

Paula Intasqui Lopes

**ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA DE
PLASMA SEMINAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM
ASPECTOS FUNCIONAIS DOS ESPERMATOZOIDES
E COM O NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DO
PLASMA SEMINAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-graduação em Urologia.

SÃO PAULO

2014

Paula Intasqui Lopes

**ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA DE
PLASMA SEMINAL E SUA ASSOCIAÇÃO COM
ASPECTOS FUNCIONAIS DOS ESPERMATOZOIDES
E COM O NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DO
PLASMA SEMINAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-graduação em Urologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

SÃO PAULO

2014

Intasqui Lopes, Paula

Análise proteômica quantitativa de plasma seminal e sua associação com aspectos funcionais dos espermatozoides e com o nível de peroxidação lipídica no plasma seminal/ Paula Intasqui Lopes. - São Paulo, 2014. xxi, 120f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Urologia.

Quantitative proteomics analysis of seminal plasma and its association to sperm functional aspects and to seminal plasma lipid peroxidation levels.

1. Acrossomo 2. Espermatozoides 3. Fragmentação do DNA 4. Mitocôndrias 5. Peroxidação de Lipídeos 6. Proteômica 7. Sêmen

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
DISCIPLINA DE UROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Luiz Martins.

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Cássio Andreoni Ribeiro.

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho.

Dedicatória

Aos meus pais Vera Lúcia Intasqui e Helio Luis Lopes, por terem batalhado para me proporcionar todo estudo e base necessários para que eu me desenvolvesse, por toda dedicação, por terem me ensinado a nunca desistir dos meus sonhos e, principalmente, por serem meus amigos e meus maiores exemplos.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, pelos aprendizados, pela paciência e por ter sido um verdadeiro orientador ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Urologia da UNIFESP, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos Professores **Dr. Edson Guimarães Lo Turco** e **Dra. Débora Montagnini Spaine**, pelo incentivo e contribuição na realização deste trabalho.

Aos profissionais da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento do Grupo Fleury, **Dr. Valdemir Melechco Carvalho** e **Dra. Karina Helena Morais Cardozo**, por todo o auxílio prestado durante a análise proteômica, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao professor **Marcílio Nichi**, pelo auxílio durante a padronização da técnica para avaliação no nível seminal de peroxidação lipídica.

Aos profissionais do Laboratório de Andrologia da UNIFESP, **Danielle Spínola Tibaldi**, **Valéria Barradas**, **Carolina Homs**, **Silene Fernandes da Costa**, **Sérgio Antonio Batista Correa** e **Raimundo Gonçalves Moreira**, pela ajuda diária, pela disponibilidade e pela boa vontade e paciência durante a obtenção das amostras utilizadas para este trabalho.

À **Mariana Camargo** e **Mariana Pereira Antoniassi**, pela amizade e companheirismo ao longo de todo este trabalho, pela ajuda durante a realização dos experimentos, pelas conversas e por dividirem comigo todos os momentos, inclusive os mais difíceis, sempre me incentivando e me divertindo.

A todos os Pós-Graduandos e membros das Iniciações Científicas do Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP, **Augusto Azzolini de Melo**, **Bárbara Ferreira**

da Silva, Camila Bruna de Lima, Camila Chavier Macedo, Daniela Antunes Montani, Fatima Kazue Okada, Fernanda Bertuccez Cordeiro, Jaqueline Camillo, Larissa Berloff Belardin, Larissa Berioni R. da Silveira, Lívia do Vale T. da Costa, Lucas Garcia A. Ferreira, Maria Beatriz Ribeiro de Andrade, Paola Cristine Ferigolo, Paula Toni Del Giudice, Raquel Cellin Rochetti, Rhayza Roberta Andretta, Talitha Dinardo Oleinki, Tatiane Abreu e **Thaís Caroline G. A. Santos**, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha irmã **Natália Intasqui Lopes** por ser minha melhor amiga e parceira, estando sempre ao meu lado disposta a me ouvir, me apoiar e me incentivar.

À minha avó **Dagmar de Jesus Intasqui**, por ser meu alicerce e a melhor avó que eu poderia ter e por todo carinho, amor e mimos.

Aos meus tios **Adriana Intasqui Galante** e **Eduardo Galante** e aos meus primos **Guilherme Intasqui Galante** e **Luiza Intasqui Galante**, por fazerem parte em todos os momentos da minha vida e por todo amor e amizade.

Ao meu padrinho **Silvio Luis Lopes**, por estar sempre próximo, mesmo tão longe.

Ao **Hatylas Azevedo** por ser meu maior companheiro e incentivador, por nunca me deixar desistir e por estar sempre disposto a me ouvir, me acalmar e me aconselhar.

A **Cassia Zaneti de Azevedo**, **Eliasar Rodrigues de Azevedo**, **Pollyanna Zaneti de Azevedo**, **João Pedro Azevedo** e **Marcia Rodrigues de Azevedo**, por se tornarem a minha segunda família e por sempre me apoiarem.

Às minhas amigas **Aline Monho Ribeiro**, **Fernanda Antunes**, **Laís Fernanda Berro** e **Mariana Moysés Oliveira**, por estarem ao meu lado desde o início da faculdade, sempre com muito carinho, amizade e incentivos.

A **toda a minha família**, por todo o amor e carinho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível realizar esta pesquisa.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xv
Lista de quadros.....	xviii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xix
Resumo.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	4
2 MÉTODO.....	5
2.1 Pacientes e coleta das amostras.....	5
2.2 Desenho experimental do estudo.....	5
2.3 Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides.....	6
2.4 Avaliação da integridade do acrossoma dos espermatozoides.....	7
2.5 Avaliação da integridade do DNA dos espermatozoides.....	7
2.6 Avaliação do nível seminal de peroxidação lipídica.....	8
2.7 Análise estatística.....	9
2.7.1 Separação dos grupos experimentais.....	9
2.7.2 Análise estatística das variáveis seminais.....	10
2.8 Análise proteômica do plasma seminal.....	10
2.8.1 Preparo das amostras.....	10
2.8.2 Espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	12
2.8.3 Processamento dos espectros.....	12
2.8.4 Análise dos dados.....	13
2.8.5 Enriquecimento funcional.....	14
3 RESULTADOS.....	16
3.1 Estudo 1 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides.....	16
3.2 Estudo 2 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides.....	26
3.3. Estudo 3 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides.....	35

3.4 Estudo 4 – Análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica.....	45
3.5 Biomarcadores sugeridos para cada estudo.....	54
4 DISCUSSÃO.....	56
4.1 Estudo 1 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides.....	57
4.2 Estudo 2 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides.....	61
4.3. Estudo 3 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides.....	65
4.4 Estudo 4 – Análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica.....	70
5 CONCLUSÃO.....	75
6 ANEXOS.....	77
7 REFERÊNCIAS.....	106
Abstract.....	119
Bibliografia consultada.....	120

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides, verde) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides, vermelho) do estudo 1.....	18
Figura 2. Funções enriquecidas no plasma seminal dos grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides, A) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides, B) do estudo 1.....	22
Figura 3. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 1 (análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA).....	24
Figura 4. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) representativa do modelo de regressão logística do estudo 1 (análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides).....	25
Figura 5. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides, verde) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides, vermelho) do estudo 2.....	28
Figura 6. Funções enriquecidas no plasma seminal dos grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides, A) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides, B) do estudo 2.....	31

Figura 7. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 2 (análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA).....	33
Figura 8. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) representativa do modelo de regressão logística do estudo 2 (análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides).....	34
Figura 9. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides, verde) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, vermelho) do estudo 3.....	37
Figura 10. Funções enriquecidas no plasma seminal dos grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides, A) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, B) do estudo 3.....	41
Figura 11. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 3 (análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA).....	43
Figura 12. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) representativa do modelo de regressão logística do estudo 3 (análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides).....	44

Figura 13. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica, verde) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica, vermelho) do estudo 4.....	47
Figura 14. Funções enriquecidas no plasma seminal do grupo alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4.....	50
Figura 15. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 4 (análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA).....	52
Figura 16. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) representativa do modelo de regressão logística do estudo 4 (análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica).....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise seminal dos grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1.....	17
Tabela 2. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	19
Tabela 3. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	20
Tabela 4. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 1 (análise proteômica em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides).....	24
Tabela 5. Análise seminal dos grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2.....	26
Tabela 6. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	28
Tabela 7. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	29

Tabela 8. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 2 (análise proteômica em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides).....	33
Tabela 9. Análise seminal dos grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3. Os grupos foram comparados por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	35
Tabela 10. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	37
Tabela 11. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	40
Tabela 12. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 3 (análise proteômica em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides).....	43
Tabela 13. Análise seminal dos grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4. Os grupos foram comparados por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	45
Tabela 14. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4, identificadas por meio do teste t de <i>Student</i> para amostras não pareadas ($p < 0,05$).....	47

Tabela 15. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$)..... 48

Tabela 16. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 4 (análise proteômica em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica)..... 52

Lista de Quadros

Quadro 1. Biomarcadores proteicos sugeridos para cada estudo, selecionados de acordo com a análise de regressão logística e a análise discriminante, realizadas separadamente para cada estudo.....	55
--	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
BCA	Ácido Bicinconínico
CV	Coeficiente de variação
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GO	Ontologia gênica (do inglês <i>Gene Ontology</i>)
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
iBAQ	Quantificação absoluta baseada em intensidade
IC	Intervalo de confiança
IDA	Análise dependente de informação
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MDA	Malondialdeído
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de Massas <i>in tandem</i>
NADP	Bicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLS-DA	Análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais
PNA	Lectina <i>Peannut agglutinin</i>
pmol/μL	Picomol por microlitro
ppm	Partes por milhão
ROC	<i>Receiver Operation Characteristics</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio

TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TFA	Ácido trifluoracético
TRA	Técnicas de reprodução assistida
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
Uniprot AC	<i>Universal Protein Resource Accession Number</i>
VIP	<i>Variable Importance in the Projection</i>

RESUMO

Objetivo: Verificar se o perfil proteômico do plasma seminal reflete alterações funcionais nos espermatozoides e o nível seminal de peroxidação lipídica. **Método:** Um estudo transversal foi realizado incluindo 156 pacientes normozoospermicos. Após a coleta do sêmen por masturbação, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal e outra para a avaliação da atividade mitocondrial, da integridade do acrossoma e da integridade do DNA dos espermatozoides. O volume remanescente de sêmen foi centrifugado e o plasma seminal sobrenadante foi utilizado para a avaliação do nível seminal de peroxidação lipídica e para a análise proteômica. Posteriormente, os pacientes foram divididos em percentis (15%) para formação dos grupos experimentais de cada estudo: Estudo 1 - alta (grupo controle) e baixa (grupo alterado) atividade mitocondrial dos espermatozoides, Estudo 2 - alta (grupo controle) e baixa (grupo alterado) integridade do acrossoma dos espermatozoides, Estudo 3 - baixa (grupo controle) e alta (grupo alterado) fragmentação do DNA dos espermatozoides e Estudo 4 - baixo (grupo controle) e alto (grupo alterado) níveis seminais de peroxidação lipídica. A análise proteômica foi realizada utilizando LC-MS/MS. Os grupos foram comparados por meio de análise univariada (teste t de *Student*) e análise multivariada (PLS-DA e análise discriminante). As proteínas significantes foram posteriormente submetidas a análise de enriquecimento funcional. **Resultados:** Nos estudos 1, 2, 3 e 4 foram observadas 506, 493, 474 e 629 proteínas, respectivamente. As funções enriquecidas no estudo 1 foram detoxificação de EROs e ligação a NADP (controle) e atividade de oxidoreductase intramolecular, catabolismo de aminoglicanos, inibição de endopeptidases, lisossomos e resposta imune de fase aguda (alterado). As principais funções enriquecidas no estudo 2 foram resposta imune (controle) e inibição de fosfolipase, metabolismo do ácido araquidônico, exocitose, resposta inflamatória aguda, resposta ao peróxido de hidrogênio e transporte lisossomal (alterado). As principais funções enriquecidas no estudo 3 foram metabolismo de carboidratos, regulação de lipoproteínas, regulação negativa da apoptose, metabolismo de hormônios, atividade de metalopeptidases, ligação ao NAD e lisossomos (controle) e biossíntese de prostaglandinas e ligação a ácidos graxos (alterado). As principais funções enriquecidas no estudo 4 foram biossíntese de ácidos graxos insaturados, atividade de oxidantes e antioxidantes e resposta celular ao estresse térmico (alterados). Nos estudos 1, 2, 3 e 4 foram sugeridos 8, 6, 8 e 7 biomarcadores seminais de atividade mitocondrial, integridade acrossoma, fragmentação de DNA e peroxidação lipídica, respectivamente. **Conclusões:** O perfil proteômico do plasma seminal reflete alterações funcionais dos espermatozoides e o nível seminal de peroxidação lipídica e diversas funções pós-genômicas estão relacionadas às alterações estudadas. Proteínas relacionadas às alterações funcionais dos espermatozoides e ao nível seminal de peroxidação lipídica constituem potenciais biomarcadores seminais para cada alteração.

Palavras-chave: acrossomo; espermatozoides; fragmentação do DNA; mitocôndrias; peroxidação de lipídeos; proteômica; sêmen.

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é definida como a ausência de gravidez em um casal que mantém relações sexuais frequentes, bem distribuídas ao longo do ciclo menstrual e sem o uso de métodos contraceptivos, por no mínimo doze meses (1). Estima-se que aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva sejam inférteis, sendo que o fator masculino está presente em 50% dos casos (2). Atualmente, a avaliação clínica da infertilidade masculina inclui o estudo do histórico médico, o exame físico e a análise seminal, entre outras avaliações (3). A análise seminal avalia a produção de espermatozoides pelo testículo, a motilidade e vitalidade dessas células, a secreção das glândulas sexuais masculinas e a ejaculação (4). Essa avaliação é considerada indispensável durante a investigação inicial da infertilidade conjugal, a fim de fornecer informações a respeito do potencial fértil masculino (3). Todavia, a análise seminal não é um método diagnóstico direto de infertilidade, uma vez que não é um preditor preciso do sucesso reprodutivo. Isso é consequência da falta de avaliação das propriedades fisiológicas e funcionais do espermatozoide (5,6).

Levando-se em consideração o grande número de processos finamente orquestrados envolvidos para que ocorra a fertilização (7), é importante a avaliação não só da qualidade seminal, mas também da qualidade funcional dos espermatozoides (4,6,8). Dentre as principais características funcionais do espermatozoide, merecem especial destaque: (i) o padrão correto de motilidade e hiperomotilidade, o que está relacionado à atividade das mitocôndrias presentes na peça intermediária do espermatozoide (9), (ii) a capacidade de penetração na zona pelúcida do ócito, o que depende diretamente da integridade do seu acrossoma (10) e (iii) a capacidade de formação de um zigoto viável e sem alterações genéticas, sendo necessário para isso um DNA íntegro e capaz de se descondensar após a fertilização (11).

Devido à sua importância para a fertilização, alterações nas funções dos espermatozoides são reconhecidas como os principais mecanismos celulares subjacentes à infertilidade masculina e estão presentes em pelo menos 25% dos homens inférteis (12–14). Estudos demonstraram a presença dessas alterações em pacientes adolescentes e adultos com varicocele (15–18), tabagistas (19), com obesidade (20) e com lesão medular (21).

Essas alterações podem ocorrer principalmente durante a espermatogênese e a maturação epididimária (22,23) e acredita-se que o principal fator etiológico seja o estresse oxidativo (10,24–26). Esse ocorre devido a um desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de antioxidantes, favorecendo o lado pró-oxidativo (27). Sugere-se que pelo menos 40% dos homens inférteis apresentam estresse oxidativo seminal (28). Além disso, o estresse oxidativo seminal foi associado à infertilidade sem causa aparente, mesmo quando as variáveis seminais estavam dentro dos valores de corte propostos pela Organização Mundial da Saúde (29). O estresse oxidativo pode promover danos às funções dos espermatozoides principalmente por dois mecanismos. O primeiro mecanismo é a oxidação dos fosfolípidos das membranas celular e mitocondrial, processo conhecido como peroxidação lipídica. Devido à perda da permeabilidade e da integridade das membranas, a peroxidação lipídica pode levar à redução da atividade mitocondrial, a danos no acrossoma e à fragmentação do DNA dos espermatozoides (30–32). O outro mecanismo consiste na oxidação de proteínas do plasma seminal e dos espermatozoides, a qual pode promover a alteração da função das proteínas oxidadas ou a sua lise e liberação para o plasma seminal (33–36).

O plasma seminal constitui o componente líquido do sêmen e é composto por lipídeos, proteínas, açúcares e metabólitos, os quais interagem entre si e com os espermatozoides para fornecer substratos para o seu metabolismo e para protegê-los durante seu trânsito pelo trato reprodutivo feminino (37,38). O estudo do plasma seminal sob uma perspectiva proteômica pode auxiliar o entendimento sobre a regulação da função do espermatozoide por proteínas do plasma seminal, identificar os mecanismos envolvidos com alterações na integridade funcional dos espermatozoides (55) e facilitar a busca de métodos diagnósticos para avaliação da qualidade do espermatozoide mais simples e aplicáveis na rotina clínica (8). Isso é importante, pois (i) a análise seminal apresenta baixa sensibilidade e poder preditivo para avaliação da infertilidade masculina (5,6), (ii) a utilização das análises funcionais dos espermatozoides ainda não é recomendada pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) (3) e (iii) uma causa de infertilidade não pode ser encontrada em 25% dos casos, classificados como infertilidade sem causa aparente (56).

Em relação ao plasma seminal, é importante ressaltar que: (i) apesar de maior parte da sua composição ser proveniente das vesículas seminais e próstata,

aproximadamente 10% das proteínas do plasma seminal são de origem testicular e epididimária (39), (ii) as proteínas epididimárias presentes no plasma seminal possuem um grande envolvimento na qualidade do espermatozoide (40), (iii) proteínas associadas à função testicular podem ser encontradas no plasma seminal (38,41,42), (iv) o plasma seminal pode apresentar proteínas de espermatozoides alterados presentes ao longo de todo o trato genital masculino (43–45), (v) proteínas do plasma seminal podem regular a função dos espermatozoides e estudos em humanos e bovinos revelaram que a adição do plasma seminal de doadores férteis a espermatozoides de doadores inférteis promove uma melhora na sua qualidade funcional (37,46,47) e (vi) alterações no proteoma do plasma seminal já foram associadas a diversas causas de infertilidade, como azoospermia não obstrutiva (48,49), azoospermia obstrutiva (50), astenozoospermia (40), varicocele (51) e vasectomia (39,49), bem como a alterações funcionais dos espermatozoides, como a alta fragmentação do seu DNA (41). Dessa forma, é possível sugerir que a composição proteica do plasma seminal é essencial para a função correta dos espermatozoides e reflete diretamente a espermatogênese, a maturação epididimária e a integridade dos espermatozoides, podendo refletir, também, a qualidade funcional dos espermatozoides.

Nesse contexto, a hipótese deste estudo foi que o perfil de proteínas e as funções pós-genômicas do plasma seminal podem refletir a redução da atividade mitocondrial, da integridade do acrossoma e da integridade do DNA dos espermatozoides, devido à alteração direta nos mecanismos da espermatogênese e da maturação epididimária, e o estresse oxidativo seminal, devido à oxidação e lise de proteínas seminais e dos espermatozoides (53,54).

1.1 Objetivos

Verificar se o perfil proteômico do plasma seminal reflete alterações funcionais nos espermatozoides e o nível seminal de peroxidação lipídica.

1.1.1 *Objetivos específicos*

- Comparar os perfis proteômicos do plasma seminal entre:
 - a. Pacientes com baixa e com alta atividade mitocondrial dos espermatozoides;
 - b. Pacientes com baixa e com alta integridade do acrossoma dos espermatozoides;
 - c. Pacientes com baixa e com alta fragmentação de DNA dos espermatozoides;
 - d. Pacientes com baixo e com alto nível seminal de peroxidação lipídica.

- Identificar os processos biológicos alterados no plasma seminal em relação a cada dano funcional do espermatozoide e ao nível seminal de peroxidação lipídica.

- Identificar possíveis biomarcadores seminais relacionados à qualidade funcional dos espermatozoides.

2 MÉTODO

2.1 Pacientes e coleta das amostras

Este estudo foi financiado pela chamada Fleury de projetos, projeto Universal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 472941/2012-7) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (bolsa FAPESP, processo 2011/14631-7) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (número de processo 1184/11, Anexo I).

Foi realizado um estudo transversal incluindo os pacientes encaminhados ao Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os fatores de inclusão foram homens com idade entre 20 e 50 anos que apresentaram concentração de espermatozoides superior a 15×10^6 espermatozoides/mL de sêmen. Os fatores de exclusão foram volume ejaculado menor do que 1,5 mL, motilidade progressiva inferior a 32%, morfologia abaixo de 4% ou concentração de leucócitos igual ou superior a 1×10^6 leucócitos/mL de sêmen.

As amostras seminais foram colhidas no Laboratório de Andrologia entre julho de 2012 e novembro de 2013, por masturbação, após dois a cinco dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao laboratório e em recipientes de polipropileno estéreis. No total, duzentos e trinta e três pacientes foram coletados, dos quais setenta e sete foram excluídos devido a alterações na análise seminal. Assim, cento e cinquenta e seis pacientes foram incluídos neste estudo.

2.2 Desenho experimental do estudo

Após a coleta e liquefação do sêmen, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal, realizada de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2010 (57). O restante da amostra foi imediatamente encaminhado ao Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP, onde foi realizada a parte experimental deste estudo. Então, uma alíquota de sêmen foi utilizada para a avaliação da atividade mitocondrial, da integridade do acrossoma e da integridade do DNA dos espermatozoides e o volume remanescente foi centrifugado a 800 xG

por trinta minutos. O plasma seminal sobrenadante foi congelado sem adição de crioprotetores e mantido a -20 °C até o momento da avaliação do nível seminal de peroxidação lipídica e da análise proteômica. Antes da sua utilização, o plasma seminal foi descongelado e centrifugado a 16.100 xG por uma hora a 4 °C para remoção de debris celulares.

Posteriormente à coleta de todas as amostras e à aplicação dos critérios de exclusão, os pacientes incluídos neste estudo foram distribuídos em grupos experimentais, de acordo com a qualidade funcional dos espermatozoides e com o nível seminal de peroxidação lipídica, conforme descrito abaixo. Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), a não ser quando descrito.

2.3 Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo método de coloração por 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (15,16,18–21,32,58). Esse teste baseia-se na oxidação do DAB pelo complexo do citocromo c e na sua consequente deposição na peça intermediária do espermatozoide (59). Para isso, uma alíquota de sêmen fresco foi diluída em uma solução 1 mg/mL de DAB em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄), em uma proporção de 1:1 a 1:5 (v:v) sêmen/corante, dependendo da concentração de espermatozoides. A amostra foi, então, incubada por uma hora em banho-maria a 37 °C, no escuro. Após o período de incubação, foram preparados dois esfregaços de 15 µL em lâminas de microscopia (*Precision Glass Line*, China). Depois de secas, as lâminas foram fixadas em uma solução 10% (v:v) formaldeído (*Carlo Erba Reagents*, Val de Reuil, França) por dez minutos e deixadas à temperatura ambiente para secarem.

Duzentas células por paciente foram analisadas em microscópio Olympus BX-51 com contraste de fase (Olympus, Japão), em magnificação de 1.000 vezes (imersão). Essas foram classificadas em: classe I (100% da peça intermediária corada), classe II (mais de 50% da peça intermediária corada), classe III (menos de 50% da peça intermediária corada) e classe IV (ausência de coloração da peça intermediária) (59). Como marcador de alterações na atividade mitocondrial dos espermatozoides, foi utilizada a porcentagem de espermatozoides DAB classe III,

pois em estudos anteriores essa foi a variável de atividade mitocondrial que melhor se correlacionou com as diferenças biológicas estudadas (15,16,18,21).

2.4 Avaliação da integridade do acrossoma dos espermatozoides

A integridade do acrossoma foi avaliada por meio da ligação da lectina PNA (*Peannut agglutinin*) (15) a glicoproteínas presentes na membrana acrossomal externa (60). Inicialmente, foram preparados dois esfregaços com 15 µL de sêmen em lâminas de microscopia, as quais foram mantidas à temperatura ambiente para secarem. Então, as lâminas foram fixadas em metanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por quinze minutos e novamente mantidas à temperatura ambiente para secarem. Em seguida, essas foram recobertas com solução de coloração 60 µg/mL de PNA (*Life Technologies*, Califórnia, EUA) em PBS e mantidas no escuro por trinta minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com água Milli-Q e analisadas em microscópio Olympus BX-51, com módulo de epifluorescência e equipado com filtro de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm (Olympus, Japão). Duzentas células por amostra foram classificadas de acordo com a integridade acrossomal (acrossoma íntegro ou não íntegro), em magnificação de 1.000 vezes (imersão).

2.5 Avaliação da integridade do DNA dos espermatozoides

Para avaliação da integridade do DNA, foi realizado o ensaio cometa alcalino (15–20,32,41,58,61). Primeiramente, duas lâminas por amostra foram preparadas previamente com 1.000 µL de agarose *normal melting point* (NMPA, GE Healthcare, Buckinghamshir, Reino Unido) 1% (p:v) em TBE (0,1 M Tris [GE Healthcare, Buckinghamshir, Reino Unido]; 0,083 M ácido bórico; 0,001 M Na₂-EDTA [Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França]). Em cada lâmina, foram adicionados 100 µL de uma alíquota de sêmen fresco diluído em agarose *low melting point* (LMPA, *Life Techonologies*, Califórnia, EUA) 0,75% (p:v) em TBE para uma concentração final de espermatozoides de 1x10⁶/mL de LMPA. As lâminas foram cobertas por lamínulas (Precision Glass Line, China) e mantidas a 4 °C para solidificar. Após dez minutos, as lamínulas foram removidas e 300 µL de LMPA foram adicionados. As lâminas foram novamente cobertas por lamínulas e mantidas por dez minutos a 4 °C. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram cobertas com 1 mL de

solução de lise gelada (100 mM Na₂-EDTA; 10 mM Tris; 2,5 M NaCl; 2% (v:v) Triton X-100; 4 mM ditioneitol – DTT [GE *Healthcare*, Buckinghamshir, Reino Unido]; pH=11,0) e mantidas por uma hora a 4 °C. Em seguida, esse procedimento foi repetido e as lâminas permaneceram por mais uma hora a 4°C. As lâminas foram, então, lavadas com água Milli-Q (2 x 5 minutos) e, em seguida, imersas em solução alcalina de eletroforese (300 mM NaOH [Carlo Erba *Reagents*, Val de Reuil, França]; 1 mM Na₂-EDTA; pH>13,0), por vinte minutos. A eletroforese foi realizada por vinte minutos a 1,5 V/cm e a uma intensidade de corrente máxima de 270 mA. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBE (2 x 3 minutos) e fixadas (3 x 2 minutos) em etanol 100% (LabSynth, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com solução de SYBR[®] Green (SYBR[®] Green II RNA gel *stain*, 10.000 vezes em DMSO) diluído 1:10.000 (v:v) em TBE por quarenta minutos. As lâminas foram, então, lavadas com TBE para remoção da coloração de fundo.

Um total de cem espermatozoides por paciente foi observado no microscópio de epifluorescência Olympus BX-51 (Olympus, Japão), com filtro de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm, em magnificação de 400 vezes (imersão). As células foram analisadas utilizando-se o *software* Komet 6.0.1 (Andor Technology, Ulster, Reino Unido). Como marcador de fragmentação do DNA dos espermatozoides, foi utilizada a mediana da variável *Comet Distributed Moment* (62), pois essa foi a variável de fragmentação de DNA que apresentou a distribuição mais próxima à distribuição normal. O *Comet Distributed Moment* leva em consideração o comprimento e intensidade de fluorescência de todo o cometa e não distingue a cauda da cabeça do cometa (62).

2.6 Avaliação do nível seminal de peroxidação lipídica

Para a avaliação do nível seminal de peroxidação lipídica, foi realizada a mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (15,18,19). Esse é um complexo de coloração rosada com pico de absorvância em 540 nm, formado a partir da reação do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (63). Para isso, foi utilizado o protocolo proposto por Oborna e colaboradores (63), em que 100 µL de plasma seminal foram adicionados a 100 µL de uma solução 8,1% (p:v) de Dodecil sulfato de sódio (SDS, GE *Healthcare*, Buckinghamshir, Reino Unido), 0,8% (p:v) de

ácido tiobarbitúrico e 20% (v:v) de ácido acético (Carlo Erba *Reagents*, Val de Reuil, França). Então, as amostras foram mantidas por uma hora em banho-maria a 100 °C. A seguir, as amostras foram resfriadas em gelo por cinco minutos para cessar a reação química. Para separar o produto da reação (TBARS) das demais moléculas, 250 µL de N-butanol (LabSynth, São Paulo, Brasil) foram adicionados às amostras, as quais foram, em seguida, homogeneizadas por um minuto com auxílio de um vórtex e centrifugadas a 16.100 xG por 15 minutos a 15 °C. Por fim, 100 µL da fase aquosa foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, em duplicata. Uma curva padrão, preparada com concentrações crescentes de MDA (0 a 50 ng/mL, Acros *Organics*, New Jersey, EUA) e submetida a todo o protocolo descrito anteriormente, foi adicionada a cada microplaca. A quantificação foi, então, realizada por meio de espectrofotometria, em leitor de microplaca (ELx800 *Absorbance Microplate Reader*, Biotek, Vermont, EUA) e em um comprimento de onda de 540 nm. O nível de peroxidação lipídica foi descrito como nanogramas de TBARS/mL de sêmen.

2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software PASW (SPSS) 18.0 para Windows®.

2.7.1 Separação dos grupos experimentais

Inicialmente, foi avaliada a normalidade da distribuição de cada variável, utilizando-se histogramas e o teste Kolmogorov-Smirnov. Os pacientes considerados *outliers* dentro dos resultados de cada estudo foram excluídos. No caso da fragmentação do DNA dos espermatozoides, os dados foram padronizados por 1/log.

Em seguida, os pacientes foram divididos em percentis (15%) para cada análise, selecionando-se, assim, os 15% de pacientes com a menor integridade funcional e os 15% de pacientes com a maior integridade funcional em cada estudo realizado. No caso da fragmentação do DNA dos espermatozoides, os percentis foram calculados utilizando-se os valores não transformados. Esse valor de percentil foi utilizado, uma vez que foi o valor de corte em que a diferença entre os grupos

formados foi maximizada e a diferença dentro dos grupos, minimizada. A mesma análise estatística foi realizada para os níveis seminais de peroxidação lipídica.

Dessa forma, um par de grupos experimentais foi formado para cada estudo:

- Estudo 1 - Pacientes com alta (controle) e com baixa (alterado) atividade mitocondrial dos espermatozoides;
- Estudo 2 - Pacientes com alta (controle) e com baixa (alterado) integridade do acrossoma dos espermatozoides;
- Estudo 3 - Pacientes com baixa (controle) e com alta (alterado) fragmentação do DNA dos espermatozoides;
- Estudo 4 - Pacientes com baixo (controle) e com alto (alterado) nível seminal de peroxidação lipídica.

Posteriormente, o plasma seminal dos pacientes selecionados para comporem os grupos de cada estudo foi utilizado para a análise proteômica.

2.7.2 Análise estatística das variáveis seminais

Para comparação das variáveis seminais entre os grupos de cada estudo, primeiramente, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. As variáveis que não obedeceram à normalidade foram transformadas aos seus valores logarítmicos. Os grupos foram comparados por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas, adotando um alfa de 5%.

2.8 Análise proteômica do plasma seminal

2.8.1 Preparo das amostras

Primeiramente, foi realizada a dosagem de proteínas totais do plasma seminal de cada paciente selecionado, utilizando o método de Ensaio de Proteína BCA (Ácido Bicinconínico - Método de Lowry modificado) (64). A quantificação foi realizada por espectrofotometria, em leitor de microplaca (ELx800 *Absorbance Microplate Reader*, Biotek, Vermont, EUA) e em um comprimento de onda de 540 nm. Cada amostra foi quantificada em triplicata e a curva padrão contendo diferentes concentrações de albumina sérica bovina (0 a 1000 mg/mL), em duplicata. As amostras que apresentaram coeficientes de variação maior do que 5% foram

quantificadas novamente em outra corrida, para assegurar uma maior precisão na quantificação (Anexo II).

A partir da quantificação de proteínas, foram preparados quatro *pools* de plasma seminal de cada grupo formado anteriormente, de modo que houvesse variação biológica entre os *pools* (pacientes diferentes em cada *pool*). Os pacientes foram alocados nos *pools* por meio de uma randomização por sorteio sem reposição. As amostras de cada *pool* foram normalizadas pela concentração proteica. Todos os *pools* foram quantificados utilizando-se o protocolo descrito acima (Anexo II).

Em seguida, o volume correspondente a 50 µg de proteínas de cada *pool* foi diluído em água Milli-Q para um volume final de 50 µL, onde foram adicionados 10 µL de solução 50 mM NH₄HCO₃. As proteínas foram, então, desnaturadas por meio da adição de 25 µL de uma solução 2 mg/mL de surfactante RapiGest SF em água (*Waters*, Massachusetts, EUA). Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 80 °C por quinze minutos e, em seguida, foram centrifugadas (*spin*). Para facilitar a ação da tripsina, as pontes dissulfeto dos resíduos sulfurados das proteínas foram reduzidas por meio da adição de 2,5 µL de uma solução 100 mM DTT e incubação por trinta minutos a 60 °C. Após na centrifugação (*spin*), foram adicionados 2,5 µL de uma solução 300 mM iodoacetamida (*GE Healthcare*, Buckinghamshir, Reino Unido) para alquilação dos resíduos sulfurados das proteínas e as amostras foram mantidas no escuro à temperatura ambiente por trinta minutos. A digestão das proteínas ocorreu por meio da adição de 10 µL de uma solução 50 µg/mL de Tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega, Wisconsin, EUA) em 50 mM NH₄HCO₃ a uma razão de 1:100 enzima/proteína. As amostras foram incubadas a 37 °C em banho-maria por dezesseis horas. Após a digestão, a hidrólise do RapiGest SF foi realizada por meio da adição de 10 µL de uma solução 5% (v:v) ácido trifluoracético (TFA, *Merck Schuchardt OHG*, Hohenbrunn, Alemanha) em água (concentração final de TFA = 649 mM). Então, as amostras foram novamente incubadas a 37 °C por noventa minutos e, em seguida, centrifugadas a 16.100 xG por trinta minutos a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi transferido para frascos *Waters Total Recovery Vial* (*Waters*, Massachusetts, EUA),

2.8.2 Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

Os experimentos de LC-MS/MS foram conduzidos utilizando um sistema nanoACQUITY UPLC (*Waters*, Massachusetts, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap *Thermo Q-Exactive* (*Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, EUA) em alta resolução. O método de quantificação foi o de *label-free quantification* utilizando contagem espectral para construção de picos cromatográficos (para cálculos estequiométricos). Todos os *pools* foram corridos em triplicatas.

Para as corridas cromatográficas, dois μL (equivalente a 0,5 μg de produtos de digestão triptica) foram carregados em uma coluna PST C18 nanoACQUITY (180 μm x 20 mm) em um fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ de TFA 0,1% (v/v) durante três minutos. A separação analítica dos peptídeos foi realizada em uma coluna nanoACQUITY UPLC HSS C18 (1,8 μm , 75 μm x 150 mm). Um gradiente linear em dois passos foi utilizado, iniciando em 2% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1% (v/v) ácido fórmico e atingindo 5% (v/v) DMSO, 25% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido fórmico em sessenta minutos no primeiro passo, seguido de um gradiente de trinta minutos até atingir 5% (v/v) DMSO, 40% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido fórmico.

Foi utilizada uma fonte de nano-eletrospray como método de ionização (modo positivo) e foram corridos experimentos em análise dependente de informação (DDA) com uma estratégia *Top Twelve*, em que os doze principais íons precursores gerados por MS (faixa de m/z 390 a 1.650) foram selecionados para fragmentação (*Higher-energy collisional dissociation* - HCD) em um analisador de massas quadrupolo para sequenciamento peptídico (em MS/MS). O equipamento operou em uma resolução típica de 70.000 para as corridas MS e 17.500 para as corridas MS/MS.

