

## L'ESTUDI DEL PLASMA SEMINAL MITJANÇANT PROTEÒMICA D'ALT RENDIMENT SUGGEREIX UNA COMUNICACIÓ BIDIRECCIONAL ENTRE L'ESPERMATOZOIDE I EL TRACTE REPRODUCTOR MASCULÍ

Ferran Barrachina<sup>1</sup>, Meritxell Jodar<sup>1</sup>, Ada Soler-Ventura<sup>1</sup>, Josep Maria Estanyol<sup>2</sup>, Juan Manuel Corral<sup>3</sup>, Josep Lluís Ballescà<sup>4</sup>, Rafael Oliva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Grup de Biologia Molecular de la Reproducció i Desenvolupament, Dept. Ciències Biomèdiques, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Casanova 143, 08036 Barcelona, i Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

<sup>2</sup>Unitat de Proteòmica, Centres Científics i Tecnològics (CCiTUB) de la UB, Casanova 143, 08036 Barcelona.

<sup>3</sup>Departament d'Urologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

<sup>4</sup>Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

\*roliva@ub.edu

---

### Resum

El plasma seminal sembla tenir un paper molt més important que el de simplement ser un medi de transport dels espermatozoides, sent crucial per a la fertilització i per a la supervivència i funció de l'espermatozoide. Per tal d'avaluar el potencial rol de les proteïnes del plasma seminal en la funció de l'espermatozoide, l'objectiu d'aquest estudi va ser caracteritzar i comparar el proteoma del plasma seminal de diferents subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els seus paràmetres seminals (4 pacients normozoospermics (NZ), 4 astenozoospermics (AS), 4 oligozoospermics (OZ) i 4 azoospermics (AZ)) utilitzant el marcatge proteic amb *tandem mass tags* (TMT) i procedint a la seva identificació i quantificació mitjançant espectrometria de masses (LC-MS/MS). Un total de 370 proteïnes van ser identificades en el total de les 16 mostres estudiades, sent les proteïnes relacionades amb el metabolisme, resposta a l'estrès, proteòlisi i sistema immune els processos biològics més enriquits. Les diferències significatives detectades en l'abundància de les proteïnes van ser principalment degudes a canvis en la concentració d'espermatozoides (els pacients OZ i AZ presentaven una abundància de proteïnes menor). No obstant, l'abundància de la proteïna PLA2G2A estava reduïda en pacients AS, pel que semblaria trobar-se relacionat amb la motilitat dels espermatozoides. Particularment, una proteïna principalment expressada en l'epidídim (ECM1) i detectada en el plasma seminal es va correlacionar positivament de manera significativa amb la concentració d'espermatozoides. Aquest resultat podria suggerir que la presència d'espermatozoides influenciaria les secrecions de l'epidídim, el que planteja la possibilitat d'una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí.

**Paraules clau:** plasma seminal, proteòmica quantitativa, marcatge TMT, infertilitat masculina.

### Abstract

Seminal plasma seems to be more than a simply medium to carry the spermatozoa, being crucial for sperm survival, function and fertilization. In order to assess the potential role of seminal plasma proteins on sperm function, we characterized and compared the seminal plasma proteome from different subtypes of infertile patients according to their seminal parameters (4 normozoospermic (NZ), 4 asthenozoospermic (AS), 4 oligozoospermic (OZ) and 4 azoospermic (AZ) patients) using tandem mass tags (TMT) protein labelling followed by mass spectrometry (LC-MS/MS). A total of 370 proteins were identified in common along the 16 samples, being the processes related to metabolism, response to stress, proteolysis and immune system highly enriched. The largest differences were mainly due to changes in the sperm concentration (lower protein abundance was found in OZ and AZ patients). However, the PLA2G2A protein abundance was decreased in AS patients, which seems to be related to sperm motility. Remarkably, an epididymally-expressed protein (ECM1) found in seminal plasma was significantly positively correlated with sperm concentration. This result could suggest that the presence of sperm by themselves influence the epididymal secretions, raising the possibility of a bidirectional communication between the sperm and the male reproductive tract.

**Key words:** seminal plasma, quantitative proteomics, TMT labelling, male infertility.

---

## INTRODUCCIÓ

El plasma seminal està compost per les secrecions provinents del testicle (1-2%), epidídim (2-4%) i les glàndules sexuals accessòries presents en el tracte urogenital masculí, que inclou les vesícules seminals (65-75%), la pròstata (25-30%) i les glàndules bulbouretrals (<1%). Malgrat que la funció més bàsica del plasma seminal és la d'actuar com a medi de transport dels espermatozoides durant el procés d'ejaculació i de trànsit pel tracte femení fins arribar a l'òcit, els components del plasma seminal també són crucials per a la protecció dels espermatozoides i per a la seva supervivència i funció (Camargo *et al.*, 2016). De fet, després de l'espermatoïgenesis, els espermatozoides resultants són cèl·lules germinals immadures sense motilitat i sense l'habilitat per a fertilitzar oòcits per si sols (Jodar *et al.*, 2016). El contacte de l'espermatozoide amb el plasma seminal durant la seva maduració a l'epidídim i durant el trànsit en el tracte genital masculí durant l'ejaculació és crucial per a la seva maduració, supervivència, funció, motilitat, viabilitat i capacitat dels espermatozoides (Brackett *et al.*, 1996; Henault *et al.*, 1996; Pilch *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). Així mateix, el contacte del plasma seminal amb el tracte genital femení també prepara al sistema immune femení per tal de tolerar el *conceptus* i també sembla ocasionar canvis cel·lulars i moleculars a l'endometri amb l'objectiu de facilitar el desenvolupament embrionari i la implantació (Robertson, 2005; Moldenhauer *et al.*, 2009).

El plasma seminal humà és una font rica en proteïnes i, aproximadament, la concentració de proteïnes en el plasma seminal és de 35-55 mg/ml (Pilch *et al.*, 2006). L'accessibilitat i l'alta concentració de proteïnes del plasma seminal suggereix que el plasma seminal pot ser una font rica de biomarcadors per a la fertilitat masculina, de la mateixa manera que s'han identificat en l'espermatozoide (Castillo *et al.*, 2011; Azpiazu *et al.*, 2014; Paiva *et al.*, 2015). A més, alteracions de les proteïnes del plasma seminal s'han relacionat amb diversos aspectes implicats en la infertilitat masculina (Drabovich *et al.*, 2014; Giacomini *et al.*, 2015; Gilany *et al.*, 2015; Vilagran *et al.*, 2015).

Per tant, per tal d'avaluar el potencial rol de les proteïnes del plasma seminal en la funcionalitat i integritat dels espermatozoides, l'objectiu del present estudi és caracteritzar i comparar el proteoma del plasma seminal de diferents subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els seus paràmetres seminals: (i) 4 pacients normozoospermics (NZ; paràmetres seminals normals), (ii) 4 pacients astenozoospermics (AS; espermatozoides amb motilitat alterada), (iii) pacients oligozoospermics (OZ; baixa concentració d'espermatozoides), i (iv) 4 pacients

azoospermics (AZ; absència d'espermatozoides), mitjançant la identificació de proteïnes per espectrometria de masses (LC-MS/MS) juntament amb un marcatge previ de les proteïnes amb *tandem mass tags* (TMT).

## MATERIAL I MÈTODES

**Mostres biològiques.** Les mostres de semen humà van ser obtingudes, sota previ consentiment informat, de la Clínica de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (FIV Clínic). Les mostres seleccionades van ser un total de 16, en les quals es van incloure (i) 4 pacients normozoospermics (NZ), (ii) 4 pacients astenozoospermics (AS), (iii) 4 pacients oligozoospermics (OZ), i (iv) 4 pacients azoospermics (AZ; 2 pacients amb azoospermia obstructiva (OA) i 2 pacients amb azoospermia no obstructiva (NOA)). L'avaluació dels paràmetres seminals es va realitzar seguint les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organization, 2010). La determinació dels paràmetres seminals es va dur a terme mitjançant el sistema informatitzat *Computer-assisted sperm analysis* (Proiser) i també es va realitzar una anàlisi de la vitalitat dels espermatozoides mitjançant el test d'eosina (World Health Organization, 2010).

**Aïllament del plasma seminal i quantificació proteica.** Les mostres de semen es van centrifugar a 500g per a precipitar i separar els espermatozoides del plasma seminal, seguit d'una segona centrifugació a 1.500g, per tal d'eliminar altres restes cel·lulars. El sobrenedant restant, plasma seminal lliure de cèl·lules, es va filtrar (0,45µm) per a poder assegurar l'eliminació de tot tipus cel·lular. El contingut de proteïnes del plasma seminal filtrat es va quantificar mitjançant el kit de quantificació de proteïna BCA (Pierce<sup>TM</sup> BCA protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) seguint les instruccions proporcionades pel fabricant.

**Marcatge isobàric diferencial de les proteïnes del plasma seminal (TMT 10-plex).** El marcatge diferencial de les proteïnes per a les 16 mostres independents es va realitzar seguint les instruccions de la casa comercial (TMT 10-plex *Mass Tag Labelling*; Thermo Fisher Scientific). Breument, el marcatge diferencial isobàric amb TMT 10-plex consisteix en un total de 10 isòtops diferents que s'uneixen de manera covalent a l'extrem N- o C- terminal dels residus de lisina de les proteïnes. Aquests diferents isòtops presenten una massa monoisotòpica diferent, la qual pot ser detectada utilitzant espectrometria de masses d'alta resolució, de tal manera que permet la quantificació de les proteïnes de mostres independents. Es va partir d'una concentració de 60µg/µl de proteïna per mostra i, per tal de reduir les proteïnes i trencar els ponts disulfur, es van incubar amb

TCEP 20mM durant 1h a 55°C i, posteriorment, es van alquilar amb iodoacetamida 18,75mM durant 30min. Les proteïnes es van deixar precipitar en acetona a -20°C durant 16h i, tot seguit, la mostra es va centrifugar a 17.500g per 10min. El pèl·let resultant es va resuspendre en 60µl de TEAB 100mM i, amb la finalitat de digerir les proteïnes i obtenir pèptids, es van afegir 3µl de Tripsina (1µg/µl). Posteriorment, una mateixa quantitat de totes les mostres marcades es van barrejar per tal de preparar un control intern (5µl de cadascuna de les 16 mostres es van barrejar per a conformar el control intern). Els pèptids de les diferents mostres (n=16) i el control intern es van marcar amb els diferents reactius/isòtops del TMT 10-plex. Després d'aturar la reacció afegint 5% d'hidroxilamina, el conjunt de mostres marcades amb diferents isòtops es van combinar per a generar dos pools múltiplex (10-plex; 9 tags isobàrics per a marcar 8 mostres + 1 tag control intern). A continuació, es van purificar i concentrar els pèptids dels dos pools mitjançant les Columnes Pierce C-18 (Pierce C-18 Spin Columns, Thermo Fisher Scientific).

**Cromatografia líquida – Espectrometria de Masses en tàndem (LC-MS/MS) i identificació de proteïnes.** Els pèptids dels dos pools es van separar per mitjà de nano-cromatografia líquida fent servir un *Eksigent nanoLC ultra 2D plus system* (AB Sciex). Els anàlisis per MS/MS es van realitzar utilitzant un *LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fisher Scientific) amb una font d'ionització *nano-electrospray* amb una resolució de 30.000 FWHM en la selecció d'ions a l'Orbitrap. L'adquisició de les dades per MS/MS es va completar utilitzant *Xcalibur 2.1* (Thermo Fisher Scientific) i, per a la identificació dels pèptids marcats amb TMT, es va utilitzar el HCD (*higher energy collisional dissociation*) amb un 40% de CE (*collision energy*). El software emprat per identificar i quantificar les proteïnes va ser el *Proteome Discoverer 1.4* (Thermo Fisher Scientific). Els criteris d'identificació inclouen un mínim d'un pèptid únic, un mínim d'un pèptid per proteïna i un *false discovery rate* (FDR) d'un 1%. Els valors de cada mostra es van normalitzar amb el control intern respectiu.

**Anàlisi de les dades.** Les proteïnes identificades van ser classificades segons la seva funció mitjançant la informació disponible a la base de dades *UniProt knowledgebase* (UniProtKB/Swiss-Prot, <http://www.uniprot.org>). El llistat de proteïnes identificades també va ser analitzat utilitzant l'eina bioinformàtica *Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org/>) per tal d'identificar els Processos Biològics enriquits (*Gene Ontology*). La comparació estadística entre els diferents grups (NZ, AS, OZ, AZ) es va dur a terme mitjançant una anàlisi Kruskal-Wallis utilitzant el software estadístic *SigmaPlot v.11.0* (Systat Software). Els tests Post-Hoc es van realitzar en les proteïnes diferen-

cials per a observar les diferències entre els diferents grups. Es va establir com a significatiu un p-valor < 0,05. A més, es van realitzar anàlisis de correlació de Spearman comparant l'abundància de les proteïnes amb la concentració d'espermatozoides i es van dur a terme tests de correcció de múltiple comparació (p-valor ajustat a FDR 5%). La identificació tissular de les proteïnes es va realitzar utilitzant el programa *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>), un programa que permet una exploració sistemàtica del proteoma humà basat en l'ús d'anticossos específics.

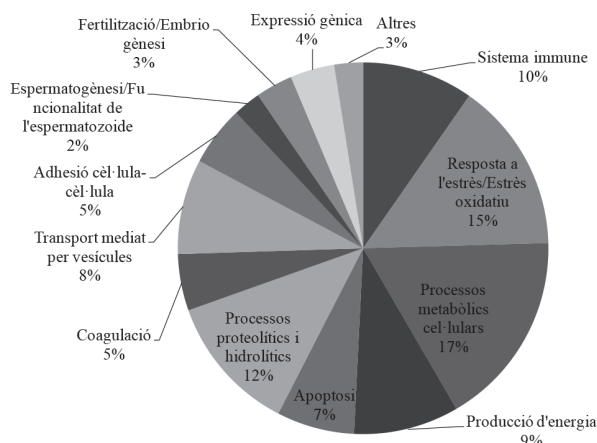
## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### *Proteoma general del plasma seminal*

Un total de 370 proteïnes del plasma seminal van ser identificades en el total de les 16 mostres estudiