et al.</i> , 2019; Kwon <i>et al.</i> , 2015
	<i>Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)</i> : baixos níveis	Plasma seminal	Prieto-Martinez <i>et al.</i> , 2017

Em suínos, estudos confirmaram que, mesmo utilizando o sêmen de animais com excelentes resultados de vitalidade e motilidade e sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não é o mesmo para ejaculados provenientes de animais diferentes (TONIOLLI *et al.*, 2017). Além disso, esses autores demonstraram a influência da proteína *Carbohydrate-binding* (AWN) no processo de congelamento. Ejaculados que apresentavam essa proteína em maior concentração, evidenciaram melhores resultados pós descongelamento, proporcionando maior proteção à membrana espermática.

A proteína Fibronectina-1 (FN 1), uma das mais abundantes no plasma seminal, foi uma das primeiras proteínas consideradas como marcador de congelabilidade do sêmen suíno (VILAGRAN *et al.*, 2015). A FN1 está relacionada à redução de lesões na peça intermediária e cauda dos espermatozoides, através da manutenção da estabilidade da

membrana espermática e da redução do estresse oxidativo (GONZALEZ-CADAVID *et al.*, 2014). Guimarães *et al.* (2017) identificaram potenciais marcadores para criopreservação do sêmen suíno. O fragmento Fc da proteína de ligação à IgG e à *lactadherina* foram mais intensos no sêmen de animais ditos maus congeladores, enquanto a arilsulfatase A e a subunidade alfa 1 da *F-actin capping protein* foram mais expressivas no sêmen de animais com boa congelabilidade.

Marcadores de congelabilidade do sêmen suíno também foram determinados por Valencia *et al.* (2017) e Prieto-Martinez *et al.* (2017). Nesse sentido, um sêmen de baixa congelabilidade mostrou aumento da proteína HSP90 (*heat shock protein 90 alpha*) e redução de L-PGDS (*lipocalin-type prostaglandin D synthase*) no plasma; enquanto um sêmen de alta congelabilidade apresentou maiores níveis das aquaporinas, AQP3 e AQP7 (PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017) e da proteína NPC2 (*Niemann-Pick disease type C2 protein*) (VALENCIA *et al.*, 2017). Duas isoformas de NPC2 podem estar envolvidas na resiliência do espermatozoide suíno para resistir a procedimentos de congelação e descongelação e pode prever a congelabilidade do ejaculado (Valência *et al.*, 2020). Os mesmos autores inferiram que é possível que essas proteínas sejam capazes de se ligarem ao colesterol da membrana plasmática, afetando positivamente a criotolerância das células espermáticas.

Outro marcador de criotolerância para sêmen suíno foi identificado por Llavanera *et al.* (2019), a *glutathione S-transferase Mu 3* (GSTM3), cuja presença está relacionada à má qualidade espermática após descongelação. A GSTM3 é membro de um grande grupo de isoenzimas citosólicas, multigênicas e multifuncionais, ligadas à membrana, que catalisam uma série de reações dependentes da glutathione reduzida que estão envolvidas nas células, como a proteção contra o estresse oxidativo (HAYES *et al.*, 2005) e na fertilização do oócito, por meio da interação com glicoproteínas da zona pelúcida - ZP4 (PETIT *et al.*, 2013). Níveis de GSTM3 são mais altos nos espermatozoides que exibem baixa atividade mitocondrial, alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alto distúrbio lipídico da membrana após o degelo. Nesse sentido, níveis mais altos de GSTM3 em sêmen suíno estão associados a tamanhos de ninhada menores (KWON *et al.*, 2015).

Já foram identificadas mais de 250 proteínas no plasma seminal (PEREZ-PATIÑO *et al.*, 2016; PEREZ-PATIÑO *et al.*, 2018) e cerca de 1 681 proteínas nos espermatozoides de suínos (WEBER, 2016), restando ainda conhecer qual a real função de cada proteína e sua relação com a manutenção de parâmetros espermáticos frente ao resfriamento, à criopreservação e, sobretudo, sua relação com a fertilidade, parâmetro essencial para os programas de inseminação artificial nesta espécie animal. Embora a remoção do plasma seminal seja uma prática rotineira antes da criopreservação de esperma suíno, evidências crescentes indicaram que pode ser positivo para a fertilidade do espermatozoide suíno. Na verdade, o plasma seminal é capaz de interagir com o trato reprodutivo feminino após a monta/inseminação e modular a função espermática, podendo aumentar o desempenho reprodutivo de espermatozoides de varrões descongelados (RECUERO *et al.*, 2019). Além disso, maiores estudos são necessários para elucidar o efeito combinado de proteínas e antioxidantes do plasma seminal, envolvidos positivamente na criotolerância de células espermática suínas, minimizando o estresse oxidativo (LI *et al.*, 2018b).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de proteômica apresenta um grande potencial ligado à reprodução, podendo ser utilizada na identificação de marcadores de fertilidade ou de ejaculados aptos ao processo de congelação/descongelação em machos de diversas espécies e, desta forma, tornar mais viável essa técnica para espécies com extrema sensibilidade ao choque térmico, como os espermatozoides suínos e, principalmente, evitar gastos, sejam eles de manutenção de reprodutores com sêmen de baixa qualidade para a congelação, ou com a técnica em si, ao se congelar e descongelar um sêmen que não trará bons resultados de fertilidade.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2020. 2020. 160p. Disponível em: http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. The epididymis and sperm maturation - a perspective. *Reproduction Fertility and Development*, v.5, p.361-381, 1993.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v.46, p.791-797, 1996.
- BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D. Criopreservação de semen de suínos da raça Piau submetidos a três protocolos de congelamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.4, p.914-922, 2012.
- BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; SOUZA, L.P. FEUGANG, J.M.; TONIOLLI, R. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar semen freezing procedure. *Semina Ciências Agrárias (Online)*, v.36, p.2023-2030, 2015.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v.68, p.147-S155, 2007.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNADI, M. L.; WOLLMANN, E. B.; FERREIRA, F. M.; BORCHART NETO, G. Suinocultura em ação: inseminação artificial na suinocultura tecnificada. Porto Alegre, Brasil: Copyright, 2005. 185p.
- BREWIS, I.A.; GADELHA, B.M. Sperm surface proteomics: from proteins lists to biological function. *Molecular Human Reproduction*, v.16, p.68-79, 2010.
- BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; SOUZA, A.P.B.; LAZARI, F.L.; ARGENTI, L.E.; WEBER, A. Avaliação seminal em suínos: aplicabilidades das análises proteômicas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.184-195, 2019.

CARDOSO, T.F.; VARELA JUNIOR, A.S.; SILVA, E.F.; GHELLER, S.M.M.; SILVA, A.C.; CORCINI, C.D. Criopreservação de sêmen suíno: alternativas para otimização da técnica. *Ciência Animal*, v.23, n.2, p. 03-15, 2013.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Variability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, v.58, n.1-2, p.99-111, 2000.

CORCINI, C.D.; VARELA, A.S.; PIGOZZO, R.; RAMBO, G.; GOULARTE, K.L.; CALDERAM, K.; LEON, P.M.M.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA JR., T. Pre-freezing and post-thawing quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein bands presente in seminal plasma. *Livestock Science*, v.145, n.1, p.28-33, 2012.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? *Cell*, v.130, p.395–398, 2007.

DEN DAAS, J.H.G.; NIELAND, J.D.; DE JONG, G. The relation between number of spermatozoa inseminated per dose of semen and non-return rates for different sires. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.320-327, 1992.

FÁVERO, J.A.; FIGUEIREDO, E.A.P. Evolução do melhoramento genético de suínos no Brasil. *Revista Ceres, Viçosa*, v.56, n.4, p.420-427, 2009.

FUKUDA, A.; OSAWA, T.; ODA, H.; TANAKA, T.; TOYOKUNI, S.; UCHIDA, K. Oxidative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.219, p.76-81, 1996.

GAGGINI, T.S. Presença da gota citoplasmática e seus efeitos na morfometria, cromatina e motilidade espermática e identificação de genes candidatos à seleção de parâmetros seminais de suínos. 2017. 134p. (Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J.A.M.; MORENO, F.B.; ANDRADE, T.S.; SANTOS, A.C.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; MOURA, A.A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*, v.82, n.5, p.697-707, 2014.

GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B.; VAN TILBURG, M.F.; MARTINS, J.A.M.; MOURA, A.A.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; TONIOLLI, R. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.183, p.27-38, 2017.

GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B.; CANTANHÊDE, L.F. FEUGANG, J.M.; SOUZA, L.P. TONIOLLI, R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco e pó visando sua criopreservação. *Ciência Animal Brasileira*, v.19, p.1-16, 2018.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.45, p.51–88, 2005.

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.

KIM, D. Evaluation of Antifreeze Proteins on Miniature Pig Sperm Viability, DNA Damage, and Acrosome Status during Cryopreservation. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, v.31, n.4, p.355-365, 2016.

KWON, W.S.; OH, S.A.; KIM, Y.J.; RAHMAN, M.S.; PARK, Y.J.; PANG, M.G. Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Scientific Reports*, v.5, article 13821, 2015.

LAZARI, F.L. SONTAG, E.R.; SCHNEIDER, A.; MOURA, A.A.A.; VASCONCELOS, F.R.; NAGANO, C.S.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. Proteínas plasmáticas seminal e sua relação com a motilidade e morfologia do esperma em javalis. *Andrologia*, v.51, n.4, p.1-9, e13222, 2019.

LI, C.; WANG, D.; ZHOU, X. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science*. v.173, p.1-7, 2016.

LI, J.; ROCA, J.; PÉREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma? *Animal Reproduction Science*, v.195, p.30-37, 2018a.

LI, J.; BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MOLINA, M.F.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I.; ROCA, J. Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, v.107, n.1, p.27-35, 2018b.

LLAVANERA, M., DELGADO-BERMÚDEZ, A., FERNANDEZ-FUERTES, B.; RECUERO, S.; MATEO, Y.; BONET, S.; BARRANCO, I.; YESTE, M. GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of boar sperm. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.10, article 61, 2019.

MARTÍN-HIDALGO, D.; MACÍAS-GARCÍA, B.; GARCÍA-MARÍN, L.J.; BRAGADO, M.J.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L. Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Animal Reproduction Science*, v.219, p.1-10, article 106513, 2020.

MOURA, A.A.H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.A. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology*, v.27, p.201-211, 2006.

PEREZ-PATIÑO, C., BARRANCO, I., PARRILLA, I., VALERO, M. L., MARTINEZ, E. A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. *Journal of Proteomics*, v.142, p.15-23, 2016.

PEREZ-PATIÑO, C., PARRILLA, I., BARRANCO, I., BARBERÁN, M.V.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; HERRERO-MARTINEZ, J. M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., MARTINEZ, E.A. New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma

Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. *Journal of Proteome Research*, v.17, n.3, 2018. 1065-1076.

PETIT, F.M.; SERRES, C.; BOURGEON, F.; PINEAU, C.; AUER, J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Human Reproduction*, v.28, n.4, p.852–865, 2013.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; VILAGRAN, I.; MORATÓ, R.; ÁLAMO, M.M.R.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S.; YESTE, M. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures. *Andrology*, v.5, n.6, p.1153-1164, 2017.

RATH, D.; BATHGATE, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J.; STRZEZEK, J.; WABERSKI, D. Recent advances in boar semen cryopreservation. *Society Reproduction and Fertility*, Suppl.1, v.66, p.51-66, 2009.

RECUERO, S.; FERNANDEZ-FUERTE, B.; BONET, S.; BARRANCO, I.; YESTE, M. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.137, n.1, p.36-42, 2019.

ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*, v.84, n.10, p.2692-2699, 2006.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H.; SILVA, C.; DA, OLIVEIRA, M.A.; FRANCESCHINI, P.H.; RAMOS, P.R.R. Comparação do perfil protéico de membrana de espermatozoides do sêmen fresco, diluído e pós-congelamento. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.3, p.226-228, 1999.

SHIOMI, H.H. Aspectos seminais de suínos da raça Piau: sazonalidade e criopreservação. 2018. 95p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRASER, L. Proteomics of boar seminal plasma – current studies possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology*. v.5, n.3, p.279–290, 2005.

TONIOLLI, R.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B. Marcadores de congelabilidade: Proteínas e sua relação com a resistência espermática à criopreservação em diferentes varrões. *Acta Veterinária Brasílica*. v.8, supl. 2, p.332-342, 2014.

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelamento em ejaculados de diferentes varrões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, p.297-311, 2017.

VALENCIA, J.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, W.; MESA, H.; HENAO, F.J. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.8, article 21, 2017.

VALENCIA, J.; YESTE, M.; QUINTERO-MORENO, A.; NIÑO-CARDENAS, C.P.; HENAO, F.J. Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but

not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, v.45, n.15, p.181-189, 2020.

VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASTILLO, J.; OLIVA, R.; BONET, S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*, v.3, n.2, p.345-356, 2015.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. *Reproduction Fertility and Development*, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

WEBER, A. Maturação espermática no epidídimo suíno: análise proteômica do espermatozoide e regulação hormonal da expressão de β -defensinas. 111p. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Centro Universitário UNIVATES, 2016.

YESTE, M. Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, n.S2, p.71-79, 2015.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v.85, n.1, p.47-64, 2016.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular Reproduction Development*, v.84, n.9, p.802-813, 2017.