2.8.3 Processamento dos espectros

O processamento dos espectros foi realizado utilizando o software MaxQuant 1.4.1.2 e o sistema de busca Andromeda para identificação e quantificação proteicas. Foram permitidas até duas clivagens perdidas pela tripsina e as modificações variáveis utilizadas foram oxidação de metionina e acetilação N-terminal de proteínas. A modificação fixa carbamidometil foi incluída devido à utilização do DTT seguido da iodoacetamida durante a digestão das proteínas. Os cromatogramas foram alinhados pelo *software* permitindo até dois minutos (em cada

direção) de distorção, a fim de maximizar a identificação dos espectros MS/MS. O banco de dados utilizado foi o *SwissProt* revisado (versão 2014_02_19, *download* em 19 de fevereiro de 2014, com 20.263 entradas e 13.081 kB). Para cálculo de falso-positivos foi utilizado um banco de dados *reverse* (gerado automaticamente). Foi permitido um erro (*False Discovery Rate*) máximo de 1%.

2.8.4 Análise dos dados

Para cada grupo, foram formadas quatro replicatas biológicas (*pools*), as quais foram adquiridas em triplicata no experimento de LC-MS/MS. A fim de maximizar o número de observações em cada estudo e como os dados de MS possuem uma natureza variável, cada replicata técnica dos *pools* foi considerada como uma observação diferente. Neste caso, cada grupo experimental obteve um número total de doze observações (n=12 por grupo). As proteínas contaminantes e as identificadas apenas por sítios de modificações proteicas e/ou em banco de dados de sequência reversa foram excluídas da análise. As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada estudo.

Os dados de quantificação absoluta baseada em intensidade (*intensity-based absolute quantification*, iBAQ), gerados pelo MaxQuant e normalizados pelo valor total de iBAQ (%iBAQ) de cada observação foram utilizados para análise quantitativa. As proteínas foram consideradas presentes em cada grupo se observadas em pelo menos três observações dentro do grupo. As proteínas presentes em uma ou duas observações do grupo foram consideradas artefatos e, portanto, excluídas.

Para análise estatística univariada, uma planilha em Microsoft Excel[®] (Office 365) foi construída para cada estudo. Inicialmente, uma análise descritiva foi realizada para cálculo do *fold-change* de %iBAQ (razão da média do grupo alterado sobre a média do grupo controle de cada estudo). Para comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t de *Student*, uma vez que os dados de iBAQ foram padronizados pela porcentagem, adotando-se um alfa de 5%. Assim, as proteínas hierexpressas ou exclusivas de cada grupo foram identificadas, bem como as proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual) entre os grupos de cada estudo. Os resultados das proteínas foram apresentados segundo as normas internacionais (*UniProt Accession Number* – UniProt AC e nome da proteína).

Para análise estatística multivariada, foi utilizada a plataforma *online* Metaboanalyst (65) e o *software* PASW (SPSS) 18.0 para Windows®. Inicialmente, os dados foram transformados aos seus valores logarítmicos para evitar o peso maior de proteínas com valores percentuais mais elevados e foi realizada uma análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Essa análise extrai os componentes (grupos de variáveis correlacionadas entre si) que melhor caracterizam a variável dependente (grupo de estudo). Dentro de cada componente, a matriz completa de dados recebe um escore VIP (*Variable Importance in the Projection*). Para os resultados de PLS-DA, foram reportados a porcentagem da variância dos dados explicada pelos três primeiros componentes, o gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos e as proteínas com escore VIP acima de dois nos cinco primeiros componentes. Essas foram utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante, a fim de selecionar as proteínas mais importantes para diferenciar os grupos experimentais de cada estudo, as quais foram sugeridas como potenciais biomarcadores de cada estudo.

Para análise de regressão logística, os dados não transformados de %iBAQ de cada proteína com escore VIP acima de dois foram utilizados como variáveis independentes e a variável de agrupamento foi utilizada como variável dependente. As variáveis independentes foram inseridas no modelo em um sistema passo-a-passo progressivo, até que a adição de mais uma variável não alterasse o modelo. Para esses resultados, foram reportados os valores preditivos do modelo, as curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para análise de sensibilidade e especificidade e as proteínas que melhor separaram os grupos.

Para análise discriminante, foi construído um modelo linear que partisse originalmente de todas as variáveis independentes (proteínas com escore VIP acima de dois) e as adicionasse passo-a-passo até que o modelo não alterasse significativamente. A variável dependente utilizada foi o grupo. Para essa análise, foram reportadas as proteínas e qual grupo essas ajudavam a prever participação.

2.8.5 Análise de enriquecimento funcional

Em cada estudo, as proteínas hipereexpressas ou exclusivas dos grupos controle e alterado e as proteínas conservadas entre os grupos foram utilizadas, inicialmente, para construção de um diagrama de Venn, utilizando o *software* Cytoscape 3.1.0 (66) e o aplicativo PINA4MS (67). As proteínas do grupo controle e

do grupo alterado foram utilizadas, então, para a análise de enriquecimento funcional de categorias de *Gene Ontology*, de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e de *Reactome*, utilizando o aplicativo ClueGO 2.1.1 para Cytoscape (68). Esse aplicativo utiliza o teste kappa de frequências e correção de Bonferroni para calcular (i) a frequência das funções dentro dos *clusters* de proteínas, (ii) a frequência das funções na base de dados inteira e (iii) se essas frequências são diferentes (68). Apenas funções enriquecidas com valor de p menor do que 0,05 foram consideradas.

3 RESULTADOS

3.1 Estudo 1 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides

Para a separação dos grupos experimentais do estudo 1, foi utilizada a variável porcentagem de espermatozoides classificados como DAB classe III, pois em estudos anteriores essa foi a variável de atividade mitocondrial com maior correlação com as diferenças biológicas estudadas (15,16,18,21). Os grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides, n = 26) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides, n = 23) apresentaram média; desvio padrão de 5,9%; 1,42% e 22,4%; 4,12%, respectivamente ($p < 0,0001$). O valor de corte para o grupo controle foi de 7,5% (percentil 15% inferior) e para o grupo alterado, de 19% (percentil 15% superior). A comparação entre os dados clínicos (idade, variáveis seminais, demais análises funcionais dos espermatozoides e nível seminal de peroxidação lipídica) de cada grupo está representada na Tabela 1. Apenas a motilidade total e a imotilidade apresentaram diferença significativa entre os grupos, sendo a primeira maior no grupo controle e a segunda, maior no grupo alterado.

Tabela 1. Análise seminal dos grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1. Os grupos foram comparados por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$). Variáveis que não obedeceram à normalidade foram padronizadas por seus valores logarítmicos anteriormente à análise estatística.

	Controle (n=26)	Alterado (n=23)	p
DAB classe III (%)			
Média; DP	5,9; 1,42	22,4; 4,12	<0,0001*
IC 95%	5,3 – 6,4	20,6 – 24,2	
Acrossomas íntegros (%)			
Média; DP	76,9; 5,95	74,8; 9,81	0,378
IC 95%	74,5 – 79,3	70,6 – 79,1	
Comet Distributed Moment (u.a.)			
Média; DP	42,9; 16,59	39,2; 13,07	0,376
IC 95%	36,2 – 49,6	33,5 – 44,8	
TBARS (ng/mL)			
Média; DP	24,5; 6,30	21,9; 6,55	0,165
IC 95%	21,9 – 27,0	19,0 – 24,7	
Idade (anos)			
Média; DP	34,5; 6,01	34,8; 5,31	0,842
IC 95%	32,1 – 36,9	32,5 – 37,1	
Volume (mL)			
Média; DP	3,6; 1,32	3,8; 1,28	0,642
IC 95%	3,1 – 4,2	3,3 – 4,4	
Concentração ($\times 10^6$/mL)			
Média; DP	116,4; 64,05	107,9; 85,45	0,216
IC 95%	90,5 – 142,3	71,0 – 144,9	
Motilidade progressiva (%)			
Média; DP	55,0; 7,32	50,7; 10,88	0,114
IC 95%	52,0 – 57,9	46,0 – 55,4	
Motilidade total (%)			
Média; DP	60,2; 7,03	55,0; 10,62	0,049*
IC 95%	57,4 – 63,0	50,5 – 59,6	
Imotilidade (%)			
Média; DP	39,8; 7,03	45,0; 10,62	0,049*
IC 95%	37,0 – 42,6	40,4 – 49,5	
Morfologia (% normais)			
Média; DP	8,2; 3,12	6,7; 2,36	0,066
IC 95%	6,9 – 9,5	5,7 – 7,7	
Células redondas ($\times 10^6$/mL)			
Média; DP	1,9; 2,28	1,9; 2,05	0,898
IC 95%	1,0 – 2,9	1,1 – 2,8	
Neutrófilos ($\times 10^6$/mL)			
Média; DP	0,2; 0,27	0,1; 0,12	0,455
IC 95%	0,05 – 0,3	0,03 – 0,1	

DAB: 3,3'-Diaminobenzidina

DAB classe III: menos de 50% da peça intermediária do espermatozoide corada

TBARS: Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

DP: Desvio Padrão

IC 95%: Intervalo de Confiança de 95% da média

No total, foram observadas quinhentas e nove proteínas no estudo 1, das quais três foram quantificadas em menos de três replicatas em cada grupo e, por isso, foram excluídas. As quinhentas e seis proteínas restantes foram quantificadas nos dois grupos e submetidas à análise estatística univariada (Figura 1). Dessas, quatro proteínas foram exclusivas e trinta e seis foram hiperexpressas no grupo controle (Tabela 2), enquanto três proteínas foram exclusivas e sessenta e uma foram hiperexpressas no grupo alterado (Tabela 3). Quatrocentas e duas proteínas apresentaram-se conservadas entre os grupos (Anexo III).

Figura 1. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides, verde) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides, vermelho) do estudo 1. A intersecção dos grupos representa as proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual, amarelo) entre os grupos.

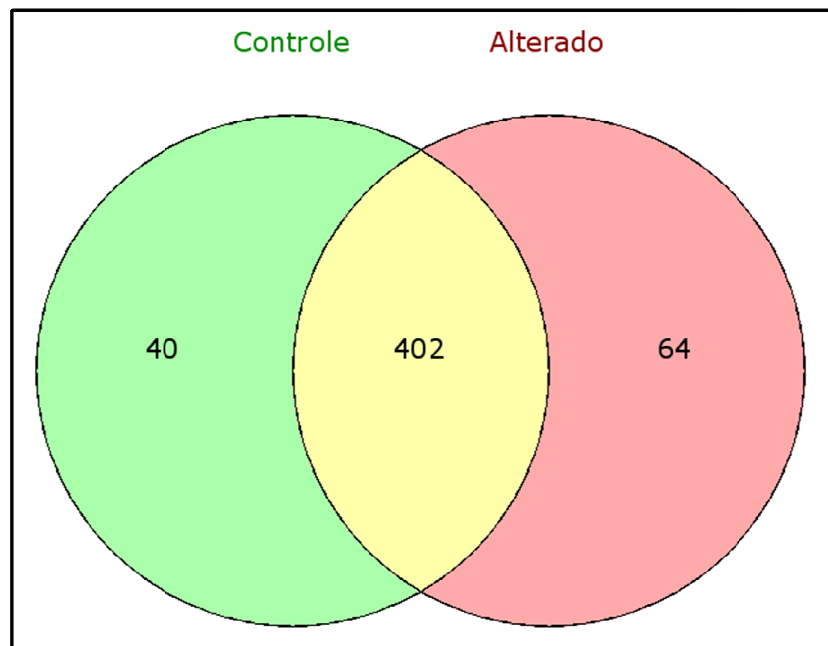


Tabela 2. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
O15296	<i>Arachidonate 15-lipoxygenase B</i>	-	Exclusiva
P01871	<i>Ig mu chain C region</i>	-	Exclusiva
Q8IYJ3	<i>Synaptotagmin-like protein 1</i>	-	Exclusiva
O95359	<i>Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2</i>	-	Exclusiva
P22061	<i>Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase</i>	<0,001	0,045
P07711	<i>Cathepsin L1</i>	0,001	0,409
P21246	<i>Pleiotrophin</i>	<0,001	0,423
Q5SNT6	<i>WASH complex subunit FAM21B</i>	0,013	0,451
P20336	<i>Ras-related protein Rab-3A</i>	0,012	0,507
Q99985	<i>Semaphorin-3C</i>	0,004	0,510
Q07654	<i>Trefoil factor 3</i>	0,020	0,625
Q14914	<i>Prostaglandin reductase 1</i>	0,035	0,626
P00441	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	0,006	0,652
P98095	<i>Fibulin-2</i>	0,003	0,667
P01861	<i>Ig gamma-4 chain C region</i>	0,015	0,670
P22352	<i>Glutathione peroxidase 3</i>	0,007	0,687
Q9UHI8	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>	0,022	0,691
P35475	<i>Alpha-L-iduronidase</i>	0,001	0,709
Q9H8J5	<i>MANSC domain-containing protein 1</i>	0,031	0,721
P00390	<i>Glutathione reductase, mitochondrial</i>	0,014	0,721
Q04609	<i>Glutamate carboxypeptidase 2</i>	0,028	0,726
Q8IZJ3	<i>C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8</i>	0,034	0,727
Q8WX94	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 7</i>	0,026	0,737
Q00796	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	0,003	0,737
P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	0,048	0,751
O75874	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	0,008	0,764
Q9H0W9	<i>Ester hydrolase C11orf54</i>	0,033	0,770
P60953	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>	0,037	0,771
O75882	<i>Attractin</i>	0,029	0,775
P20337	<i>Ras-related protein Rab-3B</i>	0,014	0,784
P80303	<i>Nucleobindin-2</i>	0,002	0,794
O14494	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1</i>	0,031	0,798
P09525	<i>Annexin A4</i>	0,037	0,802
Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>	0,030	0,802
P01033	<i>Metalloproteinase inhibitor 1</i>	0,035	0,805
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	0,005	0,807
P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	0,010	0,808
P07288	<i>Prostate-specific antigen</i>	0,021	0,821
O75629	<i>Protein CREG1</i>	0,013	0,822
O43175	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	0,034	0,827

Tabela 3. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
P53367	<i>Arfaptin-1</i>	-	Exclusiva
P12109	<i>Collagen alpha-1(VI) chain</i>	-	Exclusiva
Q9BS26	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 44</i>	-	Exclusiva
Q53H76	<i>Phospholipase A1 member A</i>	0,004	1,221
Q01459	<i>Di-N-acetylchitobiase</i>	0,012	1,236
P49720	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	0,033	1,254
P02788	<i>Lactotransferrin</i>	0,001	1,270
Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	0,023	1,284
P02751	<i>Fibronectin</i>	0,001	1,296
P17405	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase</i>	<0,001	1,306
P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	<0,001	1,309
P07602	<i>Prosaposin</i>	<0,001	1,323
P14625	<i>Endoplasmic reticulum chaperone protein BiP</i>	0,002	1,335
P51993	<i>Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 6</i>	0,009	1,349
P08571	<i>Monocyte differentiation antigen CD14</i>	0,038	1,350
Q96GW7	<i>Brevican core protein</i>	0,036	1,357
P54108	<i>Cysteine-rich secretory protein 3</i>	0,048	1,380
Q9HB40	<i>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</i>	0,009	1,400
P25787	<i>Proteasome subunit alpha type-2</i>	0,012	1,404
P05154	<i>Plasma serine protease inhibitor</i>	0,004	1,404
Q9UBX1	<i>Cathepsin F</i>	0,041	1,410
P19021	<i>Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase</i>	0,035	1,420
P20062	<i>Transcobalamin-2</i>	0,013	1,450
P08697	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	0,004	1,451
Q01638	<i>Interleukin-1 receptor-like 1</i>	0,002	1,471
P52209	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>	0,042	1,472
P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	0,026	1,476
Q15185	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	0,022	1,511
P10323	<i>Acrosin</i>	0,030	1,513
Q9NQ79	<i>Cartilage acidic protein 1</i>	0,043	1,516
P0C0L5	<i>Complement C4-B</i>	0,010	1,536
P48723	<i>Heat shock 70 kDa protein 13</i>	0,018	1,538
Q14507	<i>Epididymal secretory protein E3-alpha</i>	0,009	1,540
P07205	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	0,002	1,552
P21810	<i>Biglycan</i>	0,045	1,565
O43854	<i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>	0,023	1,589
Q075Z2	<i>Binder of sperm protein homolog 1</i>	0,012	1,608
Q14515	<i>SPARC-like protein 1</i>	0,001	1,629
P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	0,001	1,633
P62805	<i>Histone H4</i>	0,027	1,640
O60635	<i>Tetraspanin-1</i>	0,001	1,660
P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>	0,038	1,672

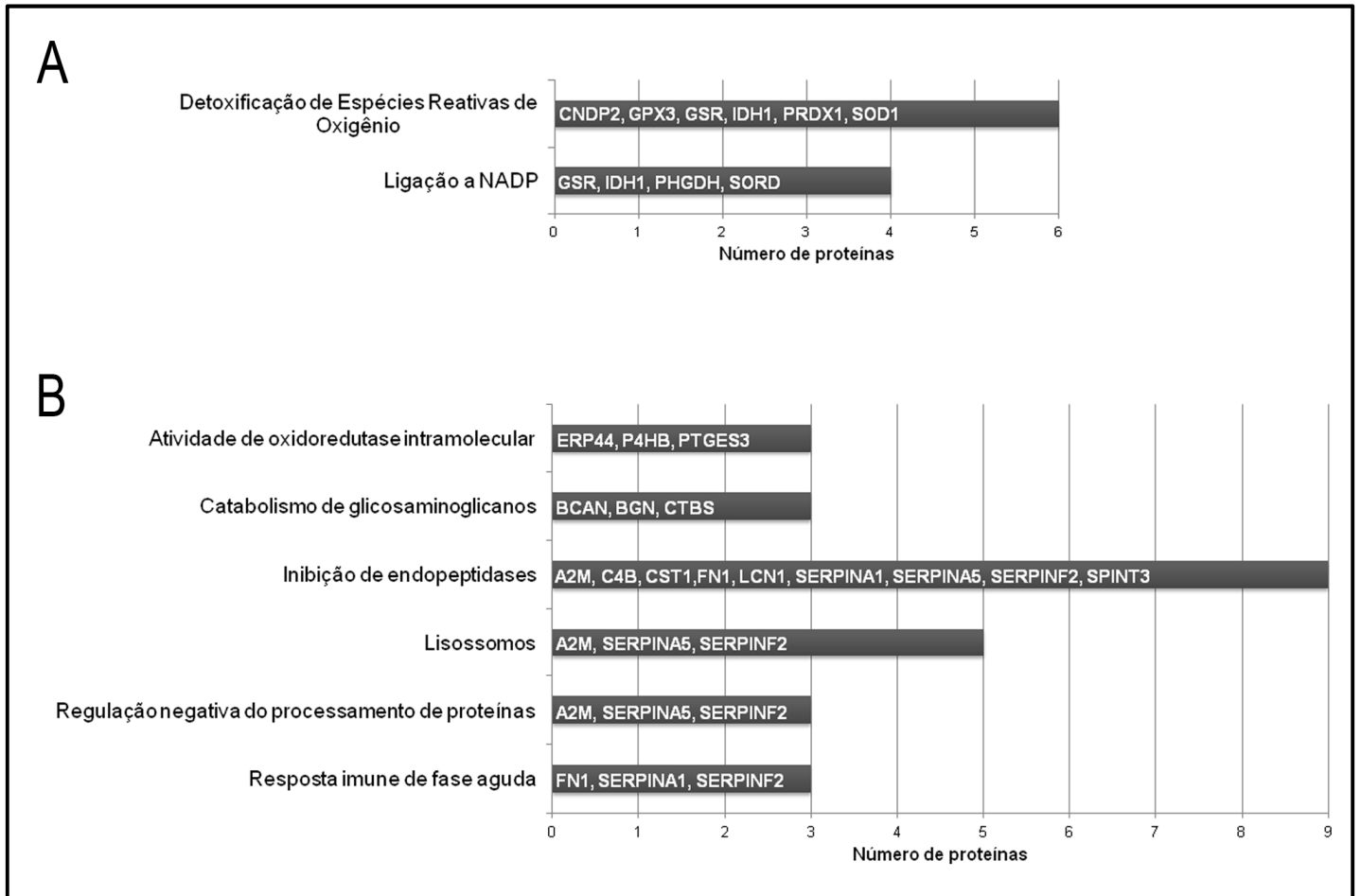
Continua...

...continuação e conclusão da tabela 3.

P00491	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	0,002	1,705
P01023	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	0,002	1,724
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	0,017	1,776
Q9UHC6	<i>Contactin-associated protein-like 2</i>	0,020	1,781
Q6BCY4	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 2</i>	0,002	1,832
P23381	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	0,003	1,832
Q9H3G5	<i>Probable serine carboxypeptidase CPVL</i>	0,035	1,840
Q96BH3	<i>Epididymal sperm-binding protein 1</i>	0,004	1,853
P20073	<i>Annexin A7</i>	0,001	1,866
Q9UNW1	<i>Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1</i>	<0,001	1,901
P31025	<i>Lipocalin-1</i>	0,018	1,975
Q99878	<i>Histone H2A type 1-J</i>	0,001	1,977
P49223	<i>Kunitz-type protease inhibitor 3</i>	0,001	1,988
O00584	<i>Ribonuclease T2</i>	<0,001	2,029
Q13093	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase</i>	0,017	2,104
P53634	<i>Dipeptidyl peptidase 1</i>	0,027	2,120
P29218	<i>Inositol monophosphatase 1</i>	0,004	2,120
P07864	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	0,001	2,120
P01833	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	0,008	2,191
P01037	<i>Cystatin-SN</i>	0,011	3,277
P24593	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i>	0,002	3,637
P21266	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	0,001	3,661

As funções enriquecidas no plasma seminal do grupo controle foram detoxificação de EROs e ligação a NADP (Figura 2A). No grupo alterado, as principais funções foram atividade de oxidoreductase intramolecular, catabolismo de glicosaminoglicanos, inibição de endopeptidases, lisossomos, regulação negativa do processamento de proteínas e resposta imune de fase aguda (Figura 2B).

Figura 2. Funções enriquecidas no plasma seminal dos grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides, A) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides, B) do estudo 1.



Na análise multivariada por PLS-DA, 25,8% da variância dos dados do estudo 1 foi explicada pelos três primeiros componentes formados. Utilizando-se esses componentes, uma separação completa entre os grupos foi atingida (Figura 3). Além disso, vinte e nove proteínas com escore VIP acima de dois foram selecionadas e utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante (Tabela 4). Dessas, duas proteínas foram incluídas no modelo final de regressão logística como sendo as proteínas mais importantes para diferenciar o grupo alterado do grupo controle ($p < 0,001$). Essas proteínas foram identificadas como *annexin A7* (UniProt AC P20073) e *CD63 antigen* (UniProt AC P08962). O modelo apresentou valores preditivos positivo, negativo e total de 91,7% e uma área abaixo da curva ROC de 99,3% (Figura 4). A análise discriminante, por sua vez, revelou que as proteínas *acrosin-binding protein* (UniProt AC Q8NEB7), *annexin A7* (UniProt AC P20073), *beta-hexosaminidase subunit alpha* (UniProt AC P06865), *BPI fold-containing family B member 1* (UniProt AC Q8TDL5), *cystatin SA* (UniProt AC P09228), *endoplasmic reticulum resident protein 44* (UniProt AC Q9BS26) e *glutathione S-transferase Mu 3* (UniProt AC P21266) foram capazes de predizer o grupo alterado.

Figura 3. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 1 (análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O PLS-DA foi realizado utilizando os valores logarítmicos da quantificação das proteínas em cada replicata (triângulos).

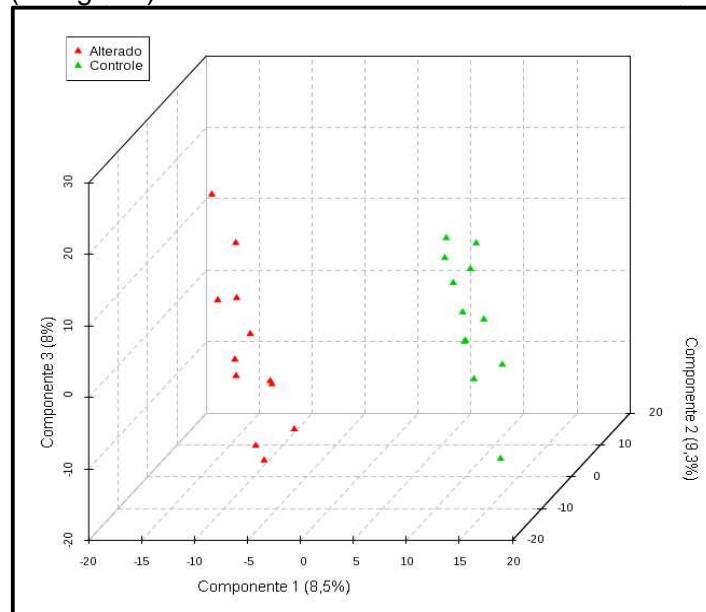


Tabela 4. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 1 (análise proteômica em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides).

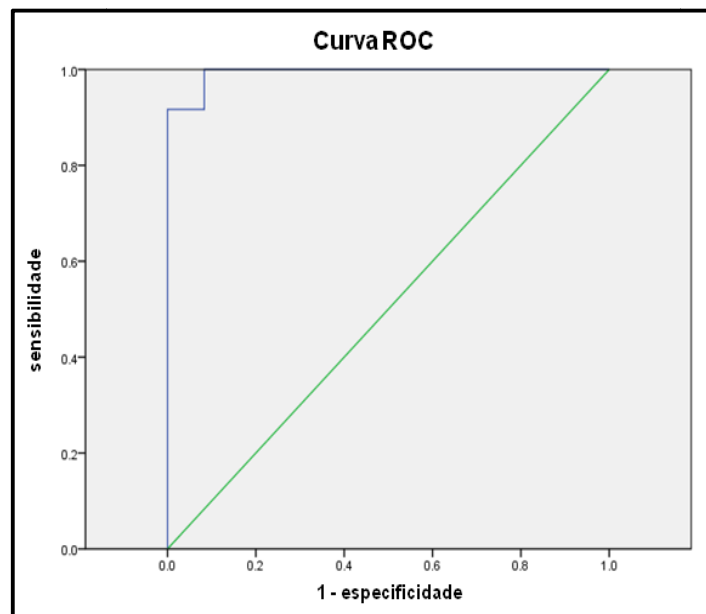
UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
O95359	<i>Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2</i>	-	Controle
P12109	<i>Collagen alpha-1(VI) chain</i>	-	Alterado
P53367	<i>Arfaptin-1</i>	-	Alterado
Q9BS26	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 44</i>	-	Alterado
P22061	<i>Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase</i>	0,000	0,045
Q9Y5Z4	<i>Heme-binding protein 2</i>	0,116	0,723
O14494	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1</i>	0,031	0,798
Q8N1N0	<i>C-type lectin domain family 4 member F</i>	0,114	0,818
Q96JG6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 132</i>	0,497	0,838
Q96CN7	<i>Isochorismatase domain-containing protein 1</i>	0,276	0,845
P08962	<i>CD63 antigen</i>	0,662	0,896
Q6UWW0	<i>Lipocalin-15</i>	0,781	0,952
Q96RS0	<i>Trimethylguanosine synthase</i>	0,961	0,986
P08195	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	0,507	1,140
Q8N128	<i>Protein FAM177A1</i>	0,439	1,193

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 4.

O43291	<i>Kunitz-type protease inhibitor 2</i>	0,522	1,350
Q8NEB7	<i>Acrosin-binding protein</i>	0,146	1,351
P31949	<i>Protein S100-A11</i>	0,093	1,410
O00423	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 1</i>	0,298	1,512
P06865	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	0,165	1,524
Q7L266	<i>Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase</i>	0,083	1,655
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	0,017	1,776
P51854	<i>Transketolase-like protein 1</i>	0,354	1,853
P20073	<i>Annexin A7</i>	0,001	1,866
P31025	<i>Lipocalin-1</i>	0,018	1,975
Q8TDL5	<i>BPI fold-containing family B member 1</i>	0,109	3,571
P24593	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i>	0,002	3,637
P21266	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	0,001	3,661
P09228	<i>Cystatin-SA</i>	0,076	6,386

Figura 4. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) representativa do modelo de regressão logística do estudo 1 (análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides).



$$f(x) = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

$$z = -6,4 - 1274,5 * \mathbf{P08962} + 13168,4 * \mathbf{P20073}$$

3.2 Estudo 2 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides

Para a separação dos grupos experimentais do estudo 2, foi utilizada a variável porcentagem de espermatozoides com acrossomas íntegros. Os grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides, n = 23) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides, n = 22) apresentaram média; desvio padrão de 86,2%; 4,01% e 63,2%; 3,54%, respectivamente ($p < 0,0001$). O valor de corte para o grupo controle foi de 82% (percentil 15% superior) e para o grupo alterado, de 67% (percentil 15% inferior). A comparação entre os dados clínicos (idade, variáveis seminais, demais análises funcionais dos espermatozoides e nível seminal de peroxidação lipídica) de cada grupo está representada na Tabela 5. A motilidade progressiva, a motilidade total e a morfologia foram estatisticamente maiores no grupo controle, enquanto o volume e a imotilidade foram estatisticamente maiores no grupo alterado.

Tabela 5. Análise seminal dos grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2. Os grupos foram comparados por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$). Variáveis que não obedeceram à normalidade foram padronizadas por seus valores logarítmicos anteriormente à análise estatística.

	Controle (n=23)	Alterado (n=22)	p
Acrossomas íntegros (%)			
Média; DP	86,2; 4,01	63,2; 3,54	<0,0001*
IC 95%	84,5 – 88,0	61,6 – 64,8	
DAB classe III (%)			
Média; DP	13,9; 8,45	14,2; 4,94	0,443
IC 95%	10,3 – 17,6	12,0 – 16,4	
Comet Distributed Moment (u.a.)			
Média; DP	43,7; 14,60	40,6; 18,33	0,337
IC 95%	37,4 – 50,0	32,5 – 48,8	
TBARS (ng/mL)			
Média; DP	22,6; 4,76	24,5; 5,35	0,215
IC 95%	20,5 – 24,6	22,1 – 26,9	
Idade (anos)			
Média; DP	32,8; 6,30	34,2; 4,69	0,311
IC 95%	30,1 – 35,5	32,1 – 36,3	
Volume (mL)			
Média; DP	3,5; 1,24	4,5; 1,83	0,023*
IC 95%	2,9 – 4,0	3,7 – 5,4	
Concentração ($\times 10^6$/mL)			
Média; DP	110,6; 86,51	68,9; 56,81	0,084
IC 95%	73,2 – 148,0	43,7 – 94,1	
Motilidade progressiva (%)			
Média; DP	57,8; 6,86	47,7; 10,12	<0,0001*
IC 95%	54,8 – 60,7	43,2 – 52,2	

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 5.

Motilidade total (%)			
Média; DP	62,9; 6,59	52,4; 10,45	<0,0001*
IC 95%	60,0 – 65,7	47,7 – 57,0	
Imotilidade (%)			
Média; DP	37,1; 6,59	47,6; 10,45	<0,0001*
IC 95%	34,3 – 40,0	43,0 – 52,3	
Morfologia (% normais)			
Média; DP	8,4; 3,13	6,3; 1,99	0,012*
IC 95%	7,0 – 9,7	5,4 – 7,2	
Células redondas (x10⁶/mL)			
Média; DP	2,4; 2,59	1,1; 0,74	0,069
IC 95%	1,3 – 3,5	0,8 – 1,4	
Neutrófilos (x10⁶/mL)			
Média; DP	0,1; 0,20	0,1; 0,11	0,183
IC 95%	0,02 – 0,2	0,01 – 0,1	

DAB: 3,3'-Diaminobenzidina

DAB classe III: menos de 50% da peça intermediária do espermatozoide corada

TBARS: Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

DP: Desvio Padrão

IC 95%: Intervalo de Confiança de 95% da média

No total, foram observadas quatrocentas e noventa e sete proteínas no estudo 2, das quais quatro foram quantificadas em menos de três replicatas em cada grupo e, por isso, foram excluídas. As quatrocentas e noventa e três proteínas restantes foram quantificadas nos dois grupos e submetidas à análise estatística univariada (Figura 5). Dessas, cinco proteínas foram exclusivas e vinte e duas foram hiperexpressas no grupo controle (Tabela 6), enquanto duas proteínas foram exclusivas e quarenta e sete foram hiperexpressas no grupo alterado (Tabela 7). Quatrocentas e dezessete proteínas apresentaram-se conservadas entre os grupos (Anexo IV).

Figura 5. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides, verde) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides, vermelho) do estudo 2. A intersecção dos grupos representa as proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual, amarelo) entre os grupos.

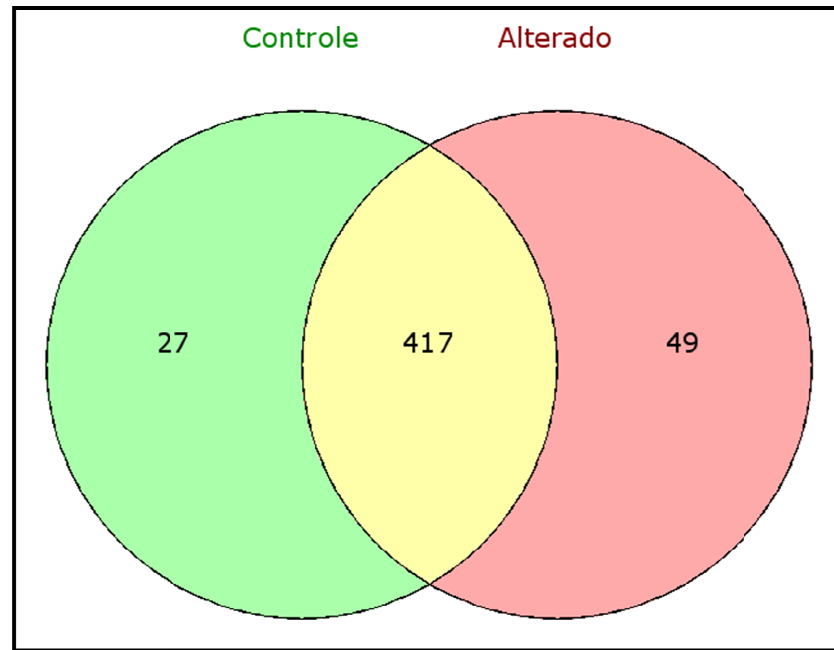


Tabela 6. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	-	Exclusiva
P00750	<i>Tissue-type plasminogen activator</i>	-	Exclusiva
P23526	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	-	Exclusiva
Q14055	<i>Collagen alpha-2(IX) chain</i>	-	Exclusiva
Q5T5C0	<i>Syntaxin-binding protein 5</i>	-	Exclusiva
P35625	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>	0,021	0,345
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	0,001	0,364
P08253	<i>72 kDa type IV collagenase</i>	<0,001	0,508
P19652	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>	<0,001	0,530
P41222	<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase</i>	0,007	0,590
P80188	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>	0,002	0,600
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	0,010	0,607
Q9H4B8	<i>Dipeptidase 3</i>	0,002	0,609
O00584	<i>Ribonuclease T2</i>	0,001	0,639
Q6UW15	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma</i>	0,011	0,650
Q02487	<i>Desmocollin-2</i>	0,042	0,670

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 6.

P01591	<i>Immunoglobulin J chain</i>	0,043	0,683
Q08648	<i>Sperm-associated antigen 11B</i>	0,014	0,687
Q03167	<i>Transforming growth factor beta receptor type 3</i>	0,026	0,711
P0CG04	<i>Ig lambda-1 chain C regions</i>	0,002	0,712
Q13421	<i>Mesothelin</i>	0,024	0,729
P02787	<i>Serotransferrin</i>	0,009	0,731
P01876	<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	0,003	0,752
O43451	<i>Maltase-glucoamylase, intestinal</i>	0,004	0,756
P00751	<i>Complement factor B</i>	0,003	0,762
Q9GZX9	<i>Twisted gastrulation protein homolog 1</i>	0,037	0,774
P13796	<i>Plastin-2</i>	0,001	0,789

Tabela 7. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
P55058	<i>Phospholipid transfer protein</i>	-	Exclusiva
Q99523	<i>Sortilin</i>	-	Exclusiva
Q9UBI6	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12</i>	0,045	1,204
O00391	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	0,018	1,205
P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	0,044	1,211
P22352	<i>Glutathione peroxidase 3</i>	0,008	1,222
Q15185	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	0,003	1,224
Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>	0,004	1,228
Q9Y646	<i>Carboxypeptidase Q</i>	0,023	1,233
P51149	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>	0,004	1,239
O43581	<i>Synaptotagmin-7</i>	0,016	1,252
P12429	<i>Annexin A3</i>	0,015	1,257
Q9UJJ9	<i>N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma</i>	0,007	1,258
P54802	<i>Alpha-N-acetylglucosaminidase</i>	0,035	1,260
P08473	<i>Neprilysin</i>	0,005	1,266
O00194	<i>Ras-related protein Rab-27B</i>	0,044	1,267
P05155	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	0,049	1,281
P07288	<i>Prostate-specific antigen</i>	0,012	1,284
Q93099	<i>Homogentisate 1,2-dioxygenase</i>	<0,001	1,286
Q8WUM4	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>	0,003	1,295
P27487	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	<0,001	1,313
P07437	<i>Tubulin beta chain</i>	0,025	1,324
Q9BQE3	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	0,001	1,326
O75629	<i>Protein CREG1</i>	0,019	1,329
Q9H0E2	<i>Toll-interacting protein</i>	0,003	1,358
P11279	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</i>	0,011	1,386

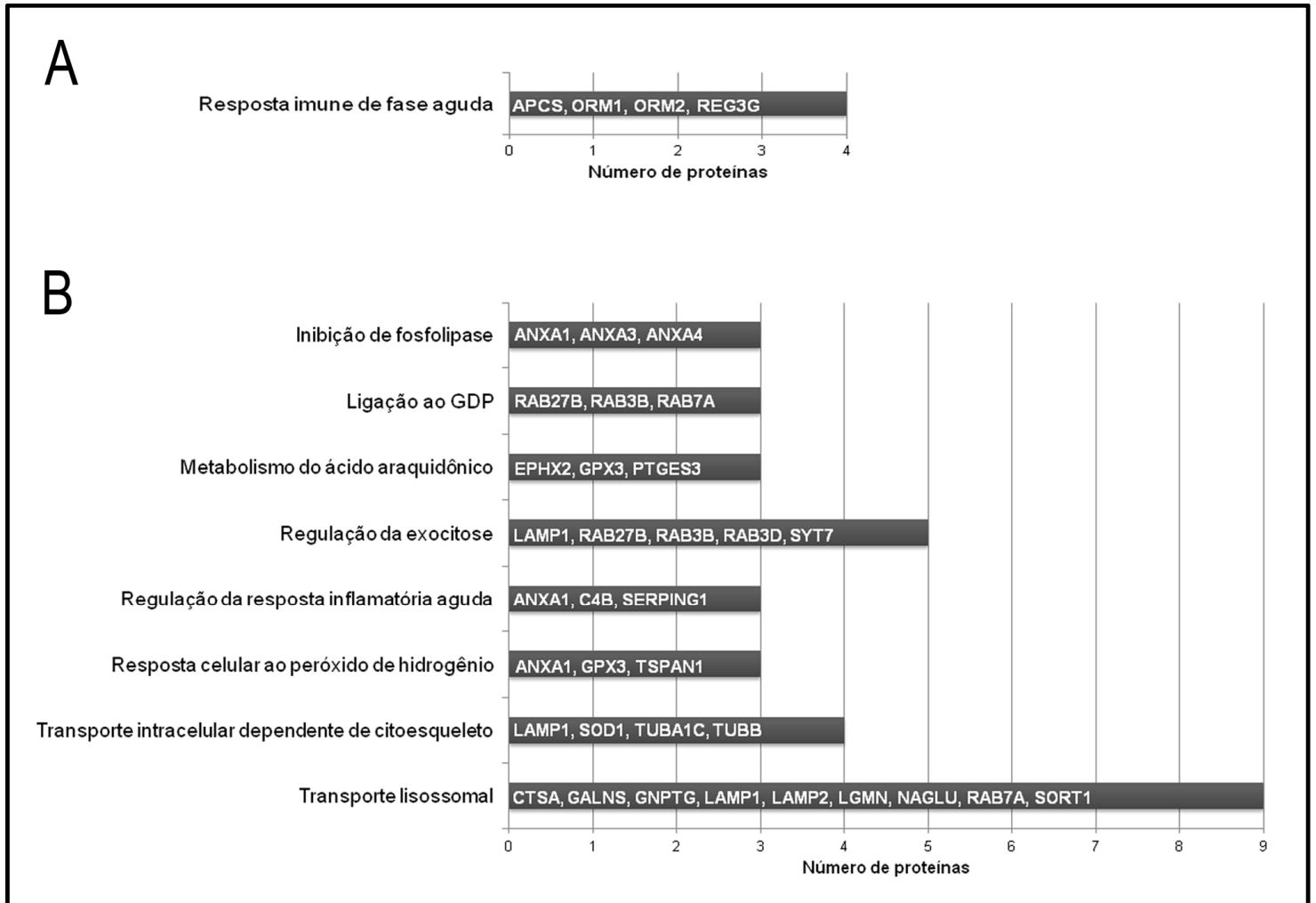
Continua...

...continuação e conclusão da tabela 7.

Q5T1V6	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX59</i>	0,042	1,397
Q99538	<i>Legumain</i>	0,004	1,403
P20337	<i>Ras-related protein Rab-3B</i>	0,006	1,407
P09525	<i>Annexin A4</i>	0,006	1,442
P04083	<i>Annexin A1</i>	<0,001	1,448
O60635	<i>Tetraspanin-1</i>	0,005	1,480
P10619	<i>Lysosomal protective protein</i>	0,001	1,486
O14672	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	0,046	1,488
P34059	<i>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</i>	0,002	1,489
P00441	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	0,006	1,490
Q8N6Q3	<i>CD177 antigen</i>	0,004	1,503
P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	0,003	1,523
O94813	<i>Slit homolog 2 protein</i>	0,006	1,527
P28799	<i>Granulins</i>	0,025	1,529
P13473	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 2</i>	0,006	1,570
P50150	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4</i>	0,005	1,613
P0C0L5	<i>Complement C4-B</i>	0,002	1,618
O95716	<i>Ras-related protein Rab-3D</i>	<0,001	1,658
P10323	<i>Acrosin</i>	<0,001	1,711
P14550	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>	0,018	1,805
P34913	<i>Bifunctional epoxide hydrolase 2</i>	0,037	1,991
Q8NEB7	<i>Acrosin-binding protein</i>	0,003	2,280
P07384	<i>Calpain-1 catalytic subunit</i>	0,038	2,769

A função enriquecida no plasma seminal do grupo controle foi resposta imune de fase aguda (Figura 6A), enquanto no grupo alterado as principais funções foram inibição de fosfolipase, ligação ao GDP, metabolismo do ácido araquidônico, regulação da excitose, regulação da resposta inflamatória aguda, resposta celular ao peróxido de hidrogênio, transporte intracelular dependente de citoesqueleto e transporte lisossomal (Figura 6B).

Figura 6. Funções enriquecidas no plasma seminal dos grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides, A) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides, B) do estudo 2.



Na análise multivariada por PLS-DA, 30,3% da variância dos dados do estudo 2 foi explicada pelos três primeiros componentes formados. Utilizando-se esses componentes, uma separação completa entre os grupos foi atingida (Figura 7). Além disso, trinta e oito proteínas com escore VIP acima de dois foram selecionadas e utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante (Tabela 8). Dessas, duas proteínas foram incluídas no modelo final de regressão logística como sendo as proteínas mais importantes para diferenciar o grupo alterado do grupo controle ($p < 0,001$). Essas proteínas foram identificadas como *collagen alpha-1(XII) chain* (UniProt AC Q99715) e *phospholipid transfer protein* (UniProt AC P55058). O modelo apresentou valores preditivos positivo de 83,3%, negativo de 91,7% e total de 87,5% e uma área abaixo da curva ROC de 97,2% (Figura 8). A análise discriminante, por sua vez, revelou que as proteínas *collagen alpha-1(XII) chain* (UniProt AC Q99715), *lipocalin-15* (UniProt AC Q6UWW0), *phospholipid transfer protein* (UniProt AC P55058), *protein S100-A10* (UniProt AC P60903), *protein shisa-5* (UniProt AC Q8N114) e *zinc finger protein 236* (UniProt AC Q9UL36) foram capazes de prever o grupo alterado.

Figura 7. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 2 (análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O PLS-DA foi realizado utilizando os valores logarítmicos da quantificação das proteínas em cada replicata (triângulos).

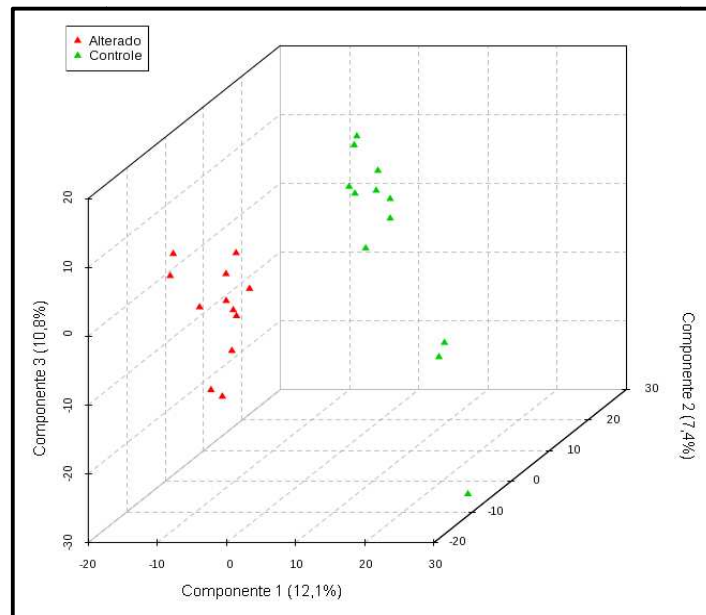


Tabela 8. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 2 (análise proteômica em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides).

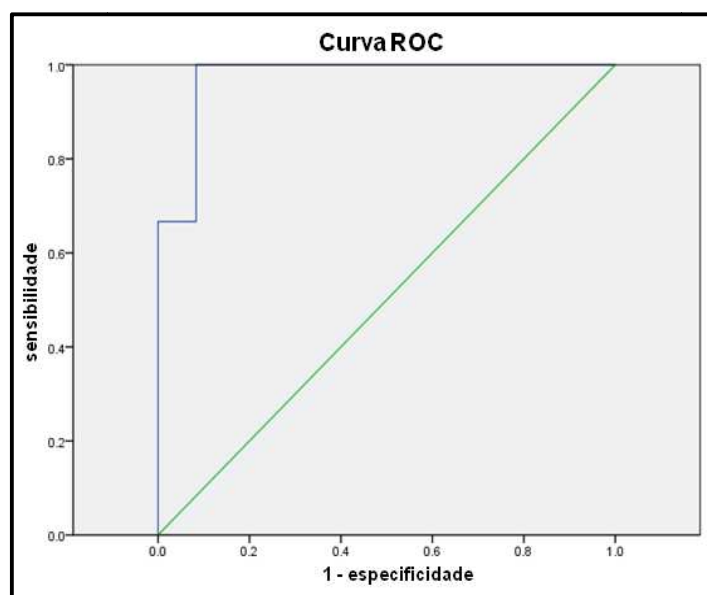
UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	-	Controle
P23526	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	-	Controle
Q14055	<i>Collagen alpha-2(IX) chain</i>	-	Controle
Q5T5C0	<i>Syntaxin-binding protein 5</i>	-	Controle
P55058	<i>Phospholipid transfer protein</i>	-	Alterado
Q99523	<i>Sortilin</i>	-	Alterado
Q5KU26	<i>Collectin-12</i>	0,285	0,287
P35625	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>	0,021	0,345
P53367	<i>Arfaptin-1</i>	0,598	0,484
P10599	<i>Thioredoxin</i>	0,255	0,746
P17936	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>	0,352	0,756
Q9H239	<i>Matrix metalloproteinase-28</i>	0,647	0,896
P14209	<i>CD99 antigen</i>	0,845	0,949
Q9Y653	<i>G-protein coupled receptor 56</i>	0,732	0,960
P50991	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	0,837	0,973
P02647	<i>Apolipoprotein A-I</i>	0,975	0,981
Q8IZ41	<i>Ras and EF-hand domain-containing protein</i>	0,990	1,003

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 8.

Q8N114	<i>Protein shisa-5</i>	0,205	1,142
P49773	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>	0,571	1,154
O00423	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 1</i>	0,678	1,162
Q9NR45	<i>Sialic acid synthase</i>	0,289	1,184
Q15185	<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	0,003	1,224
P24855	<i>Deoxyribonuclease-1</i>	0,219	1,226
Q86UD1	<i>Out at first protein homolog</i>	0,384	1,283
O75629	<i>Protein CREG1</i>	0,019	1,329
Q9BZQ8	<i>Protein Niban</i>	0,649	1,334
P28066	<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	0,318	1,367
Q13217	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>	0,142	1,377
Q5SNT6	<i>WASH complex subunit FAM21B</i>	0,290	1,580
P50150	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-4</i>	0,005	1,613
Q99816	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>	0,064	1,829
Q8NEB7	<i>Acrosin-binding protein</i>	0,003	2,280
Q99715	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>	0,055	2,559
Q6UWW0	<i>Lipocalin-15</i>	0,057	2,724
Q9UL36	<i>Zinc finger protein 236</i>	0,384	2,774
P35998	<i>26S protease regulatory subunit 7</i>	0,215	2,943
P51888	<i>Prolargin</i>	0,255	3,221
P60903	<i>Protein S100-A10</i>	0,247	8,868

Figura 8. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) representativa do modelo de regressão logística do estudo 2 (análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides).



$$f(x) = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

$$z = -4,6 + 69305,5 * \mathbf{Q99715} + 1574,7 * \mathbf{P55058}$$

3.3 Estudo 3 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides

Para a separação dos grupos experimentais do estudo 3, foi utilizada a variável *Comet Distributed Moment* (u.a.). Os grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides, n = 22) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, n = 22) apresentaram média; desvio padrão de 26,2 u.a.; 2,72 u.a. e 63,9 u.a.; 9,49 u.a., respectivamente (p<0,0001). O valor de corte para o grupo controle foi de 28,40 u.a. (percentil 15% inferior) e para o grupo alterado, de 54,11 u.a. (percentil 15% superior). A comparação entre os dados clínicos (idade, variáveis seminais, demais análises funcionais dos espermatozoides e nível seminal de peroxidação lipídica) de cada grupo está representada na Tabela 9. Apenas a morfologia apresentou diferença significativa entre os grupos, estando maior no grupo controle.

Tabela 9. Análise seminal dos grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3. Os grupos foram comparados por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas (p<0,05). Variáveis que não obedeceram à normalidade foram padronizadas por seus valores logarítmicos anteriormente à análise estatística.

	Controle (n=22)	Alterado (n=22)	p
Comet Distributed Moment (u.a.)			
Média; DP	26,2; 2,72	63,9; 9,49	<0,0001*
IC 95%	24,9 – 27,4	59,7 – 68,1	
DAB classe III (%)			
Média; DP	14,3; 5,94	14,6; 7,64	0,887
IC 95%	11,6 – 16,9	11,2 – 18,0	
Acrossomas íntegros (%)			
Média; DP	73,8; 6,88	77,7; 9,51	0,133
IC 95%	70,8 – 76,9	73,4 – 81,9	
TBARS (ng/mL)			
Média; DP	22,9; 6,32	23,3; 5,19	0,804
IC 95%	20,1 – 25,7	21,0 – 25,6	
Idade (anos)			
Média; DP	35,5; 6,60	36,3; 5,87	0,607
IC 95%	32,5 – 38,4	33,7 – 38,9	
Volume (mL)			
Média; DP	4,0; 1,14	3,9; 1,51	0,814
IC 95%	3,5 – 4,5	3,2 – 4,5	
Concentração (x10⁶/mL)			
Média; DP	117,9; 71,19	115,1; 125,14	0,418
IC 95%	86,3 – 149,4	59,6 – 170,6	
Motilidade progressiva (%)			
Média; DP	50,6; 8,61	49,9; 8,97	0,798
IC 95%	46,8 – 54,4	45,9 – 53,9	

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 9.

Motilidade total (%)			
Média; DP	55,6; 9,20	54,5; 9,05	0,682
IC 95%	51,5 – 59,7	50,4 – 58,5	
Imotilidade (%)			
Média; DP	44,4; 9,20	45,5; 9,05	0,682
IC 95%	40,3 – 48,5	41,5 – 49,6	
Morfologia (% normais)			
Média; DP	8,5; 2,67	7,1; 3,03	0,049*
IC 95%	7,3 – 9,7	5,8 – 8,5	
Células redondas (x10⁶/mL)			
Média; DP	1,6; 2,00	2,7; 2,72	0,129
IC 95%	0,8 – 2,5	1,5 – 3,9	
Neutrófilos (x10⁶/mL)			
Média; DP	0,1; 0,19	0,1; 0,25	0,975
IC 95%	0,01 – 0,2	0,01 – 0,2	

DAB: 3,3'-Diaminobenzidina

DAB classe III: menos de 50% da peça intermediária do espermatozoide corada

TBARS: Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

DP: Desvio Padrão

IC 95%: Intervalo de Confiança de 95% da média

No total, foram observadas quatrocentas e sessenta e sete proteínas no estudo 3, das quais três foram quantificadas em menos de três replicatas em cada grupo e, por isso, foram excluídas. As quatrocentas e sessenta e quatro proteínas restantes foram quantificadas nos dois grupos e submetidas à análise estatística univariada (Figura 9). Dessas, quatro proteínas foram exclusivas e cento e quatro foram hiperexpressas no grupo controle (Tabela 10), enquanto três proteínas foram exclusivas e vinte e três foram hiperexpressas no grupo alterado (Tabela 11). Trezentas e trinta proteínas apresentaram-se conservadas entre os grupos (Anexo V). As principais funções enriquecidas em cada grupo estão representadas na Figura 10.

Figura 9. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides, verde) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, vermelho) do estudo 3. A intersecção dos grupos representa as proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual, amarelo) entre os grupos.

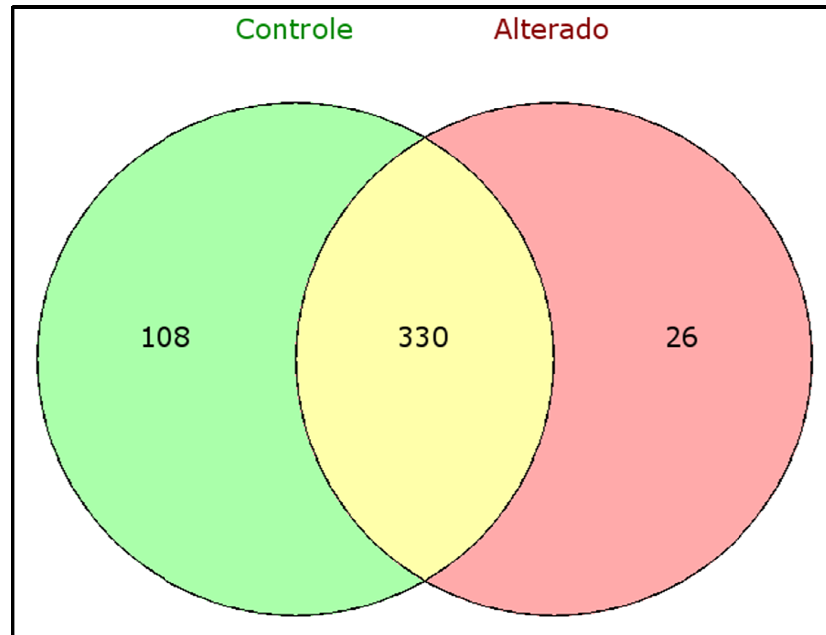


Tabela 10. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	-	Exclusiva
O60513	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 4</i>	-	Exclusiva
P28066	<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	-	Exclusiva
P49788	<i>Retinoic acid receptor responder protein 1</i>	-	Exclusiva
P16870	<i>Carboxypeptidase E</i>	<0,001	0,334
P25311	<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	<0,001	0,394
Q9UHI8	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>	<0,001	0,435
P30046	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	0,008	0,440
P02751	<i>Fibronectin</i>	0,011	0,461
P49221	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4</i>	0,001	0,483
Q9HAT2	<i>Sialate O-acetyltransferase</i>	<0,001	0,504
O75874	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	0,003	0,510
Q99985	<i>Semaphorin-3C</i>	0,025	0,511
P04279	<i>Semenogelin-1</i>	0,014	0,527
P04075	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	<0,001	0,534
Q99538	<i>Legumain</i>	0,025	0,536
P98095	<i>Fibulin-2</i>	0,002	0,543

Continua...

...continuação da tabela 10.

P12277	<i>Creatine kinase B-type</i>	0,004	0,546
P04083	<i>Annexin A1</i>	0,004	0,550
P08473	<i>Nepriylsin</i>	0,045	0,552
Q14118	<i>Dystroglycan</i>	0,010	0,558
P08758	<i>Annexin A5</i>	0,001	0,561
P07108	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	0,003	0,572
P34096	<i>Ribonuclease 4</i>	0,002	0,573
P35052	<i>Glypican-1</i>	0,030	0,573
P08118	<i>Beta-microseminoprotein</i>	0,001	0,600
Q02383	<i>Semenogelin-2</i>	0,007	0,601
P12429	<i>Annexin A3</i>	<0,001	0,602
P32119	<i>Peroxiredoxin-2</i>	0,005	0,603
P00338	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	0,004	0,604
P53801	<i>Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein</i>	0,004	0,605
P12821	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>	<0,001	0,621
Q8N6Q3	<i>CD177 antigen</i>	<0,001	0,630
Q7L266	<i>Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase</i>	0,022	0,631
P15311	<i>Ezrin</i>	0,001	0,631
P20151	<i>Kallikrein-2</i>	0,006	0,634
P62987	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	0,033	0,634
P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	0,012	0,635
P21399	<i>Cytoplasmic aconitate hydratase</i>	0,001	0,636
P06744	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	0,027	0,636
Q6W4X9	<i>Mucin-6</i>	<0,001	0,637
P01019	<i>Angiotensinogen</i>	0,011	0,645
Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	0,001	0,648
P51149	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>	0,002	0,649
P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	<0,001	0,652
P01033	<i>Metalloproteinase inhibitor 1</i>	0,005	0,652
P15309	<i>Prostatic acid phosphatase</i>	0,014	0,654
Q92485	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b</i>	0,002	0,660
Q9Y624	<i>Junctional adhesion molecule A</i>	0,035	0,662
Q02487	<i>Desmocollin-2</i>	0,031	0,664
Q9H0E2	<i>Toll-interacting protein</i>	0,027	0,665
Q13228	<i>Selenium-binding protein 1</i>	0,003	0,667
P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	<0,001	0,668
O15230	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	0,017	0,671
Q08629	<i>Testican-1</i>	0,011	0,671
Q14393	<i>Growth arrest-specific protein 6</i>	0,031	0,671
Q8IZP9	<i>G-protein coupled receptor 64</i>	0,030	0,672
Q5VTE0	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>	0,020	0,676
O15484	<i>Calpain-5</i>	0,003	0,683
P15289	<i>Arylsulfatase A</i>	<0,001	0,689
P11279	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</i>	0,003	0,691
O43581	<i>Synaptotagmin-7</i>	0,022	0,692

Continua...

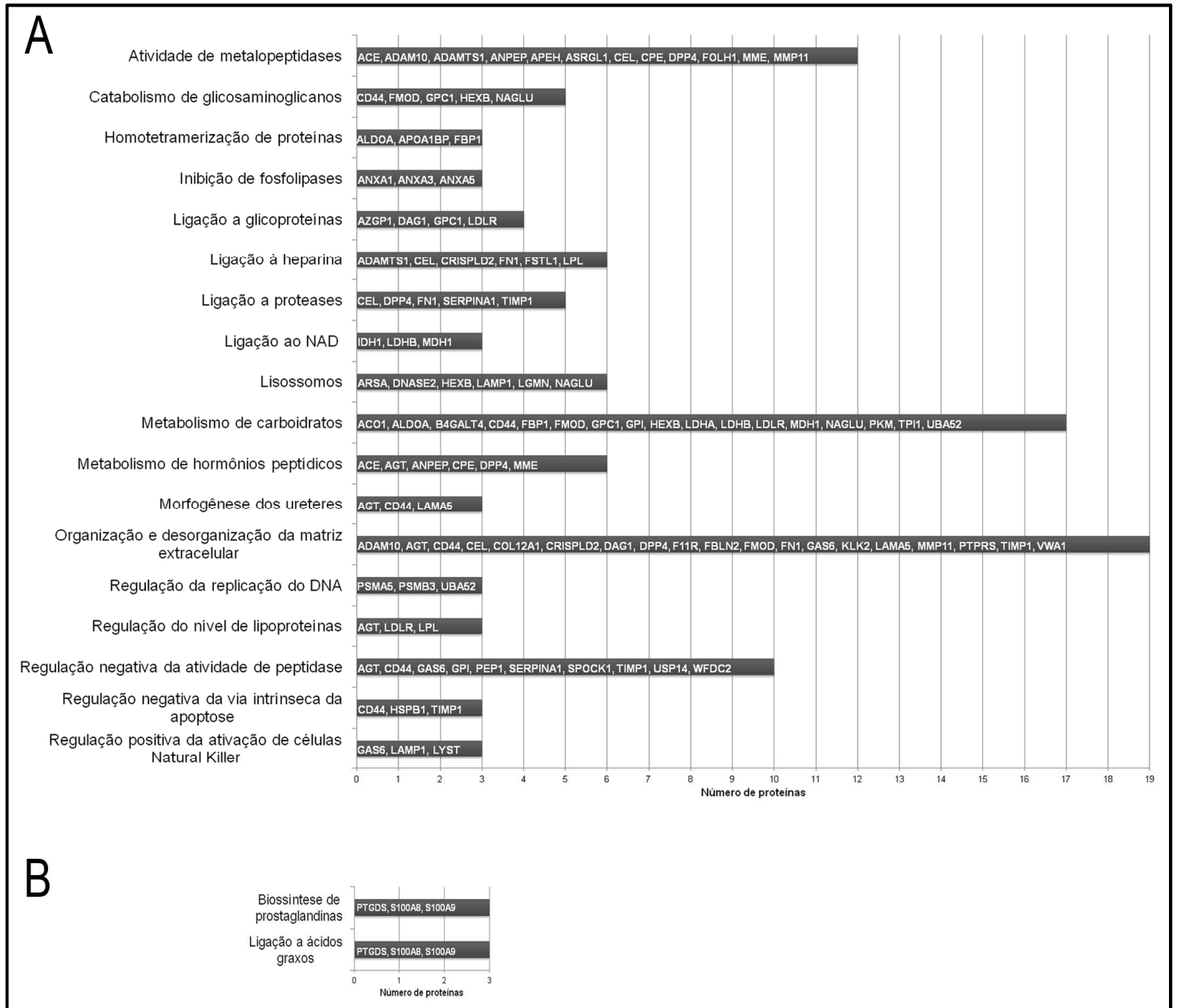
...continuação e conclusão da tabela 10.

Q9H0B8	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2</i>	0,004	0,694
Q9H336	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1</i>	0,001	0,697
P30086	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	0,022	0,700
Q99698	<i>Lysosomal-trafficking regulator</i>	0,001	0,701
P54802	<i>Alpha-N-acetylglucosaminidase</i>	0,015	0,703
P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	0,035	0,703
O43653	<i>Prostate stem cell antigen</i>	0,031	0,705
P19835	<i>Bile salt-activated lipase</i>	0,007	0,705
Q6PCB0	<i>von Willebrand factor A domain-containing protein 1</i>	0,040	0,706
Q12841	<i>Follistatin-related protein 1</i>	0,011	0,711
P54107	<i>Cysteine-rich secretory protein 1</i>	0,013	0,712
Q99715	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>	0,012	0,714
Q9GZX9	<i>Twisted gastrulation protein homolog 1</i>	0,045	0,715
P40925	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	0,028	0,717
Q9H0W9	<i>Ester hydrolase C11orf54</i>	0,016	0,719
Q04609	<i>Glutamate carboxypeptidase 2</i>	0,048	0,719
P13639	<i>Elongation factor 2</i>	0,046	0,721
P43251	<i>Biotinidase</i>	0,002	0,722
P06858	<i>Lipoprotein lipase</i>	0,003	0,723
Q06828	<i>Fibromodulin</i>	0,018	0,726
P49720	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	0,004	0,728
P15144	<i>Aminopeptidase N</i>	0,007	0,731
P24347	<i>Stromelysin-3</i>	0,010	0,734
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	0,002	0,734
P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>	0,029	0,737
P27487	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	0,033	0,737
O14672	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	0,001	0,738
P09467	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	0,013	0,740
P63000	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	0,004	0,742
P07686	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	0,026	0,742
Q8WUM4	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>	0,037	0,743
Q13421	<i>Mesothelin</i>	0,005	0,748
P01130	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>	0,006	0,748
Q14508	<i>WAP four-disulfide core domain protein 2</i>	0,004	0,750
P54578	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>	0,001	0,752
Q13332	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S</i>	0,042	0,753
P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	0,002	0,771
Q53GD3	<i>Choline transporter-like protein 4</i>	0,022	0,778
Q8N1N0	<i>C-type lectin domain family 4 member F</i>	0,025	0,780
Q6NT32	<i>Carboxylesterase 5A</i>	0,020	0,784
P16070	<i>CD44 antigen</i>	0,019	0,787
Q8NCW5	<i>NAD(P)H-hydrate epimerase</i>	0,043	0,794
P09466	<i>Glycodelin</i>	0,048	0,798
P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>	0,040	0,804
P13798	<i>Acylamino-acid-releasing enzyme</i>	0,020	0,808
O94760	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>	0,025	0,827

Tabela 11. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
P05109	<i>Protein S100-A8</i>	-	Exclusiva
Q6IWH7	<i>Anoctamin-7</i>	-	Exclusiva
Q9BS86	<i>Zona pellucida-binding protein 1</i>	-	Exclusiva
P24855	<i>Deoxyribonuclease-1</i>	0,003	1,214
Q9H2U9	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7</i>	0,001	1,249
Q9Y5X9	<i>Endothelial lipase</i>	0,015	1,259
P09972	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	0,012	1,259
P06702	<i>Protein S100-A9</i>	0,005	1,260
Q8WZ42	<i>Titin</i>	0,037	1,271
P49327	<i>Fatty acid synthase</i>	0,033	1,306
P40189	<i>Interleukin-6 receptor subunit beta</i>	0,013	1,322
P08253	<i>72 kDa type IV collagenase</i>	<0,001	1,342
Q6UX06	<i>Olfactomedin-4</i>	0,001	1,358
Q93099	<i>Homogentisate 1,2-dioxygenase</i>	0,036	1,372
P20142	<i>Gastricsin</i>	0,048	1,396
P41222	<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase</i>	0,029	1,427
P07288	<i>Prostate-specific antigen</i>	0,019	1,440
P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	<0,001	1,495
P11047	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	0,004	1,658
P01859	<i>Ig gamma-2 chain C region</i>	0,036	1,723
Q99523	<i>Sortilin</i>	0,027	1,762
Q9Y3R5	<i>Protein dopey-2</i>	0,034	1,856
P07355	<i>Annexin A2</i>	0,024	1,894
P12109	<i>Collagen alpha-1(VI) chain</i>	0,010	2,023
Q92896	<i>Golgi apparatus protein 1</i>	0,012	2,104
O95716	<i>Ras-related protein Rab-3D</i>	0,034	2,150

Figura 10. Funções enriquecidas no plasma seminal dos grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides, A) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, B) do estudo 3.



Na análise multivariada por PLS-DA, 26% da variância dos dados do estudo 3 foi explicada pelos três primeiros componentes formados. Utilizando-se esses componentes, uma separação completa entre os grupos foi atingida (Figura 11). Além disso, trinta e quatro proteínas com escore VIP acima de dois foram selecionadas e utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante (Tabela 12). Dessas, uma proteína (*cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1* – UniProt AC Q9H336) foi incluída no modelo final de regressão logística como sendo a mais importante para diferenciar o grupo alterado do grupo controle ($p < 0,001$). O modelo apresentou valores preditivos positivo, negativo e total de 83,3% e uma área abaixo da curva ROC de 88,2% (Figura 12). A análise discriminante revelou que as proteínas *apolipoprotein L domain-containing protein 1* (UniProt AC Q96LR9), *cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1* (UniProt AC Q9H336), *cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2* (UniProt AC Q9H0B8), *retinoic acid receptor responder protein 1* (UniProt AC P49788) e *sperm-associated antigen 11B* (UniProt AC Q08648) foram capazes de prever o grupo controle. Por sua vez, as proteínas *alpha-2-antiplasmin* (UniProt AC P08697), *EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3* (UniProt AC O43854) e *proteasome subunit alpha type-5* (UniProt AC P28066) foram capazes de prever o grupo alterado.

Figura 11. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 3 (análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O PLS-DA foi realizado utilizando os valores logarítmicos da quantificação das proteínas em cada replicata (triângulos).

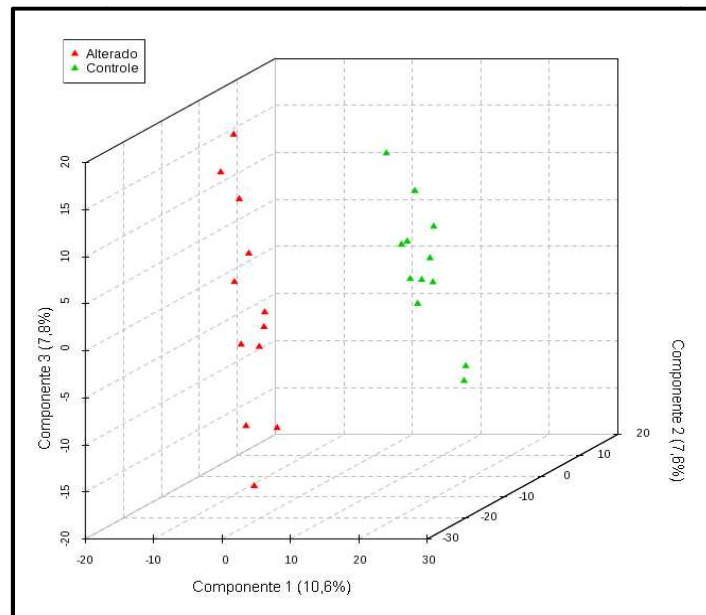


Tabela 12. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 3 (análise proteômica em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides).

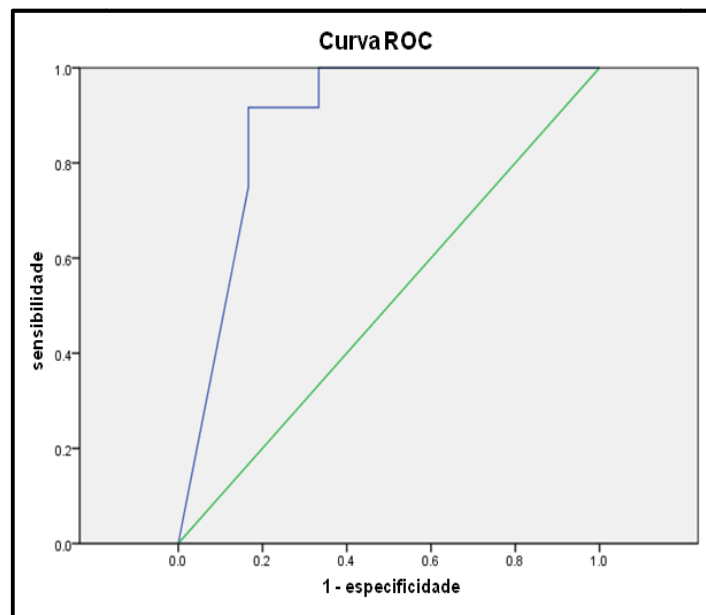
UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
O60513	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 4</i>	-	Controle
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	-	Controle
P28066	<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	-	Controle
P49788	<i>Retinoic acid receptor responder protein 1</i>	-	Controle
Q6IWH7	<i>Anoctamin-7</i>	-	Alterado
P05109	<i>Protein S100-A8</i>	-	Alterado
Q9BS86	<i>Zona pellucida-binding protein 1</i>	-	Alterado
Q96JG6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 132</i>	0,387	0,148
P21246	<i>Pleiotrophin</i>	0,232	0,407
P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>	0,086	0,510
Q13162	<i>Peroxiredoxin-4</i>	0,118	0,533
Q92484	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a</i>	0,053	0,538
Q8WU90	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 15</i>	0,290	0,648
O43854	<i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>	0,523	0,658
Q9H0B8	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2</i>	0,004	0,694

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 12.

Q9H336	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1</i>	0,001	0,697
Q08648	<i>Sperm-associated antigen 11B</i>	0,119	0,742
P63000	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>	0,004	0,742
P13716	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	0,206	0,794
Q9NQX5	<i>Neural proliferation differentiation and control protein 1</i>	0,294	0,804
Q86X29	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>	0,183	0,838
Q96RS0	<i>Trimethylguanosine synthase</i>	0,682	0,895
P61158	<i>Actin-related protein 3</i>	0,553	0,910
Q15828	<i>Cystatin-M</i>	0,897	0,978
P24593	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i>	0,974	1,007
Q96LR9	<i>Apolipoprotein L domain-containing protein 1</i>	0,913	1,040
Q5T5C0	<i>Syntaxin-binding protein 5</i>	0,846	1,054
P17931	<i>Galectin-3</i>	0,586	1,184
P08697	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	0,109	1,192
Q1ED39	<i>Lysine-rich nucleolar protein 1</i>	0,757	1,268
Q8N335	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein</i>	0,209	1,397
Q8N3S3	<i>Putative homeodomain transcription factor 2</i>	0,158	1,417
Q09328	<i>Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A</i>	0,088	1,529
P49815	<i>Tuberin</i>	0,086	1,675

Figura 12. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) representativa do modelo de regressão logística do estudo 3 (análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides).



$$f(x) = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

$$z = -1,9 + 4614,1 * \mathbf{Q9H336}$$

3.4 Estudo 4 – Análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica

Para a separação dos grupos experimentais do estudo 4, foram utilizados os valores da concentração de TBARS (ng/mL) no plasma seminal. Os grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica, n = 23) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica, n = 23) apresentaram média; desvio padrão de 14,9 ng/mL; 1,60 ng/mL e 32,0 ng/mL; 2,68 ng/mL, respectivamente ($p < 0,0001$). O valor de corte para o grupo controle foi de 17,39 ng/mL (percentil 15% inferior) e para o grupo alterado, de 29,34 ng/mL (percentil 15% superior). A comparação entre os dados clínicos (idade, variáveis seminais e análises funcionais dos espermatozoides) de cada grupo está representada na Tabela 13. A motilidade progressiva e a motilidade total foram estatisticamente maiores no grupo controle, enquanto a imotilidade foi estatisticamente maior no grupo alterado.

Tabela 13. Análise seminal dos grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4. Os grupos foram comparados por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$). Variáveis que não obedeceram à normalidade foram padronizadas por seus valores logarítmicos anteriormente à análise estatística.

	Controle (n=23)	Alterado (n=23)	p
TBARS (ng/mL)			
Média; DP	14,9; 1,60	32,0; 2,68	<0,0001*
IC 95%	14,2 – 15,6	30,8 – 33,2	
DAB classe III (%)			
Média; DP	14,4; 6,99	11,5; 4,72	0,102
IC 95%	11,4 – 17,4	9,4 – 13,5	
Acrossomas íntegros (%)			
Média; DP	76,2; 5,74	74,1; 7,39	0,286
IC 95%	73,8 – 78,7	70,9 – 77,3	
Comet Distributed Moment (u.a.)			
Média; DP	42,5; 27,28	44,0; 22,44	0,665
IC 95%	30,7 – 54,3	34,3 – 53,7	
Idade (anos)			
Média; DP	35,1; 5,41	36,3; 6,55	0,511
IC 95%	32,8 – 37,5	33,5 – 39,1	
Volume (mL)			
Média; DP	3,8; 1,51	3,4; 1,61	0,398
IC 95%	3,1 – 4,5	2,7 – 4,1	
Concentração ($\times 10^6$/mL)			
Média; DP	70,9; 54,19	100,0; 58,30	0,058
IC 95%	47,5 – 94,4	74,8 – 125,2	

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 13.

Motilidade progressiva (%)			
Média; DP	54,5; 7,82	48,0; 8,26	0,008*
IC 95%	51,5 – 57,9	44,4 – 51,5	
Motilidade total (%)			
Média; DP	59,7; 7,09	53,1; 8,98	0,008*
IC 95%	56,6 – 62,7	49,2 – 57,0	
Imotilidade (%)			
Média; DP	40,5; 7,24	46,9; 8,98	0,013*
IC 95%	37,3 – 43,6	43,0 – 50,8	
Morfologia (% normais)			
Média; DP	7,5; 2,97	7,3; 2,46	0,988
IC 95%	6,2 – 8,8	6,3 – 8,4	
Células redondas (x10⁶/mL)			
Média; DP	1,2; 0,97	1,8; 1,41	0,213
IC 95%	0,8 – 1,7	1,2 – 2,4	
Neutrófilos (x10⁶/mL)			
Média; DP	0,1; 0,21	0,1; 0,13	0,505
IC 95%	0,04 – 0,2	0,03 – 0,1	

DAB: 3,3'-Diaminobenzidina

DAB classe III: menos de 50% da peça intermediária do espermatozoide corada

TBARS: Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

DP: Desvio Padrão

IC 95%: Intervalo de Confiança de 95% da média

No total, foram observadas seiscentas e quarenta e nove proteínas no estudo 4, das quais vinte foram quantificadas em menos de três replicatas em cada grupo e, por isso, foram excluídas. As seiscentas e vinte e nove proteínas restantes foram quantificadas nos dois grupos e submetidas à análise estatística univariada (Figura 13). Dessas, quatro proteínas foram exclusivas e dezenove foram hiperexpressas no grupo controle (Tabela 14), enquanto oito proteínas foram exclusivas e sessenta e três foram hiperexpressas no grupo alterado (Tabela 15). Quinhentas e trinta e cinco proteínas apresentaram-se conservadas entre os grupos (Anexo VI).

Figura 13. Diagrama de Venn com as proteínas quantificadas nos grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica, verde) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica, vermelho) do estudo 4. A intersecção dos grupos representa as proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual, amarelo) entre os grupos.

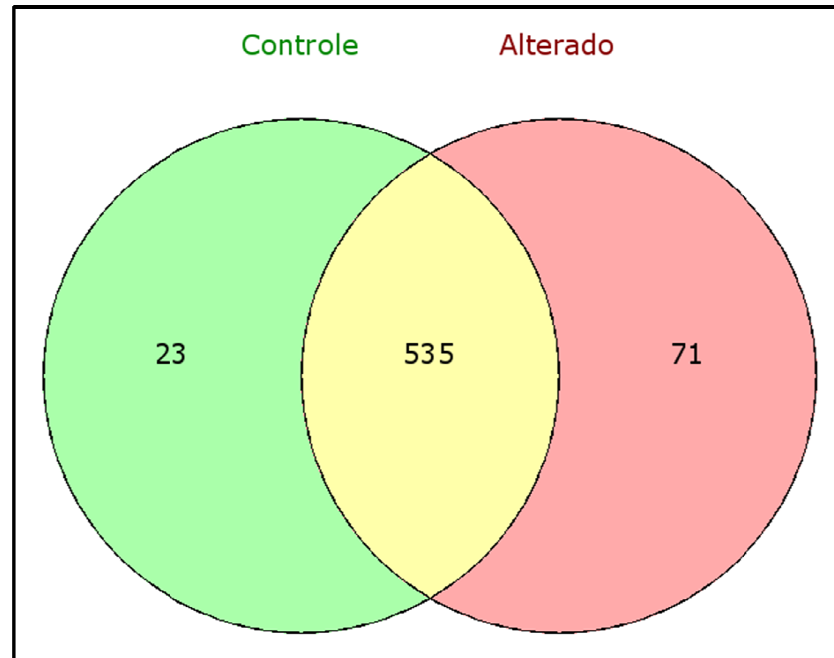


Tabela 14. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
P31943	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	-	Exclusiva
Q8N335	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein</i>	-	Exclusiva
Q9N2K0	<i>HERV-H_2q24.3 provirus ancestral Env polyprotein</i>	-	Exclusiva
Q9UJA9	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5</i>	-	Exclusiva
P51888	<i>Prolargin</i>	0,001	0,165
P26572	<i>Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i>	0,005	0,549
Q8N104	<i>Beta-defensin 106</i>	0,011	0,592
Q9UIK5	<i>Tomoregulin-2</i>	0,029	0,596
P06865	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	<0,001	0,643
P54289	<i>Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1</i>	0,038	0,690
Q6UXI9	<i>Nephronectin</i>	0,030	0,718
P24593	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i>	0,049	0,724
P21246	<i>Pleiotrophin</i>	0,020	0,733

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 14.

P06858	<i>Lipoprotein lipase</i>	0,020	0,742
Q9NZ08	<i>Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>	<0,001	0,743
Q9NQ79	<i>Cartilage acidic protein 1</i>	0,030	0,753
O60635	<i>Tetraspanin-1</i>	0,026	0,768
Q66K79	<i>Carboxypeptidase Z</i>	0,003	0,770
Q08629	<i>Testican-1</i>	0,033	0,773
P09668	<i>Pro-cathepsin H</i>	0,041	0,796
P28907	<i>ADP-ribosyl cyclase 1</i>	0,013	0,820
P12273	<i>Prolactin-inducible protein</i>	0,024	0,829
Q9H173	<i>Nucleotide exchange factor SIL1</i>	0,010	0,831

Tabela 15. Proteínas exclusivas ou hiperexpressas no grupo alterado (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4, identificadas por meio do teste t de *Student* para amostras não pareadas ($p < 0,05$).

UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
P01596	<i>Ig kappa chain V-I region CAR</i>	-	Exclusiva
P01743	<i>Ig heavy chain V-I region HG3</i>	-	Exclusiva
P09960	<i>Leukotriene A-4 hydrolase</i>	-	Exclusiva
P30153	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kD regulatory subunit A alpha isoform</i>	-	Exclusiva
P54578	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>	-	Exclusiva
Q03013	<i>Glutathione S-transferase Mu 4</i>	-	Exclusiva
Q96TA1	<i>Niban-like protein 1</i>	-	Exclusiva
Q9UBC9	<i>Small proline-rich protein 3</i>	-	Exclusiva
Q12841	<i>Follistatin-related protein 1</i>	0,019	1,210
P62328	<i>Thymosin beta-4</i>	0,025	1,253
P54107	<i>Cysteine-rich secretory protein 1</i>	0,048	1,259
P18827	<i>Syndecan-1</i>	0,029	1,260
Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	0,014	1,263
P13639	<i>Elongation factor 2</i>	0,048	1,266
Q99519	<i>Sialidase-1</i>	0,041	1,266
P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	0,011	1,271
P07858	<i>Cathepsin B</i>	<0,001	1,290
O60888	<i>Protein CutA</i>	0,041	1,293
Q8NBJ4	<i>Golgi membrane protein 1</i>	0,036	1,311
P00918	<i>Carbonic anhydrase 2</i>	0,038	1,312
P13489	<i>Ribonuclease inhibitor</i>	0,028	1,314
P02647	<i>Apolipoprotein A-I</i>	0,022	1,316
P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	0,025	1,321
P01857	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>	0,014	1,324
P01765	<i>Ig heavy chain V-III region TIL</i>	0,034	1,352
P07998	<i>Ribonuclease pancreatic</i>	0,020	1,359
P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	0,001	1,372

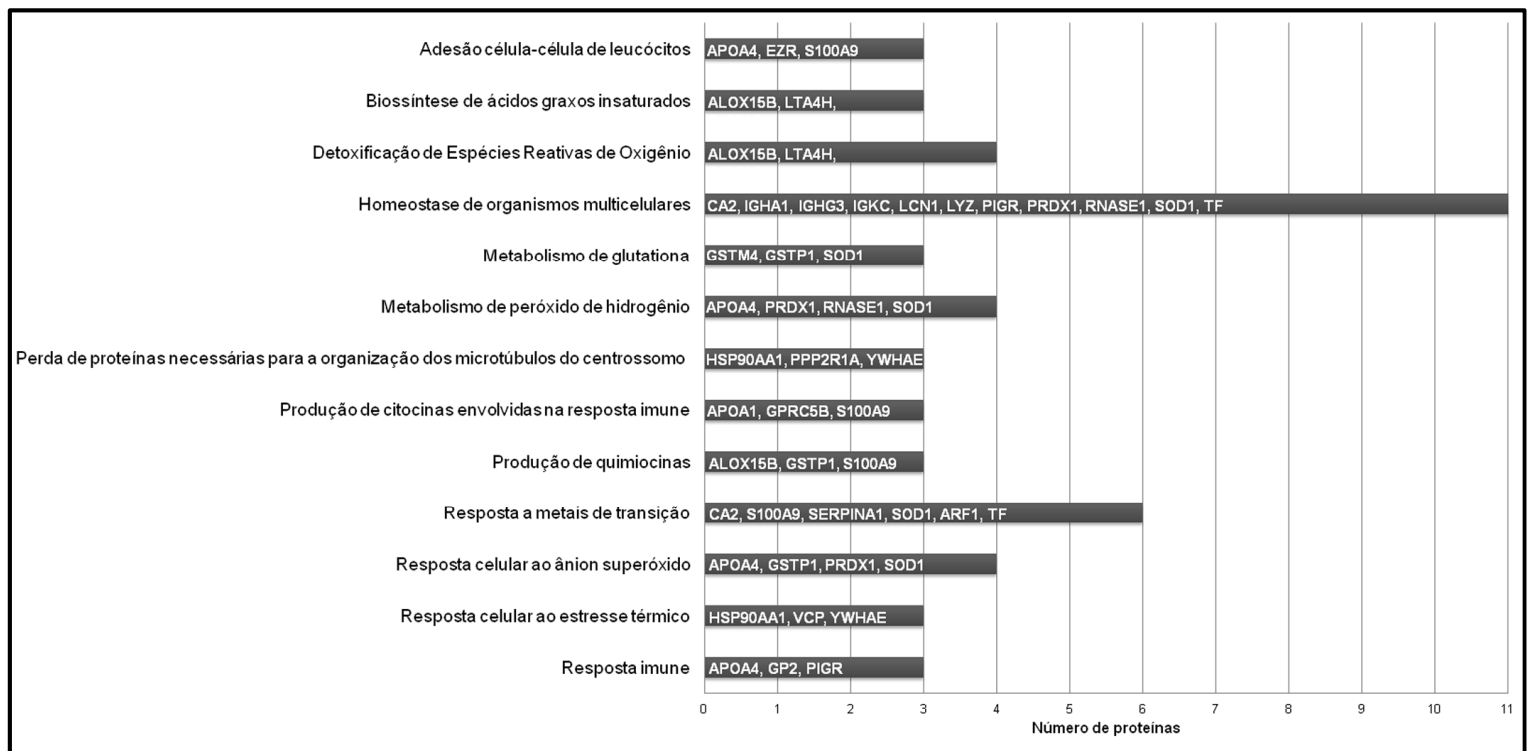
Continua...

...continuação e conclusão da tabela 15.

Q8IZP9	<i>G-protein coupled receptor 64</i>	0,019	1,377
Q9UHI8	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>	0,037	1,387
P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	0,018	1,393
P00441	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	0,031	1,395
P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	0,023	1,396
P60660	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	0,005	1,405
P50991	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	0,048	1,406
P15311	<i>Ezrin</i>	0,006	1,413
P01859	<i>Ig gamma-2 chain C region</i>	0,001	1,419
P21217	<i>Galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase</i>	0,022	1,428
Q07654	<i>Trefoil factor 3</i>	0,035	1,462
P0CG06	<i>Ig lambda-3 chain C regions</i>	0,003	1,464
Q9H1M3	<i>Beta-defensin 129</i>	0,005	1,479
P01833	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	0,037	1,494
O15296	<i>Arachidonate 15-lipoxygenase B</i>	0,018	1,494
Q9NZH0	<i>G-protein coupled receptor family C group 5 member B</i>	0,029	1,502
P06727	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	0,005	1,527
P15121	<i>Aldose reductase</i>	0,001	1,531
P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	0,001	1,532
Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>	0,008	1,552
Q96BQ1	<i>Protein FAM3D</i>	0,014	1,568
P01834	<i>Ig kappa chain C region</i>	<0,001	1,571
P0CG04	<i>Ig lambda-1 chain C regions</i>	0,037	1,578
P01876	<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	0,007	1,580
P02787	<i>Serotransferrin</i>	0,010	1,589
P01623	<i>Ig kappa chain V-III region WOL</i>	0,047	1,592
P06702	<i>Protein S100-A9</i>	0,007	1,596
P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>	0,031	1,642
Q96BH3	<i>Epididymal sperm-binding protein 1</i>	0,024	1,682
P01764	<i>Ig heavy chain V-III region VH26</i>	0,019	1,715
P01766	<i>Ig heavy chain V-III region BRO</i>	0,024	1,731
P61626	<i>Lysozyme C</i>	0,041	1,735
P55259	<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2</i>	0,017	1,736
O43692	<i>Peptidase inhibitor 15</i>	0,009	1,760
Q13228	<i>Selenium-binding protein 1</i>	0,020	1,784
P14550	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>	0,001	1,839
P84077	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>	0,007	1,878
O95994	<i>Anterior gradient protein 2 homolog</i>	0,004	2,020
P01037	<i>Cystatin-SN</i>	0,042	2,052
P01617	<i>Ig kappa chain V-II region TEW</i>	0,016	2,060
P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	0,008	2,160
Q8N4F0	<i>BPI fold-containing family B member 2</i>	0,001	3,079
P31025	<i>Lipocalin-1</i>	0,003	3,144
Q9HC84	<i>Mucin-5B</i>	0,001	3,595

No estudo 4, foram encontradas funções enriquecidas no plasma seminal apenas do grupo alterado (Figura 14). Dessas, destacam-se biossíntese de ácidos graxos insaturados, detoxificação de EROs, homeostase, metabolismo de glutatona e de peróxido de hidrogênio, resposta celular ao ânion superóxido, perda de proteínas necessárias para a organização dos microtúbulos do centróssomo durante a interfase, produção de quimiocinas, resposta a metais de transição, resposta celular ao estresse térmico e resposta imune.

Figura 14. Funções enriquecidas no plasma seminal do grupo alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4.



Na análise multivariada por PLS-DA, 58,3% da variância dos dados do estudo 4 foi explicada pelos três primeiros componentes formados. Utilizando-se esses componentes, uma separação completa entre os grupos foi atingida (Figura 15). Além disso, trinta e sete proteínas com escore VIP acima de dois foram selecionadas e utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante (Tabela 16). Dessas, duas proteínas foram incluídas no modelo final de regressão logística como sendo as proteínas mais importantes para diferenciar o grupo alterado do grupo controle ($p < 0,001$). Essas proteínas foram identificadas como *heme oxygenase 2* (UniProt AC P30519) e *mucin-5B* (UniProt AC Q9HC84). O modelo apresentou valores preditivos positivo, negativo e total de 91,7% e uma área abaixo da curva ROC de 99,3% (Figura 16). A análise discriminante, por sua vez, revelou que a proteína *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase* (UniProt AC P09543) foi capaz de predizer o grupo controle e que as proteínas *arginine/serine-rich coiled-coil protein 2* (UniProt AC Q7L4I2), *mucin-5B* (UniProt AC Q9HC84), *multifunctional protein ADE2* (UniProt AC P22234), *procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2* (UniProt AC O00469) e *SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein* (UniProt AC O75368) foram capazes de predizer o grupo alterado.

Figura 15. Gráfico tridimensional demonstrando a separação dos grupos controle e alterado do estudo 4 (análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica) na análise discriminante supervisionada com método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O PLS-DA foi realizado utilizando os valores logarítmicos da quantificação das proteínas em cada replicata (triângulos).

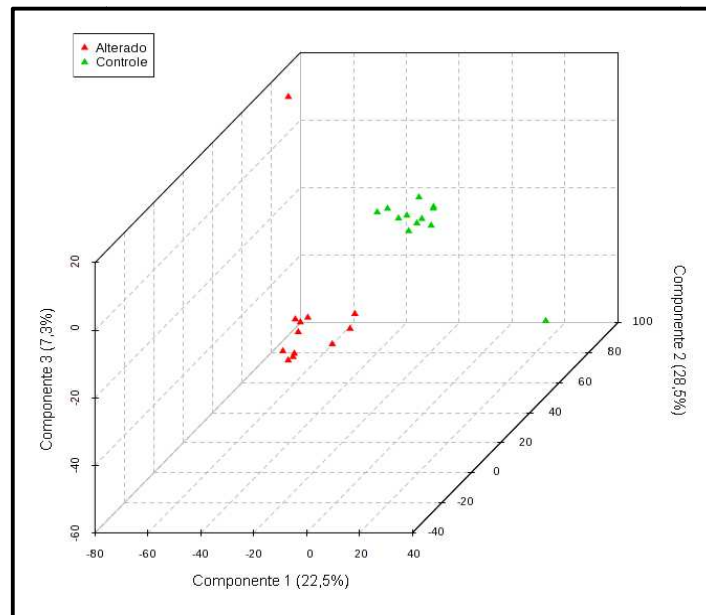


Tabela 16. Proteínas com escore VIP acima de dois na análise por PLS-DA, utilizadas para análise de regressão logística e análise discriminante do estudo 4 (análise proteômica em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica).

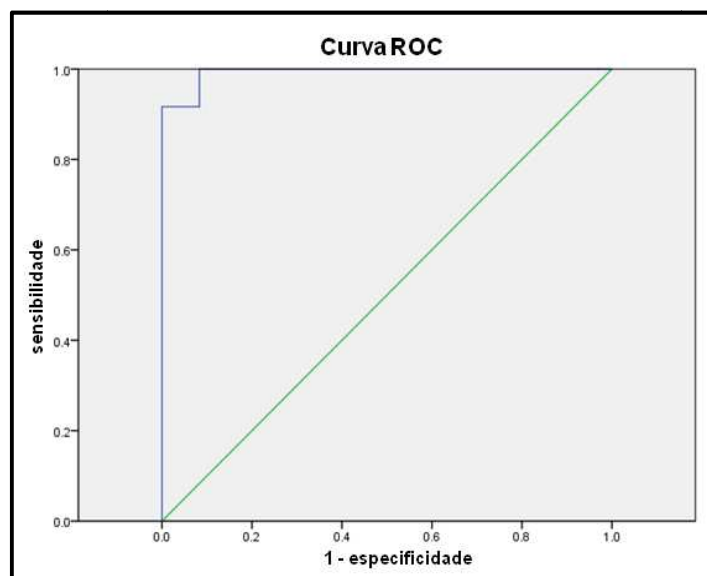
UniProt AC	Nome da Proteína	p	Fold-change
P31943	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	-	Controle
Q8N335	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein</i>	-	Controle
Q9N2K0	<i>HERV-H_2q24.3 provirus ancestral Env polyprotein</i>	-	Controle
Q9UJA9	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5</i>	-	Controle
P01596	<i>Ig kappa chain V-I region CAR</i>	-	Alterado
P01743	<i>Ig heavy chain V-I region HG3</i>	-	Alterado
P09960	<i>Leukotriene A-4 hydrolase</i>	-	Alterado
P30153	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kD regulatory subunit A alpha isoform</i>	-	Alterado
P54578	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>	-	Alterado
Q03013	<i>Glutathione S-transferase Mu 4</i>	-	Alterado
Q9UBC9	<i>Small proline-rich protein 3</i>	-	Alterado
P55058	<i>Phospholipid transfer protein</i>	0,066	0,039
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	0,222	0,436
K7EJ46	<i>Small integral membrane protein 22</i>	0,344	0,672
P30519	<i>Heme oxygenase 2</i>	0,432	0,783

Continua...

...continuação e conclusão da tabela 16.

P35625	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>	0,266	0,788
Q309B1	<i>Tripartite motif-containing protein 16-like protein</i>	0,162	0,880
P09543	<i>2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>	0,594	0,901
P47755	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-2</i>	0,511	0,920
P84243	<i>Histone H3.3</i>	0,749	0,923
Q9UK41	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog</i>	0,808	0,961
Q9NR50	<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma</i>	0,954	1,017
O00469	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	0,949	1,029
Q9Y5Z4	<i>Heme-binding protein 2</i>	0,916	1,035
O14578	<i>Citron Rho-interacting kinase</i>	0,772	1,057
O43854	<i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>	0,741	1,077
P05060	<i>Secretogranin-1</i>	0,273	1,374
P22234	<i>Multifunctional protein ADE2</i>	0,307	1,418
P01008	<i>Antithrombin-III</i>	0,065	1,585
Q7L4I2	<i>Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2</i>	0,221	1,733
O75368	<i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</i>	0,152	1,773
P59666	<i>Neutrophil defensin 3</i>	0,113	1,949
Q8N257	<i>Histone H2B type 3-B</i>	0,351	2,659
Q8N4F0	<i>BPI fold-containing family B member 2</i>	0,001	3,079
P31025	<i>Lipocalin-1</i>	0,003	3,144
Q9HC84	<i>Mucin-5B</i>	0,001	3,595
P09228	<i>Cystatin-SA</i>	0,330	4,063

Figura 16. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) representativa do modelo de regressão logística do estudo 4 (análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica).



$$f(x) = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

$$z = -91,8 - 5711,2 * \mathbf{P30519} + 80.873,0 * \mathbf{Q9HC84}$$

3.5 Biomarcadores sugeridos para cada estudo

No Quadro 1, encontram-se os biomarcadores proteicos sugeridos para cada estudo, selecionados de acordo com os resultados das análises de regressão logística e análises discriminantes, realizadas separadamente para cada estudo.

Quadro 1. Biomarcadores proteicos sugeridos para cada estudo, selecionados de acordo com a análise de regressão logística e a análise discriminante, realizadas separadamente para cada estudo.

	Controle		Alterado	
	UniProt AC	Nome da Proteína	UniProt AC	Nome da Proteína
<u>Estudo 1</u> Atividade mitocondrial dos espermatozoides			Q8NEB7 P20073 P06865 Q8TDL5 P09228 P08962 Q9BS26 P21266	<i>acrosin-binding protein</i> <i>annexin A7</i> <i>beta-hexosaminidase subunit alpha</i> <i>BPI fold-containing family B member 1</i> <i>cystatin SA</i> <i>CD63 antigen</i> <i>endoplasmic reticulum resident protein 44</i> <i>glutathione S-transferase Mu 3</i>
<u>Estudo 2</u> Integridade do acrossoma dos espermatozoides			Q99715 Q6UWW0 P55058 P60903 Q8N114 Q9UL36	<i>collagen alpha-1(XII) chain</i> <i>lipocalin-15</i> <i>phospholipid transfer protein</i> <i>protein S100-A10</i> <i>protein shisa-5</i> <i>zinc finger protein 236</i>
<u>Estudo 3</u> Fragmentação do DNA dos espermatozoides	Q96LR9 Q9H336 Q9H0B8 P49788 Q08648	<i>apolipoprotein L domain-containing protein 1</i> <i>cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1</i> <i>cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2</i> <i>retinoic acid receptor responder protein 1</i> <i>sperm-associated antigen 11B</i>	P08697 O43854 P28066	<i>alpha-2-antiplasmin</i> <i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i> <i>proteasome subunit alpha type-5</i>
<u>Estudo 4</u> Nível seminal de peroxidação lipídica	P09543	<i>2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>	Q7L412 P30519 Q9HC84 P22234 O00469 O75368	<i>arginine/serine-rich coiled-coil protein 2</i> <i>heme oxygenase 2</i> <i>mucin-5B</i> <i>multifunctional protein ADE2</i> <i>procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i> <i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</i>

4 DISCUSSÃO

As alterações funcionais dos espermatozoides e o estresse oxidativo seminal são reconhecidos como os principais mecanismos envolvidos com a infertilidade masculina (12–14,28). Entretanto, os métodos existentes para sua avaliação ainda são pouco utilizados na prática clínica e o seu verdadeiro valor diagnóstico ainda não foi determinado (3,8). Assim, são necessárias novas técnicas para facilitar o diagnóstico e tratamento de fatores masculinos de infertilidade de forma mais sensível e precisa (69). Nesse sentido, o estudo proteômico do plasma seminal pode fornecer um método não invasivo de identificação de defeitos no espermatozoide, uma vez que esse meio é essencial para a sua função (42) e que a alteração da expressão de diversas proteínas testiculares e epididimárias no plasma seminal já foi associada à infertilidade masculina (40,41,48–51). Dessa forma, a hipótese deste estudo foi que o perfil de proteínas do plasma seminal pode refletir alterações funcionais do espermatozoide e o nível seminal de peroxidação lipídica, o qual está diretamente relacionado ao estresse oxidativo.

Para testar essa hipótese, quatro estudos foram realizados separadamente: (i) estudo 1 - avaliação proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides, (ii) estudo 2 - avaliação proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides, (iii) estudo 3 - avaliação proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides e (iv) estudo 4 - avaliação proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica. Em cada estudo foi possível identificar as proteínas e função biológicas associadas à alteração estudada, permitindo um entendimento mais completo dos mecanismos proteômicos envolvidos com as alterações funcionais dos espermatozoides e o estresse oxidativo seminal. Além disso, por meio de análise estatística multivariada, foi possível identificar as proteínas com maior potencial como biomarcadores de cada estudo. Após futura validação, essas proteínas poderão ser utilizadas para exclusão dos espermatozoides alterados durante a realização de técnicas de reprodução assistida. É importante ressaltar que o objetivo deste estudo não foi explicar as causas de danos funcionais do espermatozoide e do estresse oxidativo seminal, mas identificar alterações biológicas envolvidas com cada alteração.

4.1 Estudo 1 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides

A atividade mitocondrial já foi amplamente relacionada à fertilidade masculina. A respiração mitocondrial parece estar envolvida com a função normal do espermatozoide (70) e com a espermatogênese (71). A qualidade funcional das mitocôndrias está associada também à qualidade seminal e à capacidade de fertilização, podendo ser um bom candidato para diferenciar subpopulações de espermatozoides funcionais (72,73). Além disso, demonstrou-se em animais que as proteínas mitocondriais estão envolvidas com a capacitação, a maturação e a hiperativação do espermatozoide (74,75). Sugere-se também que o nível da expressão das proteínas mitocondriais citocromo c oxidase e DNA polimerase gama é variável entre subpopulações de espermatozoides, refletindo-se em sua qualidade (76).

Por outro lado, disfunções mitocondriais foram encontradas em diversas causas de infertilidade masculina (15,19–21,70,71,77). Defeitos estruturais na peça intermediária do espermatozoide estão associados à redução da respiração mitocondrial e da motilidade celulares (9). A motilidade é essencial para a capacidade de fertilização do espermatozoide e parece depender da energia fornecida tanto pela glicólise anaeróbica quanto pela fosforilação oxidativa, a qual ocorre na membrana mitocondrial interna (78). Apesar da contribuição desses processos para a motilidade ainda não estar esclarecida, sugere-se que os espermatozoides sejam altamente dependentes do metabolismo oxidativo para sua fisiologia e função normais (9,70,77).

Diversos estudos já demonstraram que as proteínas do plasma seminal são capazes de regular a função das mitocôndrias dos espermatozoides. Precusores das proteínas alfa-1 antitripsina e zinco-alfa2-glicoproteína e fragmentos formados por proteólise da semenogelina I podem se ligar ao espermatozoide e, assim, regular a sua motilidade (79,80). Além disso, concentrações elevadas de fibronectina no plasma seminal parecem reduzir a motilidade do espermatozoide (81). Barbonetti e colaboradores sugeriram que moléculas presentes no plasma seminal, principalmente fatores pró-inflamatórios, podem promover a alteração no potencial da membrana mitocondrial e ativar vias apoptóticas, levando à redução da motilidade dos espermatozoides em homens com lesão medular (47). Interessantemente, essa alteração foi encontrada inclusive em pacientes sem

alterações na motilidade (47). Em ovinos, foi demonstrado que proteínas seminais de baixo peso molecular são capazes de preservar a integridade funcional das mitocôndrias (82).

No presente estudo, cento e quatro proteínas foram diferencialmente expressas no plasma seminal entre os grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides, n=26) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides, n=23). Dessas, quarenta foram hiperexpressas ou exclusivamente expressas no grupo controle e sessenta e quatro, no grupo alterado (Tabelas 2 e 3).

As funções enriquecidas no plasma seminal do grupo controle foram detoxificação de EROs e ligação a NADP (Figura 2). A detoxificação celular de EROs é importante para a proteção do espermatozoide contra o estresse oxidativo (83,84). Fisiologicamente, EROs são produzidas como resultado da atividade metabólica celular (85). Essas são importantes para o controle da sinalização celular mediada pela fosforilação de resíduos de tirosina, envolvida em funções essenciais do espermatozoide, como capacitação e reação acrossômica (86). Por outro lado, um excesso de EROs pode ser produzido por espermatozoides imaturos, danificados ou mortos e por leucócitos presentes no sêmen (85). As EROs, se não neutralizadas por antioxidantes endógenos, podem levar a alterações funcionais importantes no espermatozoide (85,87).

Estudos recentes demonstraram que a respiração mitocondrial e a motilidade do espermatozoide são altamente afetadas pelo estresse oxidativo em consequência, provavelmente, a danos nas proteínas e lipídeos da membrana mitocondrial (24,25,87). Assim, o enriquecimento da detoxificação celular de EROs no grupo controle demonstra a presença de mecanismos de proteção no plasma seminal contra danos oxidativos à mitocôndria. As proteínas co-funcionais dessa função, *glutathione peroxidase 3*, *glutathione reductase*, *mitochondrial peroxiredoxin-1* e *superoxide dismutase [Cu-Zn]* estavam hiperexpressas no grupo controle, sugerindo que, apesar de presentes no grupo alterado, a sua expressão reduzida pode prejudicar a proteção celular contra EROs, o que provavelmente está relacionado com a baixa atividade mitocondrial encontrada nesse grupo.

Por outro lado, a principal função enriquecida no grupo alterado foi a inibição de endopeptidases (Figura 2). Os inibidores de proteases presentes no plasma seminal são importantes para a proteção dos espermatozoides e de outras proteínas do plasma seminal contra a proteólise (88,89). Além disso, foi demonstrado em

camundongos que inibidores de protease presentes no plasma seminal se ligam à cabeça do espermatozoide, inibindo a reação acrossômica e, portanto, a fertilização (90). Apesar do seu papel fisiológico, a hiperexpressão gênica de inibidores de proteases epididimários foi encontrada em pacientes com azoospermia não obstrutiva quando comparado a homens com espermatogênese normal (91). Variações genéticas de inibidores de proteases também foram associadas à alteração da qualidade seminal (92) e à infertilidade (93).

A função de oxidoreductase intramolecular, também enriquecida no grupo alterado, está envolvida com a catálise de uma reação de óxido-redução dentro de uma mesma molécula, sem a formação final de um produto de oxidação (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0016860>). As proteínas co-funcionais desse processo *endoplasmic reticulum resident protein 44*, *protein disulfide-isomerase* e *prostaglandin E synthase 3* são importantes para a formação e rearranjo de pontes dissulfeto entre proteínas, além de funcionarem como chaperonas (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BS26>, <http://www.uniprot.org/uniprot/P07237>, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15185>).

Dessa forma, o enriquecimento da inibição de endopeptidases e da função de oxidoreductase intramolecular demonstra a presença de mecanismos de proteção contra as alterações na atividade mitocondrial dos espermatozoides. Entretanto, a presença de proteínas celulares hiperexpressas no plasma seminal desse grupo sugere defeitos na espermatogênese e/ou danos aos espermatozoides, os quais podem estar associados à baixa atividade mitocondrial. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para o enriquecimento de lisossomos, o que se deve provavelmente à presença de proteínas do espermatozoide relacionadas à sua formação no plasma seminal.

O enriquecimento do catabolismo de glicosaminoglicanos no grupo alterado é interessante para o estudo da infertilidade. A presença de glicosaminoglicanos é essencial para a capacitação do espermatozoide (94,95). Dessa forma, pode-se sugerir que a hiperexpressão de proteínas ligadas ao catabolismo de glicosaminoglicanos pode prejudicar a capacitação do espermatozoide, levando à infertilidade encontrada em pacientes com baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides.

Por fim, o enriquecimento da resposta imune de fase aguda demonstra um efeito negativo de infecções no trato reprodutivo masculino na fertilidade. Mais de

15% dos homens com infertilidade apresentam infecção ou inflamação (96). Esses efeitos podem ser promovidos pela ação direta do agente infeccioso nos espermatozoides ou pela ativação do sistema imune. Em um estudo recente, demonstrou-se que a infecção pelo vírus da Hepatite C promove alterações na estrutura e função da mitocôndria, com uma redução no potencial de membrana e aumento na formação de EROs (97). Indiretamente, a infiltração de neutrófilos e macrófagos ativados no tecido lesado pode promover danos às mitocôndrias do espermatozoide, devido à geração de EROs e espécies reativas de nitrogênio, à liberação de enzimas hidrolíticas e à apoptose induzida por citocinas (98–100). Isso é ainda mais interessante se levado em consideração que o processo de detoxificação de EROs pode estar reduzido nesse grupo, o que poderia acentuar os danos à mitocôndria causados pela infecção e pela resposta imune.

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem uma associação entre redução da atividade mitocondrial dos espermatozoides e alterações biológicas, como redução da proteção contra EROS, inibição de endopeptidases, catabolismo de glicosaminoglicanos e resposta imune. Ainda, foram propostos biomarcadores seminais para as alterações na mitocôndria, como as proteínas *acrosin-binding protein*, a *annexin A7* e a *glutathione S-transferase Mu 3*.

A proteína *acrosin-binding protein* está envolvida com a formação do acrossoma durante a espermatogênese (101). Alterações na sua expressão foram relacionadas à distribuição incorreta de proteínas pelo acrossoma, como a pró-acrosina (101), a defeitos na morfologia do acrossoma (102) e a alterações da função do espermatozoide (102,103). Além disso, a *acrosin-binding protein* é fosforilada durante a capacitação (91) para regular a formação de acrosina a partir de seus precursores (102,104). Assim, essa proteína está diretamente relacionada à reação acrossômica e à fertilização (101,105,106). Além disso, a presença dessa proteína foi associada também a maior resistência de espermatozoides bovinos ao congelamento-descongelamento (107). A proteína *annexin A7*, por sua vez, parece atuar como um canal de cálcio e como uma GTPase ativada por cálcio, regulando, portanto, eventos de excitose (108–110). Além disso, essa proteína está envolvida com a translocação da proteína *galectin-3* para a mitocôndria, onde essa tem ação anti-apoptótica. Assim, a *annexin A7* é importante também para a integridade mitocondrial e para a regulação da apoptose (111). Outro biomarcador sugerido foi a proteína *glutathione S-transferase Mu 3*, uma proteína presente na membrana do

espermatozoide e que sofre alterações na sua distribuição durante a maturação no epidídimo e a capacitação. Essa proteína parece ser um receptor para proteínas presentes na zona pelúcida do oócito (*zona pellucida sperm-binding protein 3* e *zona pellucida sperm-binding protein 3*) (112). Por isso, ela é importante para a reação acrossômica e para a fertilização (113). Além disso, essa classe de proteínas age também na detoxificação de EROs (114).

Interessantemente, as proteínas propostas como biomarcadores seminais da alteração da atividade mitocondrial estão envolvidas, em grande parte, com a reação acrossômica e com a integridade mitocondrial. Portanto, a hiperexpressão dessas proteínas no grupo alterado pode ser um mecanismo compensatório aos danos mitocondriais. Além disso, uma vez que essas proteínas têm origem celular, essas podem ser um indicativo de danos ao espermatozoide, os quais podem estar associados à redução da atividade mitocondrial.

4.2 Estudo 2 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides

Sugere-se que espermatozoides com disfunções acrossomais apresentem capacitação comprometida e incapacidade de completar a reação acrossômica, afetando diretamente o sucesso da fertilização (10,115). Um estudo de Xiao e colaboradores demonstrou que a proteína *protein interacting with C kinase 1* é essencial para a formação do acrossoma, sugerindo que alterações em sua expressão poderiam levar a alterações acrossomais (116). Outro estudo, o qual comparou o proteoma do plasma seminal entre pacientes férteis e vasectomizados, encontrou diferenças em diversas proteínas acrossomais, como *sperm acrosome membrane-associated protein 3*, *zona pellucida-binding protein 2*, *acrosin-binding protein* e *cysteine-rich secretory protein 1* (CRISP1) (39). Essas proteínas se originam nos testículos e epidídimos e, então, são adicionadas ao acrossoma do espermatozoide, sendo importantes para a sua formação e para a reação acrossômica e, portanto, para a fertilização (39). Por outro lado, a proteína CRISP1 foi encontrada no plasma seminal de homens com alta fragmentação do DNA dos espermatozoides (41).

No presente estudo, setenta e seis proteínas foram diferencialmente expressas no plasma seminal entre os grupos controle (alta integridade do

acrossoma dos espermatozoides, n=23) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides, n=22). Dessas, vinte e sete foram hiperexpressas ou exclusivamente expressas no grupo controle e quarenta e nove, no grupo alterado (Tabelas 6 e 7).

A função enriquecida no plasma seminal do grupo controle foi a resposta imune de fase aguda (Figura 6). A hiperexpressão de proteínas relacionadas à resposta imune de fase aguda sugere a presença de agentes infecciosos no trato reprodutivo masculino e a ativação da imunidade celular e humoral, os quais não afetariam a integridade do acrossoma.

No grupo alterado, as principais funções enriquecidas foram transporte lisossomal, regulação da exocitose, inibição de fosfolipase, transporte intracelular dependente de citoesqueleto, ligação ao GDP, regulação da resposta inflamatória aguda, metabolismo do ácido araquidônico e resposta celular ao peróxido de hidrogênio (Figura 6).

A maior parte das proteínas hiperexpressas nesse grupo correspondeu às funções de transporte lisossomal e regulação da exocitose. Apesar de o acrossoma ser classicamente conhecido como uma vesícula secretória derivada do complexo de Golgi (117), um novo estudo realizado por Berruti e colaboradores demonstrou que a formação do acrossoma está intimamente relacionada ao lisossomo (118). Com isso, pode-se sugerir que o transporte lisossomal está envolvido com a formação e integridade do acrossoma. A hiperexpressão das proteínas envolvidas com essa função no plasma seminal do grupo alterado pode sugerir (i) que danos ao acrossoma podem promover a liberação dessas proteínas no plasma seminal ou (ii) reação acrossômica precoce. A reação acrossômica consiste em um evento de exocitose em que a membrana acrossomal externa se funde à membrana plasmática do espermatozoide, com consequente liberação das enzimas acrossomais, importantes para a fusão do espermatozoide com o oócito (119). Assim, as hipóteses da liberação de proteínas acrossomais no plasma seminal e de reação acrossômica precoce sugerem alterações na espermatogênese e/ou danos ao espermatozoide, provavelmente no acrossoma, o que estaria relacionado à alteração na integridade do acrossoma.

Adicionalmente, a reação acrossômica (120) e a fertilização (121) dependem de fosfolipases seminais, as quais promovem a hidrólise de fosfolipídeos. A atividade da fosfolipase A está aumentada no plasma seminal de homens

normozoospermicos em comparação a homens azoospermicos (122). A fosfolipase A2 parece estar envolvida com a reação acrossômica (123). Além disso, a fosfolipase C zeta, uma proteína testicular presente no espermatozoide e envolvida com a ativação oocitária, teve sua expressão gênica reduzida em homens inférteis, quando comparado a homens férteis (124). Assim, é possível sugerir que o enriquecimento da função de inibição de fosfolipases pode ter uma ação deletéria para a fertilidade, o que está associado a alterações no acrossoma do espermatozoide.

O transporte dependente de citoesqueleto também é importante durante a espermatogênese e para a formação correta do acrossoma. O citoesqueleto do espermatozoide envolve, principalmente, a presença de microtúbulos e de actina, os quais são importantes durante a espermiogênese, pois permitem o transporte vesicular (125) e a formação do acrossoma (126) e fornecem um caminho para as proteínas destinadas ao núcleo e flagelo (127). A presença de proteínas envolvidas com esse processo no plasma seminal sugere alterações na espermatogênese, as quais podem estar associadas às alterações no acrossoma.

Outra função enriquecida nesse grupo foi a de regulação da resposta inflamatória aguda, o que contrasta com o enriquecimento da resposta imune de fase aguda encontrada no grupo controle. Inflamações do trato reprodutivo masculino podem promover alterações na qualidade seminal e nas funções dos espermatozoides devido à produção de EROs e de citocinas pró-inflamatórias (30,128–131), o que está relacionado à infertilidade (128,131). Essas citocinas podem levar a danos funcionais dos espermatozoides por meio da indução de apoptose (129,132). Assim, a resposta imune celular mediada por agentes pró-inflamatórios pode estar envolvida com a alteração no acrossoma dos espermatozoides do grupo alterado. Em contraste, a resposta imune humoral e celular não dependente de citocinas parece não afetar a integridade do acrossoma.

O metabolismo do ácido araquidônico, enriquecido no grupo alterado, está envolvido com a formação de prostaglandinas (133) e com a indução da reação acrossômica, o que já foi demonstrado em animais (134,135) e em humanos (136). Em humanos, as prostaglandinas também estão envolvidas diretamente com a competência funcional dos espermatozoides (137) e com a reação acrossômica (138,139). Entretanto, um estudo de Schlegel e colaboradores demonstrou que o nível seminal de prostaglandina E2 está aumentado em pacientes com varicocele,

oligozoospermicos e astenozoospermicos. O nível seminal de prostaglandina F2-alfa também foi maior em todos os pacientes inférteis avaliados e se correlacionou negativamente com a motilidade do espermatozoide em homens férteis (140). A principal via de formação do ácido araquidônico depende da atividade da fosfolipase A2 (137), a qual parece estar inibida no grupo alterado. Assim, sugere-se que o metabolismo do ácido araquidônico, enriquecido nesse grupo, se dá por uma via diferente da via da fosfolipase A2. A hiperexpressão de proteínas relacionadas a esse processo no plasma seminal do grupo alterado pode demonstrar a indução de reação acrossômica precoce nos espermatozoides, o que poderia estar relacionado aos danos na integridade do acrossoma observados nesse grupo. Além disso, a formação de prostaglandinas pode estar associada à infertilidade.

Além do metabolismo do ácido araquidônico, o enriquecimento da resposta celular ao peróxido de hidrogênio também pode estar intimamente ligado à inflamação aguda do trato genitourinário. Estudos demonstraram uma correlação entre os níveis de peróxido de hidrogênio e as inflamações em homens inférteis (141). Em níveis fisiológicos, o peróxido de hidrogênio é importante para a capacitação e a reação acrossômica, entretanto, em maiores concentrações, esses processos podem ser inibidos (142). Em ratos, demonstrou-se que altos níveis de peróxido de hidrogênio induzem reação acrossômica prematura (10). Assim, a hiperexpressão de proteínas relacionadas à resposta ao peróxido de hidrogênio demonstram o aumento na produção dessa ERO, o que pode estar diretamente relacionado à alteração na integridade do acrossoma encontrada nesse grupo.

Dessa forma, este estudo sugere diversos mecanismos associados à alteração na integridade do acrossoma, como resposta inflamatória aguda, biossíntese de prostaglandinas e aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio. Esses podem estar diretamente envolvidos com a infertilidade masculina. Além disso, foram propostos biomarcadores seminais de alterações no acrossoma, como as proteínas *phospholipid transfer protein* e *protein S100-A10*. A proteína *phospholipid transfer protein* está presente no testículo e epidídimo (143,144) e, além de facilitar a troca de fosfolípidos entre as lipoproteínas circulantes, pode se ligar à vitamina E (145). Essa proteína já foi encontrada também no plasma seminal (44). A deficiência de *phospholipid transfer protein* foi associada à infertilidade em camundongos, devido à redução da motilidade do espermatozoide e da taxa de fertilização (144). Foi associada, também, à redução da quantidade de vitamina E no

espermatozoide e no epidídimo (144), a qual tem um grande papel durante a espermatogênese (146). As alterações no espermatozoide associadas à deficiência dessa proteína parecem ter ocorrido durante a maturação no epidídimo (144). Por sua vez, a *protein S100A10* participa como um regulador da fosforilação de *annexin A2* (<http://www.uniprot.org/uniprot/P60903>). Um aumento da expressão de *protein S100-A10* foi encontrado nos testículos de homens inférteis (147).

4.3 Estudo 3 – Análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides

Estudos recentes revelaram um aumento em danos ao DNA de espermatozoides em homens inférteis (148–151). A fragmentação do DNA está associada à redução do potencial reprodutivo natural (152) e das taxas de sucesso de técnicas de reprodução assistida (TRA) (151,153). Está associada, também, à redução da qualidade embrionária (154) e ao aumento nas taxas de aborto (155), além de ser pró-mutagênica (11). Além disso, demonstrou-se que grupos de pacientes com diferentes tipos de infertilidade masculina apresentam perfis de danos ao DNA dos espermatozoides também diferentes (149).

A fragmentação do DNA dos espermatozoides pode refletir alterações na espermatogênese, como falhas na compactação da cromatina durante a espermiogênese (23) ou alterações no processo de apoptose (156). Assim, é possível hipotetizar que danos ao DNA dos espermatozoides poderiam refletir-se em alterações no proteoma do plasma seminal, como a presença de proteínas associadas à espermatogênese alterada e à morte celular e de proteínas do plasma seminal oxidadas e a solubilização de proteínas do espermatozoide liberadas devido a danos à membrana do espermatozoide.

Essa hipótese foi testada em um estudo anterior (41), o qual demonstrou que a fragmentação do DNA dos espermatozoides está associada à presença de uma resposta imune exacerbada, à ligação a ácidos graxos e à atividade de endorribonuclease. Além disso, foram encontradas proteínas testiculares e epididimárias hiperexpressas no plasma seminal de homens com alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, revelando alterações na espermatogênese e na maturação epididimária. Entretanto, esse estudo utilizou uma técnica proteômica com menor resolução e sensibilidade, além de um número de pacientes reduzido.

Dessa forma, este trabalho propôs uma nova análise do perfil proteômico do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides, em busca de resultados ainda mais confiáveis e representativos.

No presente estudo, cento e trinta e quatro proteínas estiveram diferencialmente expressas no plasma seminal entre os grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides, n=22) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides, n=22). Dessas, cento e oito foram hiperexpressas ou exclusivamente expressas no grupo controle e vinte e seis, no grupo alterado (Tabelas 10 e 11).

As principais funções enriquecidas no grupo controle foram metabolismo de carboidratos, regulação do nível de lipoproteínas, regulação positiva de células *Natural Killer* (NK), regulação negativa da via intrínseca da apoptose, metabolismo de hormônios peptídicos, organização e desorganização da matriz extracelular, homotetramerização de proteínas, morfogênese de ureteres, ligação a glicoproteínas, ligação a proteases, atividade de metalopeptidases, ligação ao NAD, lisossomos, regulação da replicação do DNA, ligação à heparina, catabolismo de glicosaminoglicanos, regulação negativa da atividade de peptidase e inibição de fosfolipases (Figura 10).

O enriquecimento do metabolismo de carboidratos envolveu os processos de gliconeogênese, vias glicolíticas, ciclo do ácido tricarboxílico e respiração aeróbica. A glicólise anaeróbica é essencial para a motilidade e capacitação de espermatozoides humanos (157). A energia produzida pelo espermatozoide é necessária para a manutenção da composição do meio intracelular, para modificações estruturais e funcionais que ocorrem durante a maturação, a capacitação e a fertilização e para a motilidade (158). O metabolismo oxidativo envolvendo o ciclo do ácido tricarboxílico e a respiração mitocondrial, por sua vez, é importante para a função correta do espermatozoide (9,70,77) e pode ter um efeito promotor da capacitação, apesar de não ser indispensável para esse processo (157). Além disso, Ferramosca e colaboradores sugeriram uma correlação entre a respiração mitocondrial e a integridade do DNA do espermatozoide (159). Em relação à gliconeogênese, ainda há poucos relatos na literatura sobre a presença desse processo em espermatozoides de mamíferos. Em cachorros, demonstrou-se que a gliconeogênese é importante para a manutenção da motilidade e da capacitação (160). A presença de gliconeogênese em espermatozoides de

camundongos também foi sugerida (161). Entretanto, outro estudo revelou a ausência de gliconeogênese em espermatozoides de bovinos (162).

Interessantemente, em um estudo anterior, a função de metabolismo de carboidratos também foi enriquecida em espermatozoides com baixa fragmentação de DNA (61). Assim, o presente estudo sugere que, além de estar alterado nos espermatozoides, o metabolismo de carboidratos também está alterado no plasma seminal de pacientes com alta fragmentação do DNA dos espermatozoides. Apesar da presença dessas proteínas não ser esperada no plasma seminal, foi demonstrado que enzimas glicolíticas são expressas nos prostassomos, os quais são vesículas extracelulares encontradas em grandes quantidades no sêmen humano (163).

A função de regulação do nível de lipoproteínas também foi enriquecida nesse grupo, envolvendo as proteínas hiperexpressas *low-density lipoprotein receptor*, *angiotensinogen* e *lipoprotein lipase*. O plasma seminal é rico em lipoproteínas, as quais armazenam triacilglicerídeos, essenciais para o metabolismo do espermatozoide (164,165). Os triacilglicerídeos podem ser utilizados como fonte de energia, devido à ligação das lipoproteínas aos receptores presentes na membrana do espermatozoide, promovendo a internalização e hidrólise dos triacilglicerídeos. Esse processo é estimulado pela lipoproteína lipase, secretada pela glândula bulbouretral durante a ejaculação (164–166). Além de ser importante para fornecer energia, as lipoproteínas seminais são necessárias para o remodelamento da membrana dos espermatozoides, processo fundamental para que essa célula atinja seu potencial de fertilização (45,165). Essas modificações ocorrem durante a maturação no epidídimo, a capacitação e a reação acrossômica e envolvem o efluxo de colesterol da membrana (49,50). Proteínas do plasma seminal, como as lipoproteínas, são capazes de se ligar à superfície do espermatozoide e agir também no trato reprodutivo feminino, regulando negativa ou positivamente a capacitação do espermatozoide (168).

No estudo realizado anteriormente para analisar o perfil proteômico do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides, a função de regulação do nível de lipoproteínas também foi enriquecida no grupo controle (41). Dessa forma, o presente estudo confirma os achados anteriores, sugerindo um envolvimento desse processo com a função correta do espermatozoide. Sua

alteração no plasma seminal pode, portanto, estar associada à fragmentação do DNA dos espermatozoides.

Outra função enriquecida nesse grupo foi a de regulação positiva de células NK, a qual é importante tanto no trato reprodutivo masculino quanto no feminino. No sêmen, a atividade dessas células parece ser importante para a remoção de espermatozoides alterados e não funcionais (169). Um aumento no número de células NK foi encontrado no sêmen de homens com oligoastenozoospermia e azoospermia obstrutiva (169). No útero, essas células parecem ser importantes para a gravidez, pois a sua proliferação ocorre durante a fase secretória final do endométrio e no início da gravidez (170), regulando a invasão do trofoblasto (171) e a angiogênese uterina (172). Assim, pode-se sugerir que a indução da atividade das células NK no plasma seminal do grupo controle pode ser importante tanto para a remoção de espermatozoides ejaculados que possuam o DNA fragmentado, quanto para a gravidez.

O enriquecimento da regulação negativa da via intrínseca da apoptose no grupo controle é um achado intrigante, uma vez que essa função já foi encontrada anteriormente em espermatozoides viáveis com alta fragmentação de DNA (61). Com isso, a hiperexpressão de proteínas envolvidas com esse processo no plasma seminal do grupo controle sugere que alterações nos mecanismos de seleção dos espermatozoides durante a espermatogênese podem estar alterados inclusive em pacientes com baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides. Esse resultado contradiz a hipótese de apoptose abortiva como uma das causas de fragmentação de DNA de espermatozoides (156), uma vez que a inibição da apoptose não foi associada à alta fragmentação do DNA.

Outra função enriquecida no plasma seminal desse grupo foi a de ligação à heparina. A heparina é o glicosaminoglicano com maior poder de indução da capacitação (95). Durante a capacitação do espermatozoide, proteínas que se ligam à heparina, derivadas do plasma seminal e ligadas à membrana do espermatozoide, principalmente em lipídeos que contém grupo fosforilcolina, permitem a ativação desse processo pela heparina (173,174). Assim, as proteínas de ligação à heparina têm papel fundamental na sobrevivência e capacidade de fertilização do espermatozoide. Qualquer alteração na expressão dessas proteínas pode levar à incapacidade de fertilização e, conseqüentemente, à infertilidade (168), o que pode estar relacionado à alta fragmentação do DNA dos espermatozoides.

Esse resultado se torna ainda mais interessante com o enriquecimento do catabolismo de glicosaminoglicanos nesse grupo. Uma vez que a presença de proteínas de ligação à heparina poderia facilitar a capacitação precoce do espermatozoide, uma explicação plausível seria a de que proteínas relacionadas ao catabolismo de glicosaminoglicanos são hiperexpressas nesse grupo na tentativa de controlar esse processo.

Entretanto, o enriquecimento das funções de catabolismo de glicosaminoglicanos, de regulação negativa da atividade de proteases e de inibição de fosfolipases contrastam com os resultados dos estudos 1 e 2, pois essas funções foram enriquecidas no plasma seminal dos grupos alterados. Com isso, é possível sugerir que alguns mecanismos envolvidos com a alteração da atividade mitocondrial e da integridade do acrossoma são diferentes daqueles associados à fragmentação do DNA dos espermatozoides.

Em contraste, as principais funções enriquecidas no grupo alterado foram biossíntese de prostaglandinas e ligação a ácidos graxos (Figura 10). Em linfócitos de camundongos, foi demonstrado que a prostaglandina E1 é capaz de prevenir danos ao DNA provocados por agentes genotóxicos e citotóxicos. Em contraste, as prostaglandinas E2 e F2-alfa não só não tiveram o mesmo efeito protetor, como também foram genotóxicas. (175). No sêmen, as prostaglandinas 8-iso-prostaglandina E2, 8-iso-prostaglandina F2 e 8-isoprostano vêm sendo utilizadas como marcadores de estresse oxidativo seminal (176–178). Além disso, uma correlação positiva entre os níveis de 8-isoprostano e a fragmentação do DNA dos espermatozoides já foi encontrada anteriormente (176). Aitken e colaboradores sugerem que a maioria dos danos ao DNA dos espermatozoides é induzida pelo estresse oxidativo e ocorre após a espermição (26,179). Os resultados do presente estudo sugerem uma relação entre a biossíntese de prostaglandinas e a fragmentação do DNA dos espermatozoides, o que pode estar diretamente relacionado ao estresse oxidativo seminal. A biossíntese de prostaglandinas também foi enriquecida no plasma seminal do grupo baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides.

Em um estudo anterior, a função de ligação a ácidos graxos também foi enriquecida no plasma seminal do grupo alterado (41). Assim, os resultados do presente estudo confirmam os achados anteriores e sugerem um envolvimento do transporte de ácidos graxos no plasma seminal com a fragmentação do DNA dos

espermatozoides. Além disso, diversos outros mecanismos associados a essa alteração foram propostos pelos resultados deste estudo, como metabolismo de carboidratos, regulação do nível de lipoproteínas, regulação de células NK e formação de prostaglandinas.

Além das funções alteradas associadas à fragmentação do DNA dos espermatozoides, este estudo propôs alguns biomarcadores, como as proteínas *sperm-associated antigen 11B* e *proteasome subunit alpha type-5*. A proteína *sperm-associated antigen 11B*, identificada como biomarcador do grupo controle, é secretada pelo epidídimo e adicionada ao acrossoma dos espermatozoides (180). A ligação dessa proteína no espermatozoide é regulada por andrógenos, o que sugere que essa tenha um papel na maturação do espermatozoide. Além disso, por estar ligada à região pós-acrossomal da cabeça do espermatozoide, sugere-se também que essa proteína tenha um papel direto na fertilização (181). Dessa forma, essa proteína é importante para a função e capacidade de fertilização do espermatozoide. Por sua vez, a proteína *proteasome subunit alpha type-5* foi identificada como biomarcador do grupo alterado. Os proteassomos são complexos de proteínas que participam na degradação de proteínas, o que é importante para a progressão do ciclo celular e para a apoptose (182). Esse processo é importante para a espermatogênese (183), para a capacitação (184,185) e para a remoção de espermatozoides com DNA danificado (186). Assim, a identificação da proteína *proteasome subunit alpha type-5* como biomarcador seminal de fragmentação do DNA dos espermatozoides demonstra uma tentativa de remoção dos espermatozoides danificados.

4.4 Estudo 4 – Análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e de antioxidantes, favorecendo o lado pró-oxidativo (27). Os espermatozoides humanos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, em consequência da elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana plasmática (187), da sua capacidade antioxidante limitada (188) e da baixa capacidade de reparo da sua membrana (189).

Os fatores cruciais na etiologia das alterações funcionais dos espermatozoides em decorrência do estresse oxidativo são a oxidação de fosfolipídeos da membrana, processo conhecido como peroxidação lipídica, e a oxidação de proteínas (13,26).

A peroxidação lipídica é um processo que se inicia com o ataque de EROs às duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados, levando à substituição de um átomo de hidrogênio por um de oxigênio e à consequente formação de radicais peróxil (ROO^\cdot) e alcóxil (RO^\cdot). Esses radicais promovem a abstração de átomos de hidrogênio dos carbonos adjacentes, a fim de estabilizar a molécula de fosfolipídeo, formando novos radicais lipídicos e moléculas de peróxidos e aldeídos lipídicos, como o MDA (26). Adicionalmente, foi demonstrado que as mitocôndrias do espermatozoide são capazes de responder a esse processo com um aumento drástico na produção de EROs (190,191). Dessa forma, a peroxidação lipídica é um processo capaz de auto-propagação, levando à perda da integridade, da estabilidade e da permeabilidade seletiva da membrana plasmática e mitocondrial do espermatozoide e à inativação de enzimas (31).

A oxidação das proteínas, por sua vez, leva à produção de grupos carbonila, o que as torna mais suscetíveis à proteólise (36). Além disso, grupos sulfidríla, presentes principalmente nos resíduos de cisteína das proteínas, são altamente suscetíveis à oxidação por EROs. Isso promove o acúmulo de proteínas oxidadas e, em alguns casos, a redução da sua função (34,35). Assim, a perda de grupos sulfidríla livres é considerada um marcador de estresse oxidativo (192). Estudos demonstraram uma redução significativa nos níveis de sulfidríla livres no plasma seminal de pacientes inférteis (53,54). Além disso, a redução desses marcadores foi associada à redução da qualidade e função dos espermatozoides (33).

Sugere-se que o efeito do estresse oxidativo nas proteínas extracelulares é muito mais proeminente do que em proteínas localizadas no meio intracelular. Isso decorre da sua meia-vida mais longa, além do fato de que a prevenção e reparação de danos a essas proteínas é mais difícil (35). Portanto, é possível hipotetizar que um aumento na peroxidação de lipídeos dos espermatozoides e do plasma seminal pode ser acompanhado de alterações no perfil de proteínas do plasma seminal. Essas diferenças podem ocorrer por: (i) oxidação das proteínas do plasma seminal, (ii) oxidação de proteínas dos espermatozoides liberadas no plasma seminal, (iii) peptídeos oriundos da proteólise de proteínas do plasma seminal e dos

espermatozoides e (iv) liberação de proteínas de espermatozoides alterados ou mortos no plasma seminal.

Para testar essa hipótese, este estudo realizou a análise proteômica do plasma seminal em associação aos níveis seminais de peroxidação lipídica. Noventa e quatro proteínas foram diferencialmente expressas no plasma seminal entre os grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica, n=23) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica, n=23). Dessas, vinte e três foram hiperexpressas ou exclusivamente expressas no grupo controle e setenta e uma, no grupo alterado (Tabelas 14 e 15).

Nesse estudo, foram encontradas funções enriquecidas apenas no grupo alterado. Dessas, destacam-se a biossíntese de ácidos graxos insaturados, resposta celular ao ânion superóxido, metabolismo de glutatona e de peróxido de hidrogênio, resposta a metais de transição, detoxificação de EROs, homeostase, perda de proteínas necessárias para a organização dos microtúbulos do centrosomo durante a interfase, produção de quimiocinas, resposta celular ao estresse térmico e resposta imune (Figura 14).

As funções enriquecidas estão intimamente relacionadas à peroxidação lipídica e ao estresse oxidativo. Os ácidos graxos insaturados, principalmente os com poliinsaturações, são responsáveis pela fluidez e flexibilidade da membrana do espermatozoide, a qual é essencial para a fertilização. Entretanto, a presença de ligações duplas entre os carbonos desses ácidos graxos os torna mais suscetíveis ao ataque das EROs e, portanto, à peroxidação lipídica (193,194). Assim, o enriquecimento da função de biossíntese de ácidos graxos insaturados no grupo alterado poderia ocorrer devido: (i) ao ataque dessas moléculas pelas EROs e à formação de peróxidos lipídicos, como uma tentativa de reestruturação da membrana do espermatozoide ou (ii) a uma forma de propagação da peroxidação lipídica, com nova formação de ácidos graxos insaturados e sua incorporação na membrana, facilitando seu ataque pelas EROs.

A cascata do estresse oxidativo no sêmen já é amplamente conhecida e inicia-se com a formação do ânion superóxido durante a respiração mitocondrial, o que é um processo normal no metabolismo celular (187). Esse pode ser convertido a peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase, tanto na mitocôndria (superóxido dismutase dependente de manganês) quanto no citoplasma (superóxido dismutase dependente de cobre e zinco) (195). Além disso, a superóxido dismutase

dependente de cobre e zinco é secretada pelo epitélio do epidídimo e seu nível e atividade parecem aumentar da cabeça para a cauda do epidídimo (196,197). O peróxido de hidrogênio pode ter dois destinos: (i) ser convertido a água e oxigênio pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase ou (ii) facilmente atravessar a membrana mitocondrial e celular e receber um elétron doado de íons ferro ou cobre, dando origem ao radical hidroxila, a mais reativa e prejudicial ERO (195). Os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase) e não enzimáticos (albumina, glutathione, taurina, entre outros) são importantes para a detoxificação de EROs e, assim, para a manutenção da homeostase e estão presentes em grandes quantidades no plasma seminal (198). Dessa forma, o enriquecimento das funções de resposta celular ao ânion superóxido, metabolismo de glutathione e de peróxido de hidrogênio, resposta a metais de transição, detoxificação de EROs e homeostase demonstram o excesso na produção de EROs no sêmen e a produção de antioxidantes na tentativa de restabelecer o equilíbrio redox no plasma seminal. Essas funções estão diretamente associadas ao alto nível seminal de peroxidação lipídica encontrada no plasma seminal do grupo alterado.

Estudos demonstraram uma associação entre o estresse oxidativo e o estresse térmico (199,199,200). O estresse térmico é causado pelo aumento da temperatura escrotal, o que pode ser causado pela varicocele (199), obesidade (201) ou fatores de estilo de vida, como trabalhar durante longos períodos sentado (202). EROs parecem ser mediadores citotóxicos para as células germinativas e espermatozoides durante o estresse térmico (203). Assim, o enriquecimento da função de resposta celular ao estresse térmico pode demonstrar que o aumento dos níveis seminais de peroxidação lipídica encontrado nesse grupo pode se dar devido ao aumento da temperatura testicular.

Por fim, o enriquecimento da resposta imune é interessante, uma vez que diversos estudos já relacionaram a ocorrência de infecções e de inflamações no trato reprodutivo masculino com o estresse oxidativo seminal (30,97–100,128), como discutido anteriormente. Assim, os resultados do presente estudo demonstram que altos níveis seminais de peroxidação lipídica estão associados a mecanismos de detoxificação de EROs e de resposta a EROs, ao estresse térmico e a uma resposta imune exacerbada. Além disso, foram propostos potenciais biomarcadores seminais associados ao nível seminal de peroxidação lipídica. A proteína *2',3'-cyclic-*

nucleotide 3'-phosphodiesterase foi identificada como biomarcador de baixos níveis seminais de peroxidação lipídica. Essa é uma proteína testicular que hidrolisa a Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) (204). Nucleotídeos cíclicos são importantes para a regulação da função testicular. Nas células de Sertoli e de Leydig, essa proteína participa na resposta a gonadotrofinas (205), enquanto nas células germinativas está envolvida com o controle da maturação do espermatozoide no epidídimo (206) e da diferenciação celular nos túbulos seminíferos (207). Assim, as enzimas fosfodiesterase são importante para regular o nível de AMPC e, conseqüentemente, a função testicular e do espermatozoide (205,208). Por outro lado, a protein *heme oxygenase 2* foi sugerida como biomarcador seminal de peroxidação lipídica. Essa proteína controla o catabolismo do grupo heme (209) e foi identificada em testículos de humanos (210). A atividade da *heme oxygenase 2* está relacionada à regulação da espermatogênese (211). Um estudo piloto demonstrou que a atividade dessa proteína está diminuída no plasma seminal de pacientes oligozoospermicos e com azoospermia não obstrutiva quando comparados a homens normozoospermicos (212). Outro estudo demonstrou maiores concentrações dessa proteína no plasma seminal de homens férteis, com uma redução dos seus níveis em homens oligoastenozoospermicos. A maior redução foi encontrada em pacientes oligozoospermicos com varicocele. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de *heme oxygenase* e a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (213). Interessantemente, a *heme oxygenase 2* parece ter papel protetor contra o estresse oxidativo, além de propriedades anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (209,214). Essas funções corroboram essa proteína como um biomarcador da peroxidação lipídica, uma vez que sua hiperexpressão poderia se dar em resposta ao estresse oxidativo.

5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, é possível afirmar que:

- O perfil proteômico do plasma seminal reflete alterações funcionais dos espermatozoides e o nível seminal de peroxidação lipídica;
- Diversas funções pós-genômicas estão relacionadas às alterações estudadas:
 - a. Alterações na atividade mitocondrial dos espermatozoides estão associadas a redução da detoxificação de EROs, inibição de endopeptidases, atividade de oxidoreductase intramolecular, catabolismo de aminoglicanos e resposta imune de fase aguda;
 - b. Alterações na integridade do acrossoma dos espermatozoides estão associadas a transporte lisossomal, regulação da excitose, inibição de fosfolipase, transporte intracelular dependente de citoesqueleto, regulação da resposta inflamatória aguda, metabolismo do ácido araquidônico e resposta celular ao peróxido de hidrogênio;
 - c. A fragmentação do DNA dos espermatozoides está associada à biossíntese de prostaglandinas, ligação a ácidos graxos, redução do metabolismo de carboidratos e alteração nos processos de regulação dos níveis de lipoproteínas, entre outros.
 - d. Altos níveis seminais de peroxidação lipídica estão associados a biossíntese de ácidos graxos insaturados, resposta celular ao ânion superóxido, metabolismo de glutatona e de peróxido de hidrogênio, resposta a metais de transição, detoxificação de EROs, homeostase, resposta celular ao estresse térmico e resposta imune.
- Proteínas relacionadas às alterações funcionais dos espermatozoides e ao nível seminal de peroxidação lipídica constituem potenciais biomarcadores seminais para cada alteração:

- a. Atividade mitocondrial – *acrosin-binding protein, annexin A7, beta-hexosaminidase subunit alpha, BPI fold-containing family B member, cystatin SA, CD63 antigen, endoplasmic reticulum resident protein 44 e glutathione S-transferase Mu 3*;
- b. Integridade do acrossoma - *collagen alpha-1(XII) chain, lipocalin-15, phospholipid transfer protein, protein S100-A10, protein shisa-5 e zinc finger protein 236*;
- c. Fragmentação do DNA - *apolipoprotein L domain-containing protein 1, cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1, cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2, retinoic acid receptor responder protein 1, sperm-associated antigen 11B, alpha-2-antiplasmin, EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 e proteasome subunit alpha type-5*;
- d. Peroxidação lipídica - *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, arginine/serine-rich coiled-coil protein, heme oxygenase 2, mucin-5B, multifunctional protein ADE2, procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase e SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein*.

6 ANEXOS

Anexo I: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 11 de novembro de 2011

CEP N°: 1184/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): PAULA INSTASQUI LOPES

Disciplina/Departamento: Urologia/Cirurgia

Pesquisadores associados: Edson Guimarães Lo Turco, Ricardo Imenta Bertolla (orientador)

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Análise proteômica quantitativa de plasma seminal e de espermatozoides e sua associação com aspectos funcionais dos espermatozoides e com o nível de peroxidação lipídica no plasma seminal :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, sem procedimento invasivo

OBJETIVO DO ESTUDO: Comparar os perfis protéicos do plasma seminal e de espermatozoides entre: amostras seminais com baixo e com alto nível de peroxidação lipídica; amostras com baixa e alta atividade mitocondrial dos espermatozoides; amostras com baixa e alta taxa de acrossomas integros; amostras com baixa e alta fragmentação do DNA dos espermatozoides. Identificar possíveis biomarcadores relacionados à qualidade funcional dos espermatozoides.

RESUMO: Será realizado um estudo transversal incluindo pacientes que procurarem o Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, da UNIFESP, cujo sêmen apresente condições adequadas para o estudo. Serão coletadas 200 amostras, as quais, posteriormente serão distribuídas em grupos, de acordo com a qualidade funcional dos espermatozoides e com o nível seminal de peroxidação lipídica. Uma alíquota será utilizada para provas funcionais e outra para análise seminal, e o restante será centrifugado e dividido em plasma seminal sobrenadante e fração celular. Uma alíquota do plasma seminal será utilizada para análise de peroxidação lipídica e o restante para análise proteômica. A fração celular será processada para seleção apenas de espermatozoides, os quais serão utilizados para análise proteômica.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo

TCLE: Apresentado adequadamente

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 662,50

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 05/11/2012 e 31/10/2013

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo II: Análise quantitativa das proteínas do plasma seminal, realizada pelo método BCA (Ácido Bicinconínico).

Tabela Suplementar 1. Análise quantitativa das proteínas presentes no plasma seminal das amostras individuais dos pacientes selecionados para comporem os grupos experimentais.

Amostra	Média (µg/mL)	Volume utilizado para confecção do pool	Amostra	Média (µg/mL)	Volume utilizado para confecção do pool
1	32332,12	6,2	59	40500,45	4,9
2	36218,69	5,5	60	24876,61	8,0
3	43527,62	4,6	61	28565,73	7,0
4	26579,98	7,5	62	30487,57	6,6
5	41313,11	4,8	63	22592,88	8,9
6	33481,08	6,0	64	31257,71	6,4
7	29342,13	6,8	65	34406,16	5,8
8	30356,8	6,6	66	38126,98	5,2
9	26366,67	7,6	67	34128,46	5,9
10	17451,64	11,5	68	28840,02	6,9
11	20780,96	9,6	69	30404,76	6,6
12	26767,35	7,5	70	23353,13	8,6
13	39136,55	5,1	71	42153,04	4,7
14	27359,34	7,3	72	31341,05	6,4
15	34273,64	5,8	73	22647,24	8,8
16	29779,5	6,7	74	40472,38	4,9
17	34334,45	5,8	75	20777,83	9,6
18	35614,52	5,6	76	30295,55	6,6
19	48425,09	4,1	77	37709,94	5,3
20	30771,04	6,5	78	38349,69	5,2
21	42764,74	4,7	79	32913,53	6,1
22	51201,45	3,9	80	31703,42	6,3
23	24164,31	8,3	81	36672,84	5,5
24	48585,1	4,1	82	31844,34	6,3
25	30387,77	6,6	83	27093,9	7,4
26	20497,82	9,8	84	49107,97	4,1
27	24822,91	8,1	85	28162,04	7,1
28	25301,49	7,9	86	21560,43	9,3
29	23061,19	8,7	87	29036,78	6,9
30	35596,59	5,6	88	38940,29	5,1
31	26228,14	7,6	89	22471,92	8,9
32	22185,66	9,0	90	23356,58	8,6
33	32550,97	6,1	91	27123	7,4
34	29558,32	6,8	92	41937,26	4,8
35	39811,35	5,0	93	37223,29	5,4
36	31966,88	6,3	94	27486,13	7,3

Continua...

...continuação e conclusão da tabela suplementar 1.

37	31116,23	6,4	95	26283,35	7,6
38	28137,66	7,1	96	22858,63	8,7
39	38266,86	5,2	97	37341	5,4
40	30246,21	6,6	98	37200,63	5,4
41	20128,77	9,9	99	29424,27	6,8
42	27486,14	7,3	100	38002,15	5,3
43	41996,81	4,8	101	37703,8	5,3
44	28009,03	7,1	102	40982,69	4,9
45	21001,6	9,5	103	37223,36	5,4
46	23191,32	8,6	104	31312,62	6,4
47	28611,06	7,0	105	48723,14	4,1
48	25501,32	7,8	106	32017,9	6,2
49	26671,72	7,5	107	35622,54	5,6
50	38890,23	5,1	108	47154,08	4,2
51	41587,5	4,8	109	28152,38	7,1
52	28111,73	7,1	110	49370,69	4,1
53	28637,84	7,0	111	49208,7	4,1
54	21078,05	9,5	112	41419,89	4,8
55	41957,54	4,8	113	19829,05	10,1
56	43810,7	4,6	114	31448,67	6,4
57	27114,84	7,4	115	44224,11	4,5
58	26677,71	7,5			

Tabela Suplementar 2. Análise quantitativa das proteínas presentes no plasma seminal dos *pools* do estudo 1 (análise proteômica do plasma seminal em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides), estudo 2 (análise proteômica do plasma seminal em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides), estudo 3 (análise proteômica do plasma seminal em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides) e estudo 4 (análise proteômica do plasma seminal em associação ao nível seminal de peroxidação lipídica). C – grupo controle; A – grupo alterado.

Amostra	Média (µg/mL)	Volume utilizado (50 µg de proteínas)	Amostra	Média (µg/mL)	Volume utilizado (50 µg de proteínas)
Estudo 1 - C1	25620,45	1,9	Estudo 3 - C1	28016,89	1,8
Estudo 1 - C2	24359,33	2,0	Estudo 3 - C2	28568,33	1,7
Estudo 1 - C3	27588,19	1,8	Estudo 3 - C3	27538,51	1,8
Estudo 1 - C4	27614,84	1,8	Estudo 3 - C4	25620,16	1,9
Estudo 1 - A1	27212,82	1,8	Estudo 3 - A1	34013,97	1,5
Estudo 1 - A2	26265,35	1,9	Estudo 3 - A2	26165,59	1,9
Estudo 1 - A3	30160,99	1,7	Estudo 3 - A3	31027,3	1,6
Estudo 1 - A4	30415,29	1,6	Estudo 3 - A4	28895,83	1,7
Estudo 2 - C1	28997,8	1,7	Estudo 4 - C1	28981,31	1,7
Estudo 2 - C2	26190,7	1,9	Estudo 4 - C2	28868,02	1,7
Estudo 2 - C3	25495,49	2,0	Estudo 4 - C3	31417,49	1,6
Estudo 2 - C4	25497,39	2,0	Estudo 4 - C4	26421,92	1,9
Estudo 2 - A1	28973,02	1,7	Estudo 4 - A1	44822,81	1,1
Estudo 2 - A2	28089,79	1,8	Estudo 4 - A2	41732,73	1,2
Estudo 2 - A3	27237,68	1,8	Estudo 4 - A3	37066,46	1,3
Estudo 2 - A4	25671,94	1,9	Estudo 4 - A4	36282,43	1,4

Anexo III: Dados da análise proteômica em associação à atividade mitocondrial dos espermatozoides (estudo 1).

Tabela Suplementar 3. Proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual) entre os grupos controle (alta atividade mitocondrial dos espermatozoides) e alterado (baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides) do estudo 1.

UniProt AC	Nome da Proteína	UniProt AC	Nome da Proteína
B9A064	<i>Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5</i>	P35052	<i>Glypican-1</i>
O00194	<i>Ras-related protein Rab-27B</i>	P35443	<i>Thrombospondin-4</i>
O00253	<i>Agouti-related protein</i>	P35579	<i>Myosin-9</i>
O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	P36873	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit</i>
O00339	<i>Matrilin-2</i>	P38606	<i>V-type proton ATPase catalytic subunit A</i>
O00391	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	P39900	<i>Macrophage metalloelastase</i>
O00423	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 1</i>	P40189	<i>Interleukin-6 receptor subunit beta</i>
O00462	<i>Beta-mannosidase</i>	P40925	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>
O00468	<i>Agrin</i>	P41222	<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase</i>
O00469	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	P42702	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
O00560	<i>Syntenin-1</i>	P42785	<i>Lysosomal Pro-X carboxypeptidase</i>
O00764	<i>Pyridoxal kinase</i>	P43251	<i>Biotinidase</i>
O14672	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	P43652	<i>Afamin</i>
O14773	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	P45877	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C</i>
O14786	<i>Neuropilin-1</i>	P46940	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>
O14818	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	P48637	<i>Glutathione synthetase</i>
O15230	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	P48745	<i>Protein NOV homolog</i>
O15393	<i>Transmembrane protease serine 2</i>	P49221	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4</i>
O43278	<i>Kunitz-type protease inhibitor 1</i>	P49327	<i>Fatty acid synthase</i>
O43291	<i>Kunitz-type protease inhibitor 2</i>	P49773	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>
O43451	<i>Maltase-glucoamylase, intestinal</i>	P49788	<i>Retinoic acid receptor responder protein 1</i>
O43581	<i>Synaptotagmin-7</i>	P49913	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>
O43653	<i>Prostate stem cell antigen</i>	P50395	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>
O43657	<i>Tetraspanin-6</i>	P50991	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>
O43692	<i>Peptidase inhibitor 15</i>	P50995	<i>Annexin A11</i>
O43707	<i>Alpha-actinin-4</i>	P51149	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>
O60513	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 4</i>	P51159	<i>Ras-related protein Rab-27A</i>
O60568	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3</i>	P51854	<i>Transketolase-like protein 1</i>
O60888	<i>Protein CutA</i>	P51888	<i>Prolargin</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 3.

O75110	<i>Probable phospholipid-transporting ATPase IIA</i>	P52565	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>
O75503	<i>Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5</i>	P52788	<i>Spermine synthase</i>
O75610	<i>Left-right determination factor 1</i>	P52907	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>
O75787	<i>Renin receptor</i>	P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>
O94760	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>	P53801	<i>Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein</i>
O94813	<i>Slit homolog 2 protein</i>	P54107	<i>Cysteine-rich secretory protein 1</i>
O94985	<i>Calsyntenin-1</i>	P54289	<i>Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1</i>
O95716	<i>Ras-related protein Rab-3D</i>	P54578	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>
P00338	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	P54802	<i>Alpha-N-acetylglucosaminidase</i>
P00352	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>
P00450	<i>Ceruloplasmin</i>	P55145	<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>
P00734	<i>Prothrombin</i>	P55259	<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2</i>
P00739	<i>Haptoglobin-related protein</i>	P55268	<i>Laminin subunit beta-2</i>
P00747	<i>Plasminogen</i>	P55786	<i>Puromycin-sensitive aminopeptidase</i>
P00751	<i>Complement factor B</i>	P56851	<i>Epididymal secretory protein E3-beta</i>
P00918	<i>Carbonic anhydrase 2</i>	P58499	<i>Protein FAM3B</i>
P00966	<i>Argininosuccinate synthase</i>	P60033	<i>CD81 antigen</i>
P01019	<i>Angiotensinogen</i>	P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>
P01024	<i>Complement C3</i>	P60891	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1</i>
P01034	<i>Cystatin-C</i>	P60900	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>
P01036	<i>Cystatin-S</i>	P61019	<i>Ras-related protein Rab-2A</i>
P01042	<i>Kininogen-1</i>	P61158	<i>Actin-related protein 3</i>
P01130	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>	P61626	<i>Lysozyme C</i>
P01591	<i>Immunoglobulin J chain</i>	P61769	<i>Beta-2-microglobulin</i>
P01765	<i>Ig heavy chain V-III region TIL</i>	P61916	<i>Epididymal secretory protein E1</i>
P01777	<i>Ig heavy chain V-III region TEI</i>	P62158	<i>Calmodulin</i>
P01834	<i>Ig kappa chain C region</i>	P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>
P01857	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>	P62987	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>
P01859	<i>Ig gamma-2 chain C region</i>	P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>
P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>	P68036	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3</i>
P01876	<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	P80188	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	P80723	<i>Brain acid soluble protein 1</i>
P02749	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	P84077	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
P02750	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</i>	Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>
P02753	<i>Retinol-binding protein 4</i>	Q02383	<i>Semenogelin-2</i>
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	Q02487	<i>Desmocollin-2</i>
P02766	<i>Transthyretin</i>	Q02790	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>
P02774	<i>Vitamin D-binding protein</i>	Q02809	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 3.

P02787	<i>Serotransferrin</i>	Q02818	<i>Nucleobindin-1</i>
P02790	<i>Hemopexin</i>	Q03167	<i>Transforming growth factor beta receptor type 3</i>
P03950	<i>Angiogenin</i>	Q04760	<i>Lactoylglutathione lyase</i>
P03973	<i>Antileukoproteinase</i>	Q06481	<i>Amyloid-like protein 2</i>
P04004	<i>Vitronectin</i>	Q06828	<i>Fibromodulin</i>
P04062	<i>Glucosylceramidase</i>	Q08380	<i>Galectin-3-binding protein</i>
P04066	<i>Tissue alpha-L-fucosidase</i>	Q08431	<i>Lactadherin</i>
P04075	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Q08629	<i>Testican-1</i>
P04080	<i>Cystatin-B</i>	Q08648	<i>Sperm-associated antigen 11B</i>
P04083	<i>Annexin A1</i>	Q12841	<i>Follistatin-related protein 1</i>
P04206	<i>Ig kappa chain V-III region GOL</i>	Q13162	<i>Peroxiredoxin-4</i>
P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	Q13217	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>
P04279	<i>Semenogelin-1</i>	Q13228	<i>Selenium-binding protein 1</i>
P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Q13332	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S</i>
P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>	Q13421	<i>Mesothelin</i>
P05067	<i>Amyloid beta A4 protein</i>	Q13438	<i>Protein OS-9</i>
P05090	<i>Apolipoprotein D</i>	Q13449	<i>Limbic system-associated membrane protein</i>
P05155	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	Q13510	<i>Acid ceramidase</i>
P05387	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	Q14118	<i>Dystroglycan</i>
P06280	<i>Alpha-galactosidase A</i>	Q14393	<i>Growth arrest-specific protein 6</i>
P06702	<i>Protein S100-A9</i>	Q14508	<i>WAP four-disulfide core domain protein 2</i>
P06727	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>
P06733	<i>Alpha-enolase</i>	Q15084	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>
P06744	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	Q15435	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7</i>
P06858	<i>Lipoprotein lipase</i>	Q15828	<i>Cystatin-M</i>
P06865	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	Q16610	<i>Extracellular matrix protein 1</i>
P07108	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	Q16651	<i>Prostasin</i>
P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	Q16769	<i>GlutaminyI-peptide cyclotransferase</i>
P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	Q53GD3	<i>Choline transporter-like protein 4</i>
P07339	<i>Cathepsin D</i>	Q58FF8	<i>Putative heat shock protein HSP 90-beta 2</i>
P07355	<i>Annexin A2</i>	Q5GAN3	<i>Probable inactive ribonuclease-like protein 13</i>
P07384	<i>Calpain-1 catalytic subunit</i>	Q5KU26	<i>Collectin-12</i>
P07437	<i>Tubulin beta chain</i>	Q5T5C0	<i>Syntaxin-binding protein 5</i>
P07686	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	Q5VTE0	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>
P07737	<i>Profilin-1</i>	Q66K79	<i>Carboxypeptidase Z</i>
P07858	<i>Cathepsin B</i>	Q6NT32	<i>Carboxylesterase 5A</i>
P07998	<i>Ribonuclease pancreatic</i>	Q6PCB0	<i>von Willebrand factor A domain-containing protein 1</i>
P08107	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	Q6UW15	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma</i>
P08118	<i>Beta-microseminoprotein</i>	Q6UWW0	<i>Lipocalin-15</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 3.

P08134	<i>Rho-related GTP-binding protein RhoC</i>	Q6UX06	<i>Olfactomedin-4</i>
P08195	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	Q6UX19	<i>Nephronectin</i>
P08236	<i>Beta-glucuronidase</i>	Q6UY27	<i>Prostate and testis expressed protein 2</i>
P08238	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Q6W4X9	<i>Mucin-6</i>
P08253	<i>72 kDa type IV collagenase</i>	Q6YHK3	<i>CD109 antigen</i>
P08294	<i>Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	Q7L266	<i>Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase</i>
P08473	<i>Neprilysin</i>	Q7Z4W1	<i>L-xylulose reductase</i>
P08758	<i>Annexin A5</i>	Q86UD1	<i>Out at first protein homolog</i>
P08962	<i>CD63 antigen</i>	Q86X29	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>
P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	Q8IVN8	<i>Somatomedin-B and thrombospondin type-1 domain-containing protein</i>
P09228	<i>Cystatin-SA</i>	Q8IYJ1	<i>Copine-9</i>
P09466	<i>Glycodelin</i>	Q8IZP9	<i>G-protein coupled receptor 64</i>
P09467	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	Q8N114	<i>Protein shisa-5</i>
P09668	<i>Pro-cathepsin H</i>	Q8N128	<i>Protein FAM177A1</i>
P09972	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	Q8N1N0	<i>C-type lectin domain family 4 member F</i>
P0C8F1	<i>Prostate and testis expressed protein 4</i>	Q8N335	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein</i>
P0CG06	<i>Ig lambda-3 chain C regions</i>	Q8N4F0	<i>BPI fold-containing family B member 2</i>
P10253	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i>	Q8N6Q3	<i>CD177 antigen</i>
P10586	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F</i>	Q8NCW5	<i>NAD(P)H-hydrate epimerase</i>
P10619	<i>Lysosomal protective protein</i>	Q8NEB7	<i>Acrosin-binding protein</i>
P10909	<i>Clusterin</i>	Q8NF91	<i>Nesprin-1</i>
P11021	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	Q8NFT8	<i>Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor</i>
P11047	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	Q8NFZ8	<i>Cell adhesion molecule 4</i>
P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Q8NHP8	<i>Putative phospholipase B-like 2</i>
P11279	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</i>	Q8TDL5	<i>BPI fold-containing family B member 1</i>
P11717	<i>Cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>	Q8WU90	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 15</i>
P11766	<i>Alcohol dehydrogenase class-3</i>	Q8WUM4	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>
P12273	<i>Prolactin-inducible protein</i>	Q8WVQ1	<i>Soluble calcium-activated nucleotidase 1</i>
P12277	<i>Creatine kinase B-type</i>	Q8WXA2	<i>Prostate and testis expressed protein 1</i>
P12429	<i>Annexin A3</i>	Q8WZ42	<i>Titin</i>
P12821	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>	Q92520	<i>Protein FAM3C</i>
P12830	<i>Cadherin-1</i>	Q92598	<i>Heat shock protein 105 kDa</i>
P13473	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 2</i>	Q92626	<i>Peroxidasin homolog</i>
P13639	<i>Elongation factor 2</i>	Q92692	<i>Poliovirus receptor-related protein 2</i>
P13716	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	Q92859	<i>Neogenin</i>
P13796	<i>Plastin-2</i>	Q92896	<i>Golgi apparatus protein 1</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 3.

P13861	<i>cAMP-dependent protein kinase type II- alpha regulatory subunit</i>	Q93099	<i>Homogentisate 1,2-dioxygenase</i>
P13987	<i>CD59 glycoprotein</i>	Q96BQ1	<i>Protein FAM3D</i>
P14174	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	Q96CN7	<i>Isochorismatase domain-containing protein 1</i>
P14384	<i>Carboxypeptidase M</i>	Q96CW6	<i>Probable RNA polymerase II nuclear localization protein SLC7A6OS</i>
P14550	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>	Q96DA0	<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>
P14555	<i>Phospholipase A2, membrane associated</i>	Q96EY5	<i>Multivesicular body subunit 12A</i>
P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	Q96JG6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 132</i>
P14778	<i>Interleukin-1 receptor type 1</i>	Q96K76	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47</i>
P15121	<i>Aldose reductase</i>	Q96RS0	<i>Trimethylguanosine synthase</i>
P15144	<i>Aminopeptidase N</i>	Q96S96	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 4</i>
P15259	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	Q99497	<i>Protein DJ-1</i>
P15289	<i>Arylsulfatase A</i>	Q99519	<i>Sialidase-1</i>
P15291	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 1</i>	Q99523	<i>Sortilin</i>
P15309	<i>Prostatic acid phosphatase</i>	Q99538	<i>Legumain</i>
P15311	<i>Ezrin</i>	Q99698	<i>Lysosomal-trafficking regulator</i>
P15586	<i>N-acetylglucosamine-6-sulfatase</i>	Q99715	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>
P16035	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>	Q99816	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
P16070	<i>CD44 antigen</i>	Q99828	<i>Calcium and integrin-binding protein 1</i>
P16278	<i>Beta-galactosidase</i>	Q99988	<i>Growth/differentiation factor 15</i>
P16870	<i>Carboxypeptidase E</i>	Q9BQE3	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>
P17174	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	Q9BS86	<i>Zona pellucida-binding protein 1</i>
P17936	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>	Q9BUD6	<i>Spondin-2</i>
P18065	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>	Q9BWD1	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic</i>
P18827	<i>Syndecan-1</i>	Q9BWS9	<i>Chitinase domain-containing protein 1</i>
P19440	<i>Gamma-glutamyltranspeptidase 1</i>	Q9BY14	<i>Testis-expressed sequence 101 protein</i>
P19652	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>	Q9GZV4	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-2</i>
P19801	<i>Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]</i>	Q9GZX9	<i>Twisted gastrulation protein homolog 1</i>
P20142	<i>Gastricsin</i>	Q9H0B8	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1</i>
P20151	<i>Kallikrein-2</i>	Q9H0E2	<i>Toll-interacting protein</i>
P20849	<i>Collagen alpha-1(IX) chain</i>	Q9H0U4	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>
P21399	<i>Cytoplasmic aconitate hydratase</i>	Q9H173	<i>Nucleotide exchange factor SIL1</i>
P21926	<i>CD9 antigen</i>	Q9H2U9	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7</i>
P21964	<i>Catechol O-methyltransferase</i>	Q9H336	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2</i>

Continua...

...continuação e conclusão da tabela suplementar 3.

P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	Q9H4B8	<i>Dipeptidase 3</i>
P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	Q9H4G4	<i>Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1</i>
P22692	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i>	Q9HAT2	<i>Sialate O-acetyltransferase</i>
P22732	<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5</i>	Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>
P22748	<i>Carbonic anhydrase 4</i>	Q9HC84	<i>Mucin-5B</i>
P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	Q9HCN3	<i>Transmembrane protein 8A</i>
P23528	<i>Cofilin-1</i>	Q9NPF2	<i>Carbohydrate sulfotransferase 11</i>
P24855	<i>Deoxyribonuclease-1</i>	Q9NQX5	<i>Neural proliferation differentiation and control protein 1</i>
P25311	<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	Q9NR45	<i>Sialic acid synthase</i>
P25786	<i>Proteasome subunit alpha type-1</i>	Q9NR99	<i>Matrix-remodeling-associated protein 5</i>
P26572	<i>Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i>	Q9NRW1	<i>Ras-related protein Rab-6B</i>
P27487	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	Q9P2K2	<i>Thioredoxin domain-containing protein 16</i>
P28799	<i>Granulins</i>	Q9UBI6	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12</i>
P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	Q9UBX7	<i>Kallikrein-11</i>
P28907	<i>ADP-ribosyl cyclase 1</i>	Q9UHL4	<i>Dipeptidyl peptidase 2</i>
P29374	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 4A</i>	Q9UJJ9	<i>N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma</i>
P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Q9ULH0	<i>Kinase D-interacting substrate of 220 kDa</i>
P30044	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	Q9Y2E5	<i>Epididymis-specific alpha-mannosidase</i>
P30046	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	Q9Y3R5	<i>Protein dopey-2</i>
P30086	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	Q9Y4L1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>
P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	Q9Y5X9	<i>Endothelial lipase</i>
P30711	<i>Glutathione S-transferase theta-1</i>	Q9Y5Z4	<i>Heme-binding protein 2</i>
P31949	<i>Protein S100-A11</i>	Q9Y624	<i>Junctional adhesion molecule A</i>
P32119	<i>Peroxiredoxin-2</i>	Q9Y646	<i>Carboxypeptidase Q</i>
P34059	<i>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</i>	Q9Y653	<i>G-protein coupled receptor 56</i>
P34096	<i>Ribonuclease 4</i>	Q9Y6R7	<i>IgGFc-binding protein</i>

Anexo IV: Dados da análise proteômica em associação à integridade do acrossoma dos espermatozoides (estudo 2).

Tabela Suplementar 4. Proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual) entre os grupos controle (alta integridade do acrossoma dos espermatozoides) e alterado (baixa integridade do acrossoma dos espermatozoides) do estudo 2.

UniProt AC	Nome da Proteína	UniProt AC	Nome da Proteína
O00253	<i>Agouti-related protein</i>	P37837	<i>Transaldolase</i>
O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>
O00339	<i>Matrilin-2</i>	P40189	<i>Interleukin-6 receptor subunit beta</i>
O00423	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 1</i>	P40925	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>
O00462	<i>Beta-mannosidase</i>	P42702	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
O00468	<i>Agrin</i>	P42785	<i>Lysosomal Pro-X carboxypeptidase</i>
O00560	<i>Syntenin-1</i>	P43251	<i>Biotinidase</i>
O14494	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1</i>	P45877	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C</i>
O14773	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	P46940	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>
O14786	<i>Neuropilin-1</i>	P48637	<i>Glutathione synthetase</i>
O14818	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	P48723	<i>Heat shock 70 kDa protein 13</i>
O15230	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	P48745	<i>Protein NOV homolog</i>
O15393	<i>Transmembrane protease serine 2</i>	P49189	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>
O43175	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	P49221	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4</i>
O43278	<i>Kunitz-type protease inhibitor 1</i>	P49223	<i>Kunitz-type protease inhibitor 3</i>
O43286	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 5</i>	P49327	<i>Fatty acid synthase</i>
O43291	<i>Kunitz-type protease inhibitor 2</i>	P49720	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>
O43653	<i>Prostate stem cell antigen</i>	P49773	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>
O43657	<i>Tetraspanin-6</i>	P49788	<i>Retinoic acid receptor responder protein 1</i>
O43692	<i>Peptidase inhibitor 15</i>	P49815	<i>Tuberin</i>
O60281	<i>Zinc finger protein 292</i>	P49913	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>
O60568	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3</i>	P50395	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>
O60888	<i>Protein CutA</i>	P50591	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10</i>
O75131	<i>Copine-3</i>	P50991	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>
O75368	<i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</i>	P50995	<i>Annexin A11</i>
O75503	<i>Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5</i>	P51159	<i>Ras-related protein Rab-27A</i>
O75610	<i>Left-right determination factor 1</i>	P51888	<i>Prolargin</i>
O75787	<i>Renin receptor</i>	P51993	<i>Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 6</i>
O75874	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	P52565	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>
O75882	<i>Attractin</i>	P52788	<i>Spermine synthase</i>
O94760	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>	P52907	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 4.

O94985	<i>Calsyntenin-1</i>	P53367	<i>Arfaptin-1</i>
O95359	<i>Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2</i>	P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>
P00338	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	P53634	<i>Dipeptidyl peptidase 1</i>
P00352	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	P53801	<i>Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein</i>
P00390	<i>Glutathione reductase, mitochondrial</i>	P54107	<i>Cysteine-rich secretory protein 1</i>
P00450	<i>Ceruloplasmin</i>	P54108	<i>Cysteine-rich secretory protein 3</i>
P00491	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	P54289	<i>Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1</i>
P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	P54578	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>
P00734	<i>Prothrombin</i>	P54920	<i>Alpha-soluble NSF attachment protein</i>
P00739	<i>Haptoglobin-related protein</i>	P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>
P00747	<i>Plasminogen</i>	P55259	<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2</i>
P00918	<i>Carbonic anhydrase 2</i>	P55268	<i>Laminin subunit beta-2</i>
P00966	<i>Argininosuccinate synthase</i>	P55786	<i>Puromycin-sensitive aminopeptidase</i>
P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	P56851	<i>Epididymal secretory protein E3-beta</i>
P01019	<i>Angiotensinogen</i>	P58499	<i>Protein FAM3B</i>
P01023	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	P60033	<i>CD81 antigen</i>
P01024	<i>Complement C3</i>	P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>
P01033	<i>Metalloproteinase inhibitor 1</i>	P60903	<i>Protein S100-A10</i>
P01034	<i>Cystatin-C</i>	P60953	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
P01036	<i>Cystatin-S</i>	P61006	<i>Ras-related protein Rab-8A</i>
P01037	<i>Cystatin-SN</i>	P61019	<i>Ras-related protein Rab-2A</i>
P01130	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>	P61626	<i>Lysozyme C</i>
P01765	<i>Ig heavy chain V-III region TIL</i>	P61769	<i>Beta-2-microglobulin</i>
P01777	<i>Ig heavy chain V-III region TEI</i>	P61916	<i>Epididymal secretory protein E1</i>
P01833	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	P62158	<i>Calmodulin</i>
P01834	<i>Ig kappa chain C region</i>	P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>
P01857	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>	P62805	<i>Histone H4</i>
P01859	<i>Ig gamma-2 chain C region</i>	P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>
P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>	P62987	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>
P01861	<i>Ig gamma-4 chain C region</i>	P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>
P02647	<i>Apolipoprotein A-I</i>	P68036	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3</i>
P02749	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	P68402	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta</i>
P02750	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</i>	P80303	<i>Nucleobindin-2</i>
P02751	<i>Fibronectin</i>	P80723	<i>Brain acid soluble protein 1</i>
P02766	<i>Transthyretin</i>	P84077	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
P02774	<i>Vitamin D-binding protein</i>	P98095	<i>Fibulin-2</i>
P02788	<i>Lactotransferrin</i>	Q00796	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>
P02790	<i>Hemopexin</i>	Q01459	<i>Di-N-acetylchitobiase</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 4.

P03950	<i>Angiogenin</i>	Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>
P03973	<i>Antileukoproteinase</i>	Q01638	<i>Interleukin-1 receptor-like 1</i>
P04004	<i>Vitronectin</i>	Q02383	<i>Semenogelin-2</i>
P04062	<i>Glucosylceramidase</i>	Q02790	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>
P04066	<i>Tissue alpha-L-fucosidase</i>	Q02809	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5- dioxygenase 1</i>
P04075	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Q02818	<i>Nucleobindin-1</i>
P04080	<i>Cystatin-B</i>	Q04609	<i>Glutamate carboxypeptidase 2</i>
P04206	<i>Ig kappa chain V-III region GOL</i>	Q04760	<i>Lactoylglutathione lyase</i>
P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	Q06828	<i>Fibromodulin</i>
P04279	<i>Semenogelin-1</i>	Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>
P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Q075Z2	<i>Binder of sperm protein homolog 1</i>
P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>	Q07654	<i>Trefoil factor 3</i>
P05067	<i>Amyloid beta A4 protein</i>	Q08380	<i>Galectin-3-binding protein</i>
P05154	<i>Plasma serine protease inhibitor</i>	Q08431	<i>Lactadherin</i>
P06280	<i>Alpha-galactosidase A</i>	Q08629	<i>Testican-1</i>
P06702	<i>Protein S100-A9</i>	Q09328	<i>Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6- beta-N-acetylglucosaminyltransferase A</i>
P06727	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	Q12841	<i>Follistatin-related protein 1</i>
P06733	<i>Alpha-enolase</i>	Q13093	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase</i>
P06744	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	Q13162	<i>Peroxiredoxin-4</i>
P06858	<i>Lipoprotein lipase</i>	Q13217	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>
P06865	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	Q13228	<i>Selenium-binding protein 1</i>
P07108	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	Q13332	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S</i>
P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	Q13438	<i>Protein OS-9</i>
P07205	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	Q13449	<i>Limbic system-associated membrane protein</i>
P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	Q13510	<i>Acid ceramidase</i>
P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	Q14118	<i>Dystroglycan</i>
P07339	<i>Cathepsin D</i>	Q14393	<i>Growth arrest-specific protein 6</i>
P07355	<i>Annexin A2</i>	Q14507	<i>Epididymal secretory protein E3-alpha</i>
P07602	<i>Prosaposin</i>	Q14508	<i>WAP four-disulfide core domain protein 2</i>
P07686	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	Q14515	<i>SPARC-like protein 1</i>
P07711	<i>Cathepsin L1</i>	Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>
P07737	<i>Profilin-1</i>	Q15084	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>
P07858	<i>Cathepsin B</i>	Q16610	<i>Extracellular matrix protein 1</i>
P07864	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	Q16651	<i>Prostasin</i>
P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	Q16769	<i>GlutaminyI-peptide cyclotransferase</i>
P07998	<i>Ribonuclease pancreatic</i>	Q53GD3	<i>Choline transporter-like protein 4</i>
P08107	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	Q53H76	<i>Phospholipase A1 member A</i>
P08118	<i>Beta-microseminoprotein</i>	Q58FF8	<i>Putative heat shock protein HSP 90- beta 2</i>
P08134	<i>Rho-related GTP-binding protein RhoC</i>	Q5KU26	<i>Collectin-12</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 4.

P08195	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	Q5SNT6	<i>WASH complex subunit FAM21B</i>
P08236	<i>Beta-glucuronidase</i>	Q5VTE0	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>
P08238	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Q66K79	<i>Carboxypeptidase Z</i>
P08294	<i>Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	Q687X5	<i>Metalloreductase STEAP4</i>
P08571	<i>Monocyte differentiation antigen CD14</i>	Q6BCY4	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 2</i>
P08697	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	Q6NT32	<i>Carboxylesterase 5A</i>
P08758	<i>Annexin A5</i>	Q6PCB0	<i>von Willebrand factor A domain-containing protein 1</i>
P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	Q6UWW0	<i>Lipocalin-15</i>
P09228	<i>Cystatin-SA</i>	Q6UX06	<i>Olfactomedin-4</i>
P09466	<i>Glycodelin</i>	Q6UY27	<i>Prostate and testis expressed protein 2</i>
P09467	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	Q6W4X9	<i>Mucin-6</i>
P09972	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	Q6YHK3	<i>CD109 antigen</i>
P0C8F1	<i>Prostate and testis expressed protein 4</i>	Q7L266	<i>Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase</i>
P0CG06	<i>Ig lambda-3 chain C regions</i>	Q7Z4W1	<i>L-xylulose reductase</i>
P10253	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i>	Q86UD1	<i>Out at first protein homolog</i>
P10586	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F</i>	Q86X29	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>
P10599	<i>Thioredoxin</i>	Q8IVN8	<i>Somatomedin-B and thrombospondin type-1 domain-containing protein</i>
P10909	<i>Clusterin</i>	Q8IYJ3	<i>Synaptotagmin-like protein 1</i>
P11021	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	Q8IZ41	<i>Ras and EF-hand domain-containing protein</i>
P11047	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	Q8IZJ3	<i>C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8</i>
P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Q8IZP9	<i>G-protein coupled receptor 64</i>
P11717	<i>Cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>	Q8N114	<i>Protein shisa-5</i>
P11766	<i>Alcohol dehydrogenase class-3</i>	Q8N4F0	<i>BPI fold-containing family B member 2</i>
P12109	<i>Collagen alpha-1(VI) chain</i>	Q8NCW5	<i>NAD(P)H-hydrate epimerase</i>
P12273	<i>Prolactin-inducible protein</i>	Q8NF91	<i>Nesprin-1</i>
P12277	<i>Creatine kinase B-type</i>	Q8NFT2	<i>Metalloreductase STEAP2</i>
P12814	<i>Alpha-actinin-1</i>	Q8NfZ8	<i>Cell adhesion molecule 4</i>
P12821	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>	Q8NHP8	<i>Putative phospholipase B-like 2</i>
P12830	<i>Cadherin-1</i>	Q8TDL5	<i>BPI fold-containing family B member 1</i>
P13639	<i>Elongation factor 2</i>	Q8WVQ1	<i>Soluble calcium-activated nucleotidase 1</i>
P13686	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase type 5</i>	Q8WXA2	<i>Prostate and testis expressed protein 1</i>
P13716	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	Q8WZ42	<i>Titin</i>
P13861	<i>cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit</i>	Q92484	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a</i>
P13987	<i>CD59 glycoprotein</i>	Q92485	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b</i>
P14174	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	Q92598	<i>Heat shock protein 105 kDa</i>
P14209	<i>CD99 antigen</i>	Q92626	<i>Peroxidasin homolog</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 4.

P14384	<i>Carboxypeptidase M</i>	Q92692	<i>Poliovirus receptor-related protein 2</i>
P14555	<i>Phospholipase A2, membrane associated</i>	Q92859	<i>Neogenin</i>
P14625	<i>Endoplasmic</i>	Q92896	<i>Golgi apparatus protein 1</i>
P15121	<i>Aldose reductase</i>	Q96A08	<i>Histone H2B type 1-A</i>
P15144	<i>Aminopeptidase N</i>	Q96BH3	<i>Epididymal sperm-binding protein 1</i>
P15259	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	Q96BQ1	<i>Protein FAM3D</i>
P15289	<i>Arylsulfatase A</i>	Q96CN7	<i>Isochorismatase domain-containing protein 1</i>
P15291	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 1</i>	Q96DA0	<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>
P15309	<i>Prostatic acid phosphatase</i>	Q96GW7	<i>Brevican core protein</i>
P15311	<i>Ezrin</i>	Q96JG6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 132</i>
P15586	<i>N-acetylglucosamine-6-sulfatase</i>	Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>
P15907	<i>Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1</i>	Q96LR9	<i>Apolipoprotein L domain-containing protein 1</i>
P16035	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>	Q96S96	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 4</i>
P16070	<i>CD44 antigen</i>	Q99497	<i>Protein DJ-1</i>
P16278	<i>Beta-galactosidase</i>	Q99519	<i>Sialidase-1</i>
P16870	<i>Carboxypeptidase E</i>	Q99715	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>
P17174	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	Q99816	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
P17405	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase</i>	Q99878	<i>Histone H2A type 1-J</i>
P17931	<i>Galectin-3</i>	Q99985	<i>Semaphorin-3C</i>
P17936	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>	Q99988	<i>Growth/differentiation factor 15</i>
P18065	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>	Q9BTY2	<i>Plasma alpha-L-fucosidase</i>
P18827	<i>Syndecan-1</i>	Q9BUD6	<i>Spondin-2</i>
P19440	<i>Gamma-glutamyltranspeptidase 1</i>	Q9BWD1	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic</i>
P19801	<i>Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]</i>	Q9BWS9	<i>Chitinase domain-containing protein 1</i>
P19835	<i>Bile salt-activated lipase</i>	Q9BY14	<i>Testis-expressed sequence 101 protein</i>
P20062	<i>Transcobalamin-2</i>	Q9BZQ8	<i>Protein Niban</i>
P20073	<i>Annexin A7</i>	Q9GZV4	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-2</i>
P20142	<i>Gastricsin</i>	Q9H0B8	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1</i>
P20151	<i>Kallikrein-2</i>	Q9H0U4	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>
P20336	<i>Ras-related protein Rab-3A</i>	Q9H0W9	<i>Ester hydrolase C11orf54</i>
P20827	<i>Ephrin-A1</i>	Q9H173	<i>Nucleotide exchange factor SIL1</i>
P21399	<i>Cytoplasmic aconitate hydratase</i>	Q9H1M3	<i>Beta-defensin 129</i>
P21810	<i>Biglycan</i>	Q9H239	<i>Matrix metalloproteinase-28</i>
P21926	<i>CD9 antigen</i>	Q9H2U9	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7</i>
P22304	<i>Iduronate 2-sulfatase</i>	Q9H336	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2</i>

Continua...

...continuação e conclusão da tabela suplementar 4.

P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	Q9H3G5	<i>Probable serine carboxypeptidase CPVL</i>
P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	Q9H3S3	<i>Transmembrane protease serine 5</i>
P22692	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i>	Q9H4G4	<i>Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1</i>
P22732	<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5</i>	Q9HAT2	<i>Sialate O-acetyltransferase</i>
P22748	<i>Carbonic anhydrase 4</i>	Q9HB40	<i>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</i>
P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	Q9HC84	<i>Mucin-5B</i>
P23381	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	Q9NPF2	<i>Carbohydrate sulfotransferase 11</i>
P23528	<i>Cofilin-1</i>	Q9NQ79	<i>Cartilage acidic protein 1</i>
P24593	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i>	Q9NQX5	<i>Neural proliferation differentiation and control protein 1</i>
P24855	<i>Deoxyribonuclease-1</i>	Q9NR45	<i>Sialic acid synthase</i>
P25311	<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	Q9NR99	<i>Matrix-remodeling-associated protein 5</i>
P25787	<i>Proteasome subunit alpha type-2</i>	Q9NRW1	<i>Ras-related protein Rab-6B</i>
P26572	<i>Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i>	Q9P2K2	<i>Thioredoxin domain-containing protein 16</i>
P28066	<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	Q9UBX1	<i>Cathepsin F</i>
P28907	<i>ADP-ribosyl cyclase 1</i>	Q9UBX7	<i>Kallikrein-11</i>
P29374	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 4A</i>	Q9UHC6	<i>Contactin-associated protein-like 2</i>
P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Q9UHI8	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>
P30044	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	Q9UHL4	<i>Dipeptidyl peptidase 2</i>
P30046	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	Q9UL36	<i>Zinc finger protein 236</i>
P30086	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	Q9ULH0	<i>Kinase D-interacting substrate of 220 kDa</i>
P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	Q9UNW1	<i>Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1</i>
P30711	<i>Glutathione S-transferase theta-1</i>	Q9Y2E5	<i>Epididymis-specific alpha-mannosidase</i>
P31025	<i>Lipocalin-1</i>	Q9Y3R5	<i>Protein dopey-2</i>
P31949	<i>Protein S100-A11</i>	Q9Y4L1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>
P32119	<i>Peroxiredoxin-2</i>	Q9Y5X9	<i>Endothelial lipase</i>
P34096	<i>Ribonuclease 4</i>	Q9Y5Z4	<i>Heme-binding protein 2</i>
P35052	<i>Glypican-1</i>	Q9Y624	<i>Junctional adhesion molecule A</i>
P35443	<i>Thrombospondin-4</i>	Q9Y653	<i>G-protein coupled receptor 56</i>
P35579	<i>Myosin-9</i>	Q9Y6R7	<i>IgGFc-binding protein</i>
P35998	<i>26S protease regulatory subunit 7</i>		

Anexo V: Dados da análise proteômica em associação à fragmentação do DNA dos espermatozoides (estudo 3).

Tabela Suplementar 5. Proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual) entre os grupos controle (baixa fragmentação do DNA dos espermatozoides) e alterado (alta fragmentação do DNA dos espermatozoides) do estudo 3.

UniProt AC	Nome da Proteína	UniProt AC	Nome da Proteína
B9A064	<i>Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5</i>	P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>
O00194	<i>Ras-related protein Rab-27B</i>	P30711	<i>Glutathione S-transferase theta-1</i>
O00253	<i>Agouti-related protein</i>	P31025	<i>Lipocalin-1</i>
O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	P31949	<i>Protein S100-A11</i>
O00339	<i>Matrilin-2</i>	P34059	<i>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</i>
O00391	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	P35475	<i>Alpha-L-iduronidase</i>
O00462	<i>Beta-mannosidase</i>	P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>
O00468	<i>Agrin</i>	P42702	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
O00560	<i>Syntenin-1</i>	P42785	<i>Lysosomal Pro-X carboxypeptidase</i>
O00584	<i>Ribonuclease T2</i>	P45877	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C</i>
O14494	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1</i>	P48637	<i>Glutathione synthetase</i>
O14773	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	P48723	<i>Heat shock 70 kDa protein 13</i>
O14818	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	P48745	<i>Protein NOV homolog</i>
O15393	<i>Transmembrane protease serine 2</i>	P49223	<i>Kunitz-type protease inhibitor 3</i>
O43175	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	P49773	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>
O43278	<i>Kunitz-type protease inhibitor 1</i>	P49815	<i>Tuberin</i>
O43286	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 5</i>	P49913	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>
O43291	<i>Kunitz-type protease inhibitor 2</i>	P50395	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>
O43451	<i>Maltase-glucoamylase, intestinal</i>	P50995	<i>Annexin A11</i>
O43657	<i>Tetraspanin-6</i>	P51159	<i>Ras-related protein Rab-27A</i>
O43692	<i>Peptidase inhibitor 15</i>	P51993	<i>Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 6</i>
O43854	<i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>	P52565	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>
O60568	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3</i>	P52788	<i>Spermine synthase</i>
O60635	<i>Tetraspanin-1</i>	P52907	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>
O60888	<i>Protein CutA</i>	P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>
O75131	<i>Copine-3</i>	P53634	<i>Dipeptidyl peptidase 1</i>
O75503	<i>Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5</i>	P54108	<i>Cysteine-rich secretory protein 3</i>
O75610	<i>Left-right determination factor 1</i>	P54289	<i>Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1</i>
O75629	<i>Protein CREG1</i>	P55259	<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2</i>
O75787	<i>Renin receptor</i>	P55268	<i>Laminin subunit beta-2</i>
O75882	<i>Attractin</i>	P55786	<i>Puromycin-sensitive aminopeptidase</i>
O94985	<i>Calsyntenin-1</i>	P56851	<i>Epididymal secretory protein E3-beta</i>

Continua...

...continuação da tabela complementar 5.

O95359	<i>Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2</i>	P58499	<i>Protein FAM3B</i>
P00352	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	P60033	<i>CD81 antigen</i>
P00390	<i>Glutathione reductase, mitochondrial</i>	P60891	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1</i>
P00441	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	P60900	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>
P00450	<i>Ceruloplasmin</i>	P60953	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
P00491	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	P61019	<i>Ras-related protein Rab-2A</i>
P00739	<i>Haptoglobin-related protein</i>	P61158	<i>Actin-related protein 3</i>
P00751	<i>Complement factor B</i>	P61626	<i>Lysozyme C</i>
P00918	<i>Carbonic anhydrase 2</i>	P61769	<i>Beta-2-microglobulin</i>
P01023	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	P61916	<i>Epididymal secretory protein E1</i>
P01024	<i>Complement C3</i>	P62158	<i>Calmodulin</i>
P01034	<i>Cystatin-C</i>	P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>
P01036	<i>Cystatin-S</i>	P62805	<i>Histone H4</i>
P01037	<i>Cystatin-SN</i>	P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>
P01591	<i>Immunoglobulin J chain</i>	P68036	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3</i>
P01714	<i>Ig lambda chain V-III region SH</i>	P80188	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
P01765	<i>Ig heavy chain V-III region TIL</i>	P80303	<i>Nucleobindin-2</i>
P01777	<i>Ig heavy chain V-III region TEI</i>	P84077	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
P01833	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>
P01834	<i>Ig kappa chain C region</i>	Q00796	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>
P01857	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>	Q01459	<i>Di-N-acetylchitobiase</i>
P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>	Q01638	<i>Interleukin-1 receptor-like 1</i>
P01861	<i>Ig gamma-4 chain C region</i>	Q02790	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>
P01876	<i>Ig alpha-1 chain C region</i>	Q02809	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	Q02818	<i>Nucleobindin-1</i>
P02749	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	Q03167	<i>Transforming growth factor beta receptor type 3</i>
P02750	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</i>	Q04760	<i>Lactoylglycine lyase</i>
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	Q075Z2	<i>Binder of sperm protein homolog 1</i>
P02766	<i>Transthyretin</i>	Q08380	<i>Galectin-3-binding protein</i>
P02774	<i>Vitamin D-binding protein</i>	Q08431	<i>Lactadherin</i>
P02787	<i>Serotransferrin</i>	Q08648	<i>Sperm-associated antigen 11B</i>
P02788	<i>Lactotransferrin</i>	Q09328	<i>Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A</i>
P02790	<i>Hemopexin</i>	Q13162	<i>Peroxiredoxin-4</i>
P03950	<i>Angiogenin</i>	Q13217	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>
P03973	<i>Antileukoprotease</i>	Q13277	<i>Syntaxin-3</i>
P04062	<i>Glucosylceramidase</i>	Q13438	<i>Protein OS-9</i>
P04066	<i>Tissue alpha-L-fucosidase</i>	Q13449	<i>Limbic system-associated membrane protein</i>
P04080	<i>Cystatin-B</i>	Q13510	<i>Acid ceramidase</i>
P04206	<i>Ig kappa chain V-III region GOL</i>	Q14507	<i>Epididymal secretory protein E3-alpha</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 5.

P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>
P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Q15084	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>
P05067	<i>Amyloid beta A4 protein</i>	Q15435	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7</i>
P05090	<i>Apolipoprotein D</i>	Q15828	<i>Cystatin-M</i>
P05154	<i>Plasma serine protease inhibitor</i>	Q16610	<i>Extracellular matrix protein 1</i>
P05155	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	Q16651	<i>Prostasin</i>
P06280	<i>Alpha-galactosidase A</i>	Q16769	<i>Glutaminy-peptide cyclotransferase</i>
P06727	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	Q16851	<i>UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i>
P06733	<i>Alpha-enolase</i>	Q1ED39	<i>Lysine-rich nucleolar protein 1</i>
P06865	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	Q53H76	<i>Phospholipase A1 member A</i>
P07205	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	Q58FF8	<i>Putative heat shock protein HSP 90-beta 2</i>
P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	Q5GAN3	<i>Probable inactive ribonuclease-like protein 13</i>
P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	Q5SNT6	<i>WASH complex subunit FAM21B</i>
P07339	<i>Cathepsin D</i>	Q5T5C0	<i>Syntaxin-binding protein 5</i>
P07437	<i>Tubulin beta chain</i>	Q66K79	<i>Carboxypeptidase Z</i>
P07602	<i>Prosaposin</i>	Q6BCY4	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 2</i>
P07711	<i>Cathepsin L1</i>	Q6UW15	<i>Regenerating islet-derived protein 3-gamma</i>
P07737	<i>Profilin-1</i>	Q6UWW0	<i>Lipocalin-15</i>
P07858	<i>Cathepsin B</i>	Q6UY27	<i>Prostate and testis expressed protein 2</i>
P07864	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	Q6YHK3	<i>CD109 antigen</i>
P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	Q7Z304	<i>MAM domain-containing protein 2</i>
P07998	<i>Ribonuclease pancreatic</i>	Q7Z4W1	<i>L-xylulose reductase</i>
P08107	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	Q86UD1	<i>Out at first protein homolog</i>
P08134	<i>Rho-related GTP-binding protein RhoC</i>	Q86X29	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>
P08195	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	Q8IVN8	<i>Somatomedin-B and thrombospondin type-1 domain-containing protein</i>
P08236	<i>Beta-glucuronidase</i>	Q8IZJ3	<i>C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8</i>
P08238	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Q8N114	<i>Protein shisa-5</i>
P08294	<i>Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	Q8N335	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein</i>
P08571	<i>Monocyte differentiation antigen CD14</i>	Q8N3S3	<i>Putative homeodomain transcription factor 2</i>
P08697	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	Q8N4F0	<i>BPI fold-containing family B member 2</i>
P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	Q8NEB7	<i>Acrosin-binding protein</i>
P09228	<i>Cystatin-SA</i>	Q8NFZ8	<i>Cell adhesion molecule 4</i>
P09525	<i>Annexin A4</i>	Q8NHP8	<i>Putative phospholipase B-like 2</i>
P0C0L5	<i>Complement C4-B</i>	Q8WU90	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 15</i>
P0C8F1	<i>Prostate and testis expressed protein 4</i>	Q8WVQ1	<i>Soluble calcium-activated nucleotidase 1</i>
P0CG06	<i>Ig lambda-3 chain C regions</i>	Q8WXA2	<i>Prostate and testis expressed protein 1</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 5.

P10253	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i>	Q92484	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a</i>
P10323	<i>Acrosin</i>	Q92598	<i>Heat shock protein 105 kDa</i>
P10586	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F</i>	Q92692	<i>Poliovirus receptor-related protein 2</i>
P10619	<i>Lysosomal protective protein</i>	Q92820	<i>Gamma-glutamyl hydrolase</i>
P10909	<i>Clusterin</i>	Q92859	<i>Neogenin</i>
P11021	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	Q93091	<i>Ribonuclease K6</i>
P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Q96BH3	<i>Epididymal sperm-binding protein 1</i>
P11717	<i>Cation-independent mannose-6-phosphate receptor</i>	Q96BQ1	<i>Protein FAM3D</i>
P11766	<i>Alcohol dehydrogenase class-3</i>	Q96DA0	<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>
P12273	<i>Prolactin-inducible protein</i>	Q96GW7	<i>Brevican core protein</i>
P12830	<i>Cadherin-1</i>	Q96JG6	<i>Coiled-coil domain-containing protein 132</i>
P13473	<i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 2</i>	Q96K76	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47</i>
P13716	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>
P13796	<i>Plastin-2</i>	Q96LR9	<i>Apolipoprotein L domain-containing protein 1</i>
P13861	<i>cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit</i>	Q96RS0	<i>Trimethylguanosine synthase</i>
P13987	<i>CD59 glycoprotein</i>	Q96S96	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 4</i>
P14174	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	Q99497	<i>Protein DJ-1</i>
P14384	<i>Carboxypeptidase M</i>	Q99519	<i>Sialidase-1</i>
P14555	<i>Phospholipase A2, membrane associated</i>	Q99816	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
P14625	<i>Endoplasmin</i>	Q99878	<i>Histone H2A type 1-J</i>
P15121	<i>Aldose reductase</i>	Q99880	<i>Histone H2B type 1-L</i>
P15259	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	Q99988	<i>Growth/differentiation factor 15</i>
P15291	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 1</i>	Q9BQE3	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>
P16035	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>	Q9BS26	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 44</i>
P16278	<i>Beta-galactosidase</i>	Q9BTY2	<i>Plasma alpha-L-fucosidase</i>
P17174	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	Q9BUD6	<i>Spondin-2</i>
P17405	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase</i>	Q9BWD1	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic</i>
P17900	<i>Ganglioside GM2 activator</i>	Q9BWS9	<i>Chitinase domain-containing protein 1</i>
P17931	<i>Galectin-3</i>	Q9GZN4	<i>Brain-specific serine protease 4</i>
P18065	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>	Q9GZV4	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-2</i>
P18827	<i>Syndecan-1</i>	Q9H173	<i>Nucleotide exchange factor SIL1</i>
P19021	<i>Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase</i>	Q9H239	<i>Matrix metalloproteinase-28</i>
P19440	<i>Gamma-glutamyltranspeptidase 1</i>	Q9H3G5	<i>Probable serine carboxypeptidase CPVL</i>
P19652	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>	Q9H4B8	<i>Dipeptidase 3</i>
P19801	<i>Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]</i>	Q9H4G4	<i>Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1</i>

Continua...

...continuação e conclusão da tabela complementar 5.

P20062	<i>Transcobalamin-2</i>	Q9HB40	<i>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</i>
P20336	<i>Ras-related protein Rab-3A</i>	Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>
P20337	<i>Ras-related protein Rab-3B</i>	Q9HC84	<i>Mucin-5B</i>
P20827	<i>Ephrin-A1</i>	Q9HCN3	<i>Transmembrane protein 8A</i>
P21246	<i>Pleiotrophin</i>	Q9NPF2	<i>Carbohydrate sulfotransferase 11</i>
P21810	<i>Biglycan</i>	Q9NQ79	<i>Cartilage acidic protein 1</i>
P21926	<i>CD9 antigen</i>	Q9NQX5	<i>Neural proliferation differentiation and control protein 1</i>
P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	Q9NR99	<i>Matrix-remodeling-associated protein 5</i>
P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	Q9NRW1	<i>Ras-related protein Rab-6B</i>
P22692	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i>	Q9P2K2	<i>Thioredoxin domain-containing protein 16</i>
P22732	<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5</i>	Q9UBI6	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12</i>
P22748	<i>Carbonic anhydrase 4</i>	Q9UBR2	<i>Cathepsin Z</i>
P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	Q9UBX1	<i>Cathepsin F</i>
P23381	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	Q9UBX7	<i>Kallikrein-11</i>
P23528	<i>Cofilin-1</i>	Q9UHC6	<i>Contactin-associated protein-like 2</i>
P24593	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i>	Q9UHL4	<i>Dipeptidyl peptidase 2</i>
P25786	<i>Proteasome subunit alpha type-1</i>	Q9UJJ9	<i>N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma</i>
P25787	<i>Proteasome subunit alpha type-2</i>	Q9ULH0	<i>Kinase D-interacting substrate of 220 kDa</i>
P28799	<i>Granulins</i>	Q9UNW1	<i>Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1</i>
P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	Q9Y4L1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>
P28907	<i>ADP-ribosyl cyclase 1</i>	Q9Y646	<i>Carboxypeptidase Q</i>
P29374	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 4A</i>	Q9Y653	<i>G-protein coupled receptor 56</i>
P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Q9Y6R7	<i>IgGFc-binding protein</i>

Anexo VI: Dados da análise proteômica em associação ao nível de peroxidação lipídica do plasma seminal (estudo 4).

Tabela Suplementar 6. Proteínas conservadas (com expressão estatisticamente igual) entre os grupos controle (baixo nível seminal de peroxidação lipídica) e alterado (alto nível seminal de peroxidação lipídica) do estudo 4.

UniProt AC	Nome da Proteína	UniProt AC	Nome da Proteína
B3GLJ2	<i>Prostate and testis expressed protein 3</i>	P35052	<i>Glypican-1</i>
K7EJ46	<i>Small integral membrane protein 22</i>	P35443	<i>Thrombospondin-4</i>
O00115	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	P35579	<i>Myosin-9</i>
O00194	<i>Ras-related protein Rab-27B</i>	P35625	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>
O00253	<i>Agouti-related protein</i>	P36871	<i>Phosphoglucomutase-1</i>
O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	P36873	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit</i>
O00339	<i>Matrilin-2</i>	P36955	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
O00391	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	P38571	<i>Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase</i>
O00462	<i>Beta-mannosidase</i>	P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>
O00468	<i>Agrin</i>	P40189	<i>Interleukin-6 receptor subunit beta</i>
O00469	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	P40925	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>
O00560	<i>Syntenin-1</i>	P41222	<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase</i>
O00584	<i>Ribonuclease T2</i>	P41271	<i>Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1</i>
O00754	<i>Lysosomal alpha-mannosidase</i>	P42702	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
O14494	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1</i>	P42785	<i>Lysosomal Pro-X carboxypeptidase</i>
O14578	<i>Citron Rho-interacting kinase</i>	P43234	<i>Cathepsin O</i>
O14657	<i>Torsin-1B</i>	P43251	<i>Biotinidase</i>
O14672	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	P43490	<i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>
O14773	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	P43652	<i>Afamin</i>
O14786	<i>Neuropilin-1</i>	P45877	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C</i>
O14818	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	P46940	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>
O15230	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	P47755	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-2</i>
O15393	<i>Transmembrane protease serine 2</i>	P47895	<i>Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3</i>
O43175	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	P48307	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>
O43278	<i>Kunitz-type protease inhibitor 1</i>	P48637	<i>Glutathione synthetase</i>
O43286	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 5</i>	P48643	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>
O43291	<i>Kunitz-type protease inhibitor 2</i>	P48723	<i>Heat shock 70 kDa protein 13</i>
O43451	<i>Maltase-glucoamylase, intestinal</i>	P48745	<i>Protein NOV homolog</i>
O43493	<i>Trans-Golgi network integral membrane protein 2</i>	P49189	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>
O43505	<i>N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase</i>	P49221	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4</i>
O43581	<i>Synaptotagmin-7</i>	P49223	<i>Kunitz-type protease inhibitor 3</i>

Continua...

...continuação da tabela complementar 6.

O43653	<i>Prostate stem cell antigen</i>	P49327	<i>Fatty acid synthase</i>
O43657	<i>Tetraspanin-6</i>	P49419	<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase</i>
O43707	<i>Alpha-actinin-4</i>	P49720	<i>Proteasome subunit beta type-3</i>
O43854	<i>EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3</i>	P49721	<i>Proteasome subunit beta type-2</i>
O60513	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 4</i>	P49763	<i>Placenta growth factor</i>
O60568	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3</i>	P49788	<i>Retinoic acid receptor responder protein 1</i>
O60701	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>	P49908	<i>Selenoprotein P</i>
O75223	<i>Gamma-glutamylcyclotransferase</i>	P49913	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>
O75340	<i>Programmed cell death protein 6</i>	P50395	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>
O75368	<i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich like protein</i>	P50895	<i>Basal cell adhesion molecule</i>
O75487	<i>Glypican-4</i>	P50897	<i>Palmitoyl-protein thioesterase 1</i>
O75503	<i>Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5</i>	P50995	<i>Annexin A11</i>
O75556	<i>Mammaglobin-B</i>	P51149	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>
O75629	<i>Protein CREG1</i>	P51159	<i>Ras-related protein Rab-27A</i>
O75787	<i>Renin receptor</i>	P51884	<i>Lumican</i>
O75874	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	P52209	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>
O75882	<i>Attractin</i>	P52565	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>
O75923	<i>Dysferlin</i>	P52788	<i>Spermine synthase</i>
O94760	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>	P52907	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>
O94766	<i>Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 3</i>	P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>
O94813	<i>Slit homolog 2 protein</i>	P53634	<i>Dipeptidyl peptidase 1</i>
O94985	<i>Calsyntenin-1</i>	P53801	<i>Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein</i>
O95274	<i>Ly6/PLAUR domain-containing protein 3</i>	P54108	<i>Cysteine-rich secretory protein 3</i>
O95460	<i>Matrilin-4</i>	P54652	<i>Heat shock-related 70 kDa protein 2</i>
O95716	<i>Ras-related protein Rab-3D</i>	P54802	<i>Alpha-N-acetylglucosaminidase</i>
P00338	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	P55058	<i>Phospholipid transfer protein</i>
P00352	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>	P55268	<i>Laminin subunit beta-2</i>
P00390	<i>Glutathione reductase, mitochondrial</i>	P55786	<i>Puromycin-sensitive aminopeptidase</i>
P00450	<i>Ceruloplasmin</i>	P56851	<i>Epididymal secretory protein E3-beta</i>
P00491	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	P58499	<i>Protein FAM3B</i>
P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	P59666	<i>Neutrophil defensin 3</i>
P00738	<i>Haptoglobin</i>	P60033	<i>CD81 antigen</i>
P00747	<i>Plasminogen</i>	P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>
P00750	<i>Tissue-type plasminogen activator</i>	P60900	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>
P00751	<i>Complement factor B</i>	P60953	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
P01008	<i>Antithrombin-III</i>	P61019	<i>Ras-related protein Rab-2A</i>
P01019	<i>Angiotensinogen</i>	P61026	<i>Ras-related protein Rab-10</i>
P01023	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	P61158	<i>Actin-related protein 3</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 6.

P01024	<i>Complement C3</i>	P61457	<i>Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase</i>
P01033	<i>Metalloproteinase inhibitor 1</i>	P61586	<i>Transforming protein RhoA</i>
P01034	<i>Cystatin-C</i>	P61769	<i>Beta-2-microglobulin</i>
P01036	<i>Cystatin-S</i>	P61916	<i>Epididymal secretory protein E1</i>
P01042	<i>Kininogen-1</i>	P61970	<i>Nuclear transport factor 2</i>
P01130	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>	P61981	<i>14-3-3 protein gamma</i>
P01303	<i>Pro-neuropeptide Y</i>	P62158	<i>Calmodulin</i>
P01591	<i>Immunoglobulin J chain</i>	P62805	<i>Histone H4</i>
P01861	<i>Ig gamma-4 chain C region</i>	P62834	<i>Ras-related protein Rap-1A</i>
P01877	<i>Ig alpha-2 chain C region</i>	P62942	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A</i>
P02652	<i>Apolipoprotein A-II</i>	P62987	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>
P02743	<i>Serum amyloid P-component</i>	P63000	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
P02749	<i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>
P02750	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</i>	P63261	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>
P02751	<i>Fibronectin</i>	P68036	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3</i>
P02760	<i>Protein AMBP</i>	P68133	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>
P02763	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	P68371	<i>Tubulin beta-4B chain</i>
P02765	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	P80188	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
P02766	<i>Transthyretin</i>	P80303	<i>Nucleobindin-2</i>
P02774	<i>Vitamin D-binding protein</i>	P80723	<i>Brain acid soluble protein 1</i>
P02788	<i>Lactotransferrin</i>	P84243	<i>Histone H3.3</i>
P02790	<i>Hemopexin</i>	P98095	<i>Fibulin-2</i>
P03950	<i>Angiogenin</i>	Q00169	<i>Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform</i>
P03973	<i>Antileukoproteinase</i>	Q00796	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>
P04004	<i>Vitronectin</i>	Q01459	<i>Di-N-acetylchitobiase</i>
P04066	<i>Tissue alpha-L-fucosidase</i>	Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>
P04075	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	Q01638	<i>Interleukin-1 receptor-like 1</i>
P04080	<i>Cystatin-B</i>	Q02383	<i>Semenogelin-2</i>
P04083	<i>Annexin A1</i>	Q02487	<i>Desmocollin-2</i>
P04085	<i>Platelet-derived growth factor subunit A</i>	Q02790	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>
P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	Q02809	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>
P04279	<i>Semenogelin-1</i>	Q02818	<i>Nucleobindin-1</i>
P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Q03167	<i>Transforming growth factor beta receptor type 3</i>
P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>	Q04609	<i>Glutamate carboxypeptidase 2</i>
P05060	<i>Secretogranin-1</i>	Q04760	<i>Lactoylglutathione lyase</i>
P05067	<i>Amyloid beta A4 protein</i>	Q06481	<i>Amyloid-like protein 2</i>
P05090	<i>Apolipoprotein D</i>	Q06828	<i>Fibromodulin</i>
P05109	<i>Protein S100-A8</i>	Q075Z2	<i>Binder of sperm protein homolog 1</i>
P05154	<i>Plasma serine protease inhibitor</i>	Q08345	<i>Epithelial discoidin domain-containing receptor 1</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 6.

P05155	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	Q08380	<i>Galectin-3-binding protein</i>
P05156	<i>Complement factor I</i>	Q12805	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>
P06280	<i>Alpha-galactosidase A</i>	Q13162	<i>Peroxiredoxin-4</i>
P06733	<i>Alpha-enolase</i>	Q13217	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>
P06744	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	Q13232	<i>Nucleoside diphosphate kinase 3</i>
P07108	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>	Q13275	<i>Semaphorin-3F</i>
P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	Q13332	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S</i>
P07205	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	Q13421	<i>Mesothelin</i>
P07225	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	Q13438	<i>Protein OS-9</i>
P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	Q13443	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7</i>
P07288	<i>Prostate-specific antigen</i>	Q13449	<i>Limbic system-associated membrane protein</i>
P07339	<i>Cathepsin D</i>	Q13510	<i>Acid ceramidase</i>
P07355	<i>Annexin A2</i>	Q14118	<i>Dystroglycan</i>
P07384	<i>Calpain-1 catalytic subunit</i>	Q14393	<i>Growth arrest-specific protein 6</i>
P07602	<i>Prosaposin</i>	Q14507	<i>Epididymal secretory protein E3-alpha</i>
P07686	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	Q14508	<i>WAP four-disulfide core domain protein 2</i>
P07711	<i>Cathepsin L1</i>	Q14515	<i>SPARC-like protein 1</i>
P07737	<i>Profilin-1</i>	Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>
P07864	<i>L-lactate dehydrogenase C chain</i>	Q15257	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator</i>
P08107	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	Q15293	<i>Reticulocalbin-1</i>
P08118	<i>Beta-microseminoprotein</i>	Q15828	<i>Cystatin-M</i>
P08133	<i>Annexin A6</i>	Q15904	<i>V-type proton ATPase subunit S1</i>
P08174	<i>Complement decay-accelerating factor</i>	Q16348	<i>Solute carrier family 15 member 2</i>
P08195	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	Q16610	<i>Extracellular matrix protein 1</i>
P08236	<i>Beta-glucuronidase</i>	Q16651	<i>Prostasin</i>
P08238	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Q16706	<i>Alpha-mannosidase 2</i>
P08253	<i>72 kDa type IV collagenase</i>	Q16769	<i>GlutaminyI-peptide cyclotransferase</i>
P08294	<i>Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	Q1ZYL8	<i>Izumo sperm-egg fusion protein 4</i>
P08473	<i>Neprilysin</i>	Q309B1	<i>Tripartite motif-containing protein 16-like protein</i>
P08571	<i>Monocyte differentiation antigen CD14</i>	Q53GD3	<i>Choline transporter-like protein 4</i>
P08697	<i>Alpha-2-antiplasmin</i>	Q53H76	<i>Phospholipase A1 member A</i>
P08758	<i>Annexin A5</i>	Q58FF8	<i>Putative heat shock protein HSP 90-beta 2</i>
P08962	<i>CD63 antigen</i>	Q5GAN3	<i>Probable inactive ribonuclease-like protein 13</i>
P09228	<i>Cystatin-SA</i>	Q5J5C9	<i>Beta-defensin 121</i>
P09237	<i>Matrilysin</i>	Q5JS13	<i>Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RaIGPS1</i>
P09466	<i>Glycodelin</i>	Q5KU26	<i>Collectin-12</i>
P09467	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	Q5VTE0	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>

Continua...

...continuação da tabela suplementar 6.

P09486	SPARC	Q687X5	Metalloreductase STEAP4
P09525	Annexin A4	Q6BCY4	NADH-cytochrome b5 reductase 2
P09529	Inhibin beta B chain	Q6NT32	Carboxylesterase 5A
P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	Q6PCB0	von Willebrand factor A domain-containing protein 1
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	Q6UW15	Regenerating islet-derived protein 3-gamma
P0C0L5	Complement C4-B	Q6UWW0	Lipocalin-15
P0C8F1	Prostate and testis expressed protein 4	Q6UX06	Olfactomedin-4
P0CG30	Glutathione S-transferase theta-2B	Q6UXD5	Seizure 6-like protein 2
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	Q6UY27	Prostate and testis expressed protein 2
P10323	Acrosin	Q6W4X9	Mucin-6
P10586	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	Q6XZB0	Lipase member 1
P10599	Thioredoxin	Q6YHK3	CD109 antigen
P10619	Lysosomal protective protein	Q6ZMP0	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4
P10909	Clusterin	Q7L266	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	Q7L4I2	Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2
P11047	Laminin subunit gamma-1	Q7RTZ1	Ovochymase-2
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	Q7Z304	MAM domain-containing protein 2
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	Q7Z4W1	L-xylulose reductase
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	Q86UD1	Out at first protein homolog
P11684	Uteroglobin	Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	Q86X29	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor
P11766	Alcohol dehydrogenase class-3	Q8IVN8	Somatomedin-B and thrombospondin type-1 domain containing protein
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	Q8IXA5	Sperm acrosome membrane-associated protein 3
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	Q8IZJ3	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8
P12277	Creatine kinase B-type	Q8N114	Protein shisa-5
P12429	Annexin A3	Q8N257	Histone H2B type 3-B
P12821	Angiotensin-converting enzyme	Q8N6Q3	CD177 antigen
P12830	Cadherin-1	Q8NB42	Zinc finger protein 527
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	Q8NCW5	NAD(P)H-hydrate epimerase
P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	Q8NDC0	MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein like
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Q8NEX5	Protein WFDC9
P13796	Plastin-2	Q8NFT8	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	Q8NFB8	Cell adhesion molecule 4
P13987	CD59 glycoprotein	Q8NG35	Beta-defensin 105

Continua...

...continuação da tabela suplementar 6.

P14174	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	Q8NHP8	<i>Putative phospholipase B-like 2</i>
P14314	<i>Glucosidase 2 subunit beta</i>	Q8NI22	<i>Multiple coagulation factor deficiency protein 2</i>
P14384	<i>Carboxypeptidase M</i>	Q8WUM4	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>
P14555	<i>Phospholipase A2, membrane associated</i>	Q8WVQ1	<i>Soluble calcium-activated nucleotidase 1</i>
P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	Q8WXA2	<i>Prostate and testis expressed protein 1</i>
P14625	<i>Endoplasmin</i>	Q92484	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a</i>
P15144	<i>Aminopeptidase N</i>	Q92485	<i>Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b</i>
P15289	<i>Arylsulfatase A</i>	Q92597	<i>Protein NDRG1</i>
P15291	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 1</i>	Q92626	<i>Peroxidasin homolog</i>
P15309	<i>Prostatic acid phosphatase</i>	Q92692	<i>Poliovirus receptor-related protein 2</i>
P15586	<i>N-acetylglucosamine-6-sulfatase</i>	Q92743	<i>Serine protease HTRA1</i>
P15907	<i>Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1</i>	Q92820	<i>Gamma-glutamyl hydrolase</i>
P16035	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>	Q92859	<i>Neogenin</i>
P16070	<i>CD44 antigen</i>	Q92896	<i>Golgi apparatus protein 1</i>
P16152	<i>Carbonyl reductase [NADPH] 1</i>	Q93099	<i>Homogentisate 1,2-dioxygenase</i>
P16278	<i>Beta-galactosidase</i>	Q969X1	<i>Protein lifeguard 3</i>
P16562	<i>Cysteine-rich secretory protein 2</i>	Q96A08	<i>Histone H2B type 1-A</i>
P16870	<i>Carboxypeptidase E</i>	Q96DA0	<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>
P17050	<i>Alpha-N-acetylgalactosaminidase</i>	Q96GW7	<i>Brevican core protein</i>
P17066	<i>Heat shock 70 kDa protein 6</i>	Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>
P17174	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	Q96PH6	<i>Beta-defensin 118</i>
P17405	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase</i>	Q96RS0	<i>Trimethylguanosine synthase</i>
P17612	<i>cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha</i>	Q96S96	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 4</i>
P17900	<i>Ganglioside GM2 activator</i>	Q99497	<i>Protein DJ-1</i>
P17931	<i>Galectin-3</i>	Q99536	<i>Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog</i>
P17936	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>	Q99538	<i>Legumain</i>
P18065	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>	Q99715	<i>Collagen alpha-1(XII) chain</i>
P18669	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	Q99816	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
P19440	<i>Gamma-glutamyltranspeptidase 1</i>	Q99878	<i>Histone H2A type 1-J</i>
P19652	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>	Q99985	<i>Semaphorin-3C</i>
P19801	<i>Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]</i>	Q99988	<i>Growth/differentiation factor 15</i>
P19835	<i>Bile salt-activated lipase</i>	Q9BQ16	<i>Testican-3</i>
P20062	<i>Transcobalamin-2</i>	Q9BR76	<i>Coronin-1B</i>
P20073	<i>Annexin A7</i>	Q9BRK5	<i>45 kDa calcium-binding protein</i>
P20142	<i>Gastricsin</i>	Q9BS86	<i>Zona pellucida-binding protein 1</i>
P20151	<i>Kallikrein-2</i>	Q9BTY2	<i>Plasma alpha-L-fucosidase</i>
P20155	<i>Serine protease inhibitor Kazal-type 2</i>	Q9BUD6	<i>Spondin-2</i>

Continua...

...continuação da tabela complementar 6.

P20336	<i>Ras-related protein Rab-3A</i>	Q9BUF5	<i>Tubulin beta-6 chain</i>
P20337	<i>Ras-related protein Rab-3B</i>	Q9BV36	<i>Melanophilin</i>
P20618	<i>Proteasome subunit beta type-1</i>	Q9BWD1	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic</i>
P20827	<i>Ephrin-A1</i>	Q9BWS9	<i>Chitinase domain-containing protein 1</i>
P20933	<i>N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase</i>	Q9BXJ1	<i>Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1</i>
P21108	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3</i>	Q9BY14	<i>Testis-expressed sequence 101 protein</i>
P21266	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	Q9BZQ8	<i>Protein Niban</i>
P21399	<i>Cytoplasmic aconitate hydratase</i>	Q9GZN4	<i>Brain-specific serine protease 4</i>
P21741	<i>Midkine</i>	Q9GZX9	<i>Twisted gastrulation protein homolog 1</i>
P21810	<i>Biglycan</i>	Q9H0B8	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1</i>
P21926	<i>CD9 antigen</i>	Q9H0U4	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>
P22061	<i>Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase</i>	Q9H0W9	<i>Ester hydrolase C11orf54</i>
P22234	<i>Multifunctional protein ADE2</i>	Q9H1M4	<i>Beta-defensin 127</i>
P22304	<i>Iduronate 2-sulfatase</i>	Q9H239	<i>Matrix metalloproteinase-28</i>
P22352	<i>Glutathione peroxidase 3</i>	Q9H2U9	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9</i>
P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	Q9H336	<i>Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2</i>
P22692	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i>	Q9H3G5	<i>Probable serine carboxypeptidase CPVL</i>
P22748	<i>Carbonic anhydrase 4</i>	Q9H444	<i>Charged multivesicular body protein 4b</i>
P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	Q9H4B8	<i>Dipeptidase 3</i>
P23526	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	Q9H4G4	<i>Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1</i>
P23528	<i>Cofilin-1</i>	Q9HAT2	<i>Sialate O-acetyltransferase</i>
P24855	<i>Deoxyribonuclease-1</i>	Q9HB40	<i>Retinoid-inducible serine carboxypeptidase</i>
P25311	<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	Q9HBA0	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
P25774	<i>Cathepsin S</i>	Q9NQ84	<i>G-protein coupled receptor family C group 5 member C</i>
P25786	<i>Proteasome subunit alpha type-1</i>	Q9NQX5	<i>Neural proliferation differentiation and control protein 1</i>
P25787	<i>Proteasome subunit alpha type-2</i>	Q9NR45	<i>Sialic acid synthase</i>
P25788	<i>Proteasome subunit alpha type-3</i>	Q9NR50	<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma</i>
P25789	<i>Proteasome subunit alpha type-4</i>	Q9NR99	<i>Matrix-remodeling-associated protein 5</i>
P26641	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	Q9NS15	<i>Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3</i>
P27348	<i>14-3-3 protein theta</i>	Q9NS68	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>
P27487	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	Q9NY33	<i>Dipeptidyl peptidase 3</i>
P27797	<i>Calreticulin</i>	Q9NZV1	<i>Cysteine-rich motor neuron 1 protein</i>

Continua...

...continuação e conclusão da tabela suplementar 6.

P28066	<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	Q9P2K2	<i>Thioredoxin domain-containing protein 16</i>
P28799	<i>Granulins</i>	Q9UBQ6	<i>Exostosin-like 2</i>
P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	Q9UBR2	<i>Cathepsin Z</i>
P29218	<i>Inositol monophosphatase 1</i>	Q9UBX1	<i>Cathepsin F</i>
P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>	Q9UBX7	<i>Kallikrein-11</i>
P30044	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	Q9UHC6	<i>Contactin-associated protein-like 2</i>
P30046	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	Q9UHL4	<i>Dipeptidyl peptidase 2</i>
P30050	<i>60S ribosomal protein L12</i>	Q9UJJ9	<i>N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma</i>
P30085	<i>UMP-CMP kinase</i>	Q9UK41	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog</i>
P30086	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	Q9UNW1	<i>Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1</i>
P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	Q9Y3R5	<i>Protein dopey-2</i>
P30519	<i>Heme oxygenase 2</i>	Q9Y4C8	<i>Probable RNA-binding protein 19</i>
P30711	<i>Glutathione S-transferase theta-1</i>	Q9Y4L1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>
P31150	<i>Rab GDP dissociation inhibitor alpha</i>	Q9Y5X9	<i>Endothelial lipase</i>
P31949	<i>Protein S100-A11</i>	Q9Y5Z4	<i>Heme-binding protein 2</i>
P32119	<i>Peroxiredoxin-2</i>	Q9Y624	<i>Junctional adhesion molecule A</i>
P34059	<i>N-acetylgalactosamine-6-sulfatase</i>	Q9Y646	<i>Carboxypeptidase Q</i>
P34096	<i>Ribonuclease 4</i>	Q9Y653	<i>G-protein coupled receptor 56</i>
P34913	<i>Bifunctional epoxide hydrolase 2</i>	Q9Y6R7	<i>IgG Fc-binding protein</i>
P34932	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>		

7 REFERÊNCIAS

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1520–4.
2. Brugh VM 3rd, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. *Med Clin North Am*. 2004;88(2):367–85.
3. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(2):294–301.
4. Lamb DJ. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian J Androl*. 2010;12(1):64–70.
5. Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Singh G, Mukherjee S, Malhotra N, et al. Comet assay: a prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res*. 2010;131:675–81.
6. Abu DAH, Franken DR, Hoffman B, Henkel R. Sequential analysis of sperm functional aspects involved in fertilisation: a pilot study. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:175–81.
7. Amann RP, Hammerstedt RH. Detection of differences in fertility. *J Androl*. 2002;23(3):317–25.
8. Barratt CLR, Mansell S, Beaton C, Tardif S, Oxenham SK. Diagnostic tools in male infertility-the question of sperm dysfunction. *Asian J Androl*. 2011;13(1):53–8.
9. Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L, Zara V. Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*. 2012;79(4):809–14.
10. Hsu PC, Hsu CC, Guo YL. Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology*. 1999;139(1-2):93–101.
11. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res*. 2008;127(2):115–23.
12. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J Clin Res Ed*. 1985;291(6510):1693–7.
13. Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem*. 2011;44(4):319–24.
14. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 3:1597–605.
15. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012;109(2):259–65.
16. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril*. 2008;90(5):1716–22.

17. Bertolla RP, Cedenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril*. 2006;85(3):625–8.
18. Lacerda JI, Del Giudice PT, da Silva BF, Nichi M, Fariello RM, Fraietta R, et al. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 2011;95(3):994–9.
19. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R, et al. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012;27(11):3140–9.
20. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int*. 2012;110(6):863–7.
21. Restelli AE, Bertolla RP, Spaine DM, Miotto A Jr, Borrelli M Jr, Cedenho AP. Quality and functional aspects of sperm retrieved through assisted ejaculation in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*. 2009;91(3):819–25.
22. Sun X. Mitochondria: transportation, distribution and function during spermiogenesis. *Adv Biosci Biotechnol*. 2010;01(02):97–109.
23. Zhang X, San Gabriel M, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl*. 2006;27(3):414–20.
24. Ferramosca A, Pinto Provenzano S, Montagna DD, Coppola L, Zara V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology*. 2013;82(1):78–83.
25. Koppers AJ, De Luliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3199–207.
26. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Luliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16(1):31–8.
27. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):817–27.
28. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*. 1992;57(2):409–16.
29. Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril*. 2013;99(5):1211–5.
30. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg H-R, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril*. 2005;83(3):635–42.
31. Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, et al. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*. 2003;80 Suppl 2:844–50.
32. Fariello RM, Del Giudice PT, Spaine DM, Fraietta R, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of leukocytospermia and processing by discontinuous density gradient on sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(2-3):151–7.
33. Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS, Eskiocak M. Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005;20(9):2595–600.

34. Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. Hydroperoxide-induced oxidative stress impairs heart muscle cell carbohydrate metabolism. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 1):C179–188.
35. Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol.* 2001;36(9):1503–18.
36. Vittorini S, Paradiso C, Donati A, Cavallini G, Masini M, Gori Z, et al. The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1999;54(8):B318–323.
37. Henault MA, Killian GJ. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 1996;108(2):199–204.
38. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7(5):R40.
39. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, et al. 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(3):941–53.
40. Wang J, Wang J, Zhang H-R, Shi H-J, Ma D, Zhao H-X, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl.* 2009;11(4):484–91.
41. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int.* 2013;112(6):835–43.
42. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.* 2012;97(1):67–73.e1.
43. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* 1998;59(4):768–76.
44. Masson D, Drouineaud V, Moiroux P, Gautier T, Dautin G, Schneider M, et al. Human seminal plasma displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid transfer protein. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(8):457–64.
45. Sheriff DS, Ali EF. Perspective on plasma membrane cholesterol efflux and spermatozoal function. *J Hum Reprod Sci.* 2010;3(2):68–75.
46. Brackett NL, Davi RC, Padron OF, Lynne CM. Seminal plasma of spinal cord injured men inhibits sperm motility of normal men. *J Urol.* 1996;155(5):1632–5.
47. Barbonetti A, Vassallo MRC, Di Rosa A, Leombruni Y, Felzani G, Gandini L, et al. Involvement of mitochondrial dysfunction in the adverse effect exerted by seminal plasma from men with spinal cord injury on sperm motility. *Andrology.* 2013;1(3):456–63.
48. Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2011;10(12):M110.004127.
49. Starita-Geribaldi M, Poggioli S, Zucchini M, Garin J, Chevallier D, Fenichel P, et al. Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(8):715–22.

50. Heshmat SM, Mullen JB, Jarvi KA, Soosaipillai A, Diamandis EP, Hamilton RJ, et al. Seminal plasma lipocalin-type prostaglandin D synthase: a potential new marker for the diagnosis of obstructive azoospermia. *J Urol*. 2008;179(3):1077–80.
51. Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, et al. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril*. 2013;99(1):92–8.
52. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79(4):829–43.
53. Chen SS, Chang LS, Wei YH. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(11):1328–34.
54. Piomboni P, Stendardi A, Gambera L, Tatone C, Coppola L, De Leo V, et al. Protein modification as oxidative stress marker in normal and pathological human seminal plasma. *Redox Rep Commun Free Radic Res*. 2012;17(5):227–32.
55. Du Plessis SS, Kashou AH, Benjamin DJ, Yadav SP, Agarwal A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2011;9:36.
56. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(5 Suppl 1):S111–114.
57. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. 287 p.
58. Da Silva BF, Borrelli M Jr, Fariello RM, Restelli AE, Del Giudice PT, Spaine DM, et al. Is sperm cryopreservation an option for fertility preservation in patients with spinal cord injury-induced anejaculation? *Fertil Steril*. 2010;94(2):564–73.
59. Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl*. 1987;10(6):809–28.
60. Roth TL, Weiss RB, Buff JL, Bush LM, Wildt DE, Bush M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biol Reprod*. 1998;58(2):475–82.
61. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(9):1187–202.
62. Kent CR, Eady JJ, Ross GM, Steel GG. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *Int J Radiat Biol*. 1995;67(6):655–60.
63. Oborna I, Wojewodka G, De Sanctis JB, Fingerova H, Svobodova M, Brezinova J, et al. Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2010;25(2):308–16.
64. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76–85.
65. Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS. MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W127–133.
66. Saito R, Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Lotia S, et al. A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods*. 2012;9(11):1069–76.

67. Wu J, Vallenius T, Ovaska K, Westermarck J, Mäkelä TP, Hautaniemi S. Integrated network analysis platform for protein-protein interactions. *Nat Methods*. 2009;6(1):75–7.
68. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25(8):1091–3.
69. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril*. 2013;99(4):998–1007.
70. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod*. 2002;8(8):719–21.
71. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S-I, et al. Mitochondria-related male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15148–53.
72. Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, et al. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PLoS One*. 2011;6(3):e18112.
73. Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1526–30.
74. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):463–72.
75. Kumar V, Kota V, Shivaji S. Hamster sperm capacitation: role of pyruvate dehydrogenase A and dihydrolipoamide dehydrogenase. *Biol Reprod*. 2008;79(2):190–9.
76. Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007;22(6):1585–96.
77. Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem*. 1998;44(8 Pt 1):1616–20.
78. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2002;17(3):704–9.
79. Ding Z, Qu F, Guo W, Ying X, Wu M, Zhang Y. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol Reprod Dev*. 2007;74(9):1124–31.
80. Zhao C, Huo R, Wang F-Q, Lin M, Zhou Z-M, Sha J-H. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril*. 2007;87(2):436–8.
81. Wennemuth G, Meinhardt A, Mallidis C, Albrecht M, Krause W, Renneberg H, et al. Assessment of fibronectin as a potential new clinical tool in andrology. *Andrologia*. 2001;33(1):43–6.
82. Ivanova-Kicheva M, Dimov G. Influence of selected seminal plasma proteins on mitochondrial integrity and speed parameters of ram sperm stored at low temperature. *Biotechnol & Biotechnol eq*. 2011;25(4):2591–6.

83. Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 1989;23(1):77–90.
84. Colagar AH, Marzony ET. Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;45(2):144–9.
85. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 1996;48(6):835–50.
86. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 5):645–56.
87. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(7-8):869–80.
88. Tschesche H, Wittig B, Decker G, Müller-Esterl W, Fritz H. A new acrosin inhibitor from boar spermatozoa. *Eur J Biochem FEBS.* 1982;126(1):99–104.
89. Yadav VK, Chhikara N, Gill K, Dey S, Singh S, Yadav S. Three low molecular weight cysteine proteinase inhibitors of human seminal fluid: purification and enzyme kinetic properties. *Biochimie.* 2013;95(8):1552–9.
90. Ou C-M, Tang J-B, Huang M-S, Sudhakar Gandhi PS, Geetha S, Li S-H, et al. The mode of reproductive-derived Spink (serine protease inhibitor Kazal-type) action in the modulation of mammalian sperm activity. *Int J Androl.* 2012;35(1):52–62.
91. Dubé E, Hermo L, Chan PTK, Cyr DG. Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. *Biol Reprod.* 2008;78(2):342–51.
92. Ding X, Zhang J, Bian Z, Xia Y, Lu C, Gu A, et al. Variants in the Eppin gene show association with semen quality in Han-Chinese population. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(1):125–31.
93. Ding X, Zhang J, Fei J, Bian Z, Li Y, Xia Y, et al. Variants of the EPPIN gene affect the risk of idiopathic male infertility in the Han-Chinese population. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2010;25(7):1657–65.
94. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107(4):1326–32.
95. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988;38(5):1171–80.
96. Haidl G, Allam JP, Schuppe H-C. Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia.* 2008;40(2):92–6.
97. Quarato G, Scrima R, Agriesti F, Moradpour D, Capitano N, Piccoli C. Targeting mitochondria in the infection strategy of the hepatitis C virus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(1):156–66.
98. Tremellen K, Tunc O. Macrophage activity in semen is significantly correlated with sperm quality in infertile men. *Int J Androl.* 2010;33(6):823–31.
99. Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2005;20(9):2601–7.

100. Henkel R, Maass G, Hajimohammad M, Menkveld R, Staf T, Villegas J, et al. Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*. 2003;35(5):309–13.
101. Kanemori Y, Ryu J-H, Sudo M, Niida-Araida Y, Kodaira K, Takenaka M, et al. Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse. *Biol Reprod*. 2013;88(4):105.
102. Tardif S, Guyonnet B, Cormier N, Cornwall GA. Alteration in the processing of the ACRBP/sp32 protein and sperm head/acrosome malformations in proprotein convertase 4 (PCSK4) null mice. *Mol Hum Reprod*. 2012;18(6):298–307.
103. Gyamera-Acheampong C, Tantibhedhyangkul J, Weerachatanukul W, Tadros H, Xu H, van de Loo J-W, et al. Sperm from mice genetically deficient for the PCSK4 proteinase exhibit accelerated capacitation, precocious acrosome reaction, reduced binding to egg zona pellucida, and impaired fertilizing ability. *Biol Reprod*. 2006;74(4):666–73.
104. Baba T, Niida Y, Michikawa Y, Kashiwabara S, Kodaira K, Takenaka M, et al. An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *J Biol Chem*. 1994;269(13):10133–40.
105. Yamagata K, Murayama K, Okabe M, Toshimori K, Nakanishi T, Kashiwabara S, et al. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J Biol Chem*. 1998;273(17):10470–4.
106. Veaute C, Liu DY, Furlong LI, Biancotti JC, Baker HWG, Vazquez-Levin MH. Anti-human proacrosin antibody inhibits the zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction of ZP-bound spermatozoa. *Fertil Steril*. 2010;93(7):2456–9.
107. Vilagran I, Castillo J, Bonet S, Sancho S, Yeste M, Estanyol JM, et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*. 2013;80(5):443–50.
108. Creutz CE, Pazoles CJ, Pollard HB. Self-association of synexin in the presence of calcium. Correlation with synexin-induced membrane fusion and examination of the structure of synexin aggregates. *J Biol Chem*. 1979;254(2):553–8.
109. Srivastava M, Atwater I, Glasman M, Leighton X, Goping G, Caohuy H, et al. Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca(2+) signaling, and insulin secretion in the *anx7(+/-)* knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13783–8.
110. Brownawell AM, Creutz CE. Calcium-dependent binding of the plasma protein apolipoprotein A-I to two members of the annexin family. *Biochemistry (Mosc)*. 1996;35(21):6839–45.
111. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim H-RC. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15819–27.
112. Petit FM, Serres C, Bourgeon F, Pineau C, Auer J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2013;28(4):852–65.
113. Gopalakrishnan B, Aravinda S, Pawshe CH, Totey SM, Nagpal S, Salunke DM, et al. Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochem J*. 1998;329 (Pt 2):231–41.
114. Hemachand T, Shaha C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Lett*. 2003;538(1-3):14–8.

115. Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, DeRossi RV, Howard J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biol Reprod.* 1996;54(3):638–46.
116. Xiao N, Kam C, Shen C, Jin W, Wang J, Lee KM, et al. PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest.* 2009;119(4):802–12.
117. Martínez-Menárguez JA, Geuze HJ, Ballesta J. Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1996;44(4):313–20.
118. Berruti G, Ripolone M, Ceriani M. USP8, a regulator of endosomal sorting, is involved in mouse acrosome biogenesis through interaction with the spermatid ESCRT-0 complex and microtubules. *Biol Reprod.* 2010;82(5):930–9.
119. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl.* 2006;29(1):69–75; discussion 105–108.
120. Soubeyrand S, Manjunath P. Novel seminal phospholipase A2 is inhibited by the major proteins of bovine seminal plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1341(2):183–8.
121. Fry MR, Ghosh SS, East JM, Franson RC. Role of human sperm phospholipase A2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol Reprod.* 1992;47(5):751–9.
122. Jansson A, Ronquist G, Frithz G. Phospholipase A activity in seminal plasma of men attending an infertility clinic. *Urol Int.* 1991;46(2):184–8.
123. Thakkar JK, East J, Seyler D, Franson RC. Surface-active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* 1983;754(1):44–50.
124. Aghajanzpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalae M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum Reprod.* 2011;26(11):2950–6.
125. Hayasaka S, Terada Y, Suzuki K, Murakawa H, Tachibana I, Sankai T, et al. Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, VIIa-Rab27a/b interacting protein, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis. *Asian J Androl.* 2008;10(4):561–8.
126. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-Actin-Keratin-containing Plate, Anchors the Acrosome to the Nucleus during Shaping of the Spermatid Head. *Mol Biol Cell.* 2003;14(11):4628–40.
127. Kierszenbaum AL. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev.* 2002;63(1):1–4.
128. Moretti E, Cosci I, Spreafico A, Serchi T, Cuppone AM, Collodel G. Semen characteristics and inflammatory mediators in infertile men with different clinical diagnoses. *Int J Androl.* 2009;32(6):637–46.
129. Perdichizzi A, Nicoletti F, Vignera SL, Barone N, D'Agata R, Vicari E, et al. Effects of Tumour Necrosis Factor- α on Human Sperm Motility and Apoptosis. *J Clin Immunol.* 2007;27(2):152–62.
130. Kopa Z, Wenzel J, Papp GK, Haidl G. Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia.* 2005;37(5):188–94.
131. Gruschwitz MS, Brezinschek R, Brezinschek HP. Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. *J Androl.* 1996;17(2):158–63.

132. Allam J-P, Fronhoffs F, Fathy A, Novak N, Oltermann I, Bieber T, et al. High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrologia*. 2008;40(5):329–34.
133. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986–1000.
134. Meizel S, Turner KO. The effects of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool*. 1984;231(2):283–8.
135. Lax Y, Grossman S, Rubinstein S, Magid N, Breitbart H. Role of lipoxygenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1043(1):12–8.
136. Schaefer M, Hofmann T, Schultz G, Gudermann T. A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3008–13.
137. Aitken RJ, Kelly RW. Analysis of the direct effects of prostaglandins on human sperm function. *J Reprod Fertil*. 1985;73(1):139–46.
138. Shimizu Y, Yorimitsu A, Maruyama Y, Kubota T, Aso T, Bronson RA. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(6):555–61.
139. Roy AC, Ratnam SS. Biosynthesis of prostaglandins by human spermatozoa in vitro and their role in acrosome reaction and fertilization. *Mol Reprod Dev*. 1992;33(3):303–6.
140. Schlegel W, Rotermund S, Färber G, Nieschlag E. The influence of prostaglandins on sperm motility. *Prostaglandins*. 1981;21(1):87–99.
141. Kullisaar T, Türk S, Kilk K, Ausmees K, Punab M, Mändar R. Increased levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in male partners of infertile couples. *Andrology*. 2013;1(6):850–8.
142. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 2004;70(2):518–22.
143. Albers JJ, Wolfbauer G, Cheung MC, Day JR, Ching AF, Lok S, et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1258(1):27–34.
144. Drouineaud V, Lagrost L, Klein A, Desrumaux C, Le Guern N, Athias A, et al. Phospholipid transfer protein deficiency reduces sperm motility and impairs fertility of mouse males. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006;20(6):794–6.
145. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9(3):203–9.
146. Evans HM, Bishop KS. ON THE EXISTENCE OF A HITHERTO UNRECOGNIZED DIETARY FACTOR ESSENTIAL FOR REPRODUCTION. *Science*. 1922;56(1458):650–1.
147. Rockett JC, Patrizio P, Schmid JE, Hecht NB, Dix DJ. Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res*. 2004;549(1-2):225–40.
148. Avendaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1077–84.

149. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012;27(3):652–8.
150. Guz J, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Zarakowska E, Siomek A, et al. Comparison of oxidative stress/DNA damage in semen and blood of fertile and infertile men. *PloS One*. 2013;8(7):e68490.
151. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(1):68–78.
152. Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2003;18(6):1265–72.
153. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2002;17(12):3122–8.
154. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*. 2010;94(2):549–57.
155. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2006;21(11):2876–81.
156. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(4):428–32.
157. Williams AC, Ford WC. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl*. 2001;22(4):680–95.
158. Jones AR, Milmlow D. Endogenous energy production by mature boar spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1997;111(2):285–90.
159. Ferramosca A, Focarelli R, Piomboni P, Coppola L, Zara V. Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int J Androl*. 2008;31(3):337–45.
160. Albarracín JL, Fernández-Novell JM, Ballester J, Rauch MC, Quintero-Moreno A, Peña A, et al. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol Reprod*. 2004;71(5):1437–45.
161. Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*. 2004;71(2):540–7.
162. Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee W-NP, Boros LG, Fernández-Novell JM, et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*. 2003;554(3):342–6.
163. Ronquist KG, Ek B, Stavreus-Evers A, Larsson A, Ronquist G. Human prostasomes express glycolytic enzymes with capacity for ATP production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(6):E576–582.
164. Argov N, Sklan D, Zeron Y, Roth Z. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology*. 2007;67(4):878–85.

165. Beer-Ljubić B, Aladrović J, Marenjak TS, Laskaj R, Majić-Balić I, Milinković-Tur S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology*. 2009;72(8):1132–40.
166. Goudriaan JR, Espirito Santo SMS, Voshol PJ, Teusink B, van Dijk KW, van Vlijmen BJM, et al. The VLDL receptor plays a major role in chylomicron metabolism by enhancing LPL-mediated triglyceride hydrolysis. *J Lipid Res*. 2004;45(8):1475–81.
167. Douard V, Gassama-Diagne A, Hermier D, Blesbois E. Activity of phospholipases A and lysophospholipase in turkey semen and oviducal fluid. *Poult Sci*. 2004;83(8):1385–93.
168. Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, et al. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J Biosci*. 2009;34(6):899–908.
169. Seshadri S, Flanagan B, Vince G, Lewis-Jones D j. Detection of subpopulations of leucocytes in different subgroups of semen sample qualities. *Andrologia*. 2012;44:354–61.
170. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1991;6(6):791–8.
171. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 2006;12(9):1065–74.
172. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol*. 2006;80(3):572–80.
173. Miller DJ, First NL, Ax RL. Isolation and characterization of seminal fluid proteins that bind heparin. *Adv Exp Med Biol*. 1987;219:597–601.
174. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*. 1990;42(5-6):899–915.
175. Das UN, Ramadevi G, Rao KP, Rao MS. Prostaglandins can modify gamma-radiation and chemical induced cytotoxicity and genetic damage in vitro and in vivo. *Prostaglandins*. 1989;38(6):689–716.
176. Tartibian B, Maleki BH. Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clin J Sport Med Off J Can Acad Sport Med*. 2012;22(2):132–9.
177. Armstrong JS, Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Sikka SC. Antioxidant Potential of Human Serum Albumin: Role in the Recovery of High Quality Human Spermatozoa for Assisted Reproductive Technology. *J Androl*. 1998;19(4):412–9.
178. Monga M, Dunn K, Rajasekaran M. Characterization of ultrastructural and metabolic abnormalities in semen from men with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2001;24(1):41–6.
179. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl*. 2009;32(1):46–56.
180. Osterhoff C, Kirchhoff C, Krull N, Ivell R. Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically expressed in the proximal epididymis. *Biol Reprod*. 1994;50(3):516–25.

181. Hamil KG, Sivashanmugam P, Richardson RT, Grossman G, Ruben SM, Mohler JL, et al. HE2beta and HE2gamma, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in the human. *Endocrinology*. 2000;141(3):1245–53.
182. Bernassola F, Ciechanover A, Melino G. The ubiquitin proteasome system and its involvement in cell death pathways. *Cell Death Differ*. 2010;17(1):1–3.
183. Ma T, Keller JA, Yu X. RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011;43(5):339–45.
184. Chakravarty S, Bansal P, Sutovsky P, Gupta SK. Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2008;16(3):391–400.
185. Kong M, Diaz ES, Morales P. Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biol Reprod*. 2009;80(5):1026–35.
186. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 9):1665–75.
187. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987;81(2):459–69.
188. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil*. 1999;115(1):1–7.
189. Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*. 2010;10(5):419–28.
190. Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(1):112–9.
191. Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2012;287(39):33048–60.
192. Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update*. 2008;14(2):131–42.
193. Lenzi A, Gandini L, Maresca V, Rago R, Sgrò P, Dondero F, et al. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(3):226–31.
194. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 2008;59(1):2–11.
195. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford; 1989.
196. Kozirowska-Gilun M, Kozirowski M, Fraser L, Strzeżek J. Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. 2011;46(3):527–33.
197. Park K, Jeon S, Song Y-J, Yi LSH. Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. *Anim Reprod Sci*. 2012;135(1-4):53–61.

198. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 1995;64(4):868–70.
199. Shiraishi K, Takihara H, Matsuyama H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World J Urol*. 2010;28(3):359–64.
200. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biol Reprod*. 1995;53(5):1146–50.
201. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007;14(6):482–7.
202. Bujan L, Daudin M, Charlet JP, Thonneau P, Mieusset R. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000;15(6):1355–7.
203. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*. 2005;39(7):697–705.
204. Davidoff MS, Middendorff R, Köföncü E, Müller D, Jezek D, Holstein AF. Leydig cells of the human testis possess astrocyte and oligodendrocyte marker molecules. *Acta Histochem*. 2002;104(1):39–49.
205. Means AR, Dedman JR, Tash JS, Tindall DJ, van Sickle M, Welsh MJ. Regulation of the testis sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annu Rev Physiol*. 1980;42:59–70.
206. Sanborn BM, Heindel JJ, Robison GA. The role of cyclic nucleotides in reproductive processes. *Annu Rev Physiol*. 1980;42:37–57.
207. Gravis CJ. Inhibition of spermiation in the Syrian hamster using dibutyryl cyclic-AMP. *Cell Tissue Res*. 1978;192(2):241–8.
208. Conti M, Toscano MV, Petrelli L, Geremia R, Stefanini M. Involvement of phosphodiesterase in the refractoriness of the Sertoli cell. *Endocrinology*. 1983;113(5):1845–53.
209. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*. 2008;60(1):79–127.
210. McCoubrey WK Jr, Eke B, Maines MD. Multiple transcripts encoding heme oxygenase-2 in rat testis: developmental and cell-specific regulation of transcripts and protein. *Biol Reprod*. 1995;53(6):1330–8.
211. Ewing JF, Maines MD. Distribution of constitutive (HO-2) and heat-inducible (HO-1) heme oxygenase isozymes in rat testes: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells. *Endocrinology*. 1995;136(5):2294–302.
212. Abdel Aziz MT, Mostafa T, Roshdy N, Hosni H, Rashed L, Sabry D, et al. Heme oxygenase enzyme activity in human seminal plasma of fertile and infertile males. *Andrologia*. 2008;40(5):292–7.
213. Abdel Aziz MT, Mostafa T, Atta H, Kamal O, Kamel M, Hosni H, et al. Heme oxygenase enzyme activity in seminal plasma of oligoasthenoteratozoospermic males with varicocele. *Andrologia*. 2010;42(4):236–41.
214. Peterson SJ, Frishman WH, Abraham NG. Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system. *Cardiol Rev*. 2009;17(3):99–111.

ABSTRACT

Objective: To verify if the seminal plasma proteomic profile reflects sperm functional alteration and semen lipid peroxidation levels. **Method:** A cross-sectional study was performed including 156 normozoospermic patients. After semen retrieval by masturbation, an aliquot was utilized for semen analysis and another for evaluation of sperm mitochondrial activity, acrosome integrity and DNA fragmentation. The remaining semen volume was centrifuged and the supernatant seminal plasma was utilized for semen lipid peroxidation levels evaluation, and proteomic analysis. Patients were divided into percentiles (15%) to form the experimental groups: Study 1 – high (control group) and low (altered group) sperm mitochondrial activity; Study 2 – high (control group) and low (altered group) sperm acrosome integrity; Study 3 – low (control group) and high (altered group) sperm DNA fragmentation; Study 4 – low (control group) and high (altered group) semen lipid peroxidation levels. Proteomic analysis was performed by a LC-MS/MS approach. Groups were compared using univariate (Student's t test) and multivariate (PLS-DA and discriminant analysis) analyses. Differentially expressed proteins were then utilized for functional enrichment analysis. **Results:** 506, 493, 474, and 629 proteins were observed in studies 1, 2, 3, and 4, respectively. Enriched functions in study 1 were reactive oxygen species detoxification, and NADP binding (control group), and intramolecular oxidoreductase activity, aminoglycans catabolism, endopeptidases inhibition, lysosomes, and acute-phase response (altered group). In study 2, main enriched functions were acute-phase response (control group), and phospholipase inhibition, arachidonic acid metabolism, exocytosis, regulation of acute inflammatory response, response to hydrogen peroxide and lysosomal transport (altered group). In study 3, main enriched functions were carbohydrates metabolism, lipoprotein regulation, negative regulation of apoptosis, hormone metabolism, metalloproteinases activity, NAD binding, and lysosomes (control group), and prostaglandin biosynthesis, and fatty acid binding (altered group). In study 4, enriched functions were unsaturated fatty acid biosynthesis, oxidants and antioxidants activity, and cellular response to heat stress (altered group). In total, 8, 6, 8, and 7 seminal biomarkers were proposed for studies 1 (mitochondrial activity), 2 (acrosome integrity), 3 (DNA fragmentation), and 4 (lipid peroxidation), respectively. **Conclusions:** The seminal plasma proteomic profile reflects sperm functional alterations and semen lipid peroxidation levels, and several post-genomic functions are related to the studied alterations. Proteins related to sperm functional alterations, and semen lipid peroxidation levels constitute potential seminal biomarkers for each alteration.

Keywords: acrosome; DNA fragmentation; lipid peroxidation; mitochondria; proteomics, semen; sperm.

Bibliografia consultada

Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Biblioteca Central
– Antônio Rubino de Azevedo. Normas para teses e dissertações. 2010.

Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Biblioteca Central.
Estrutura da Tese. 2011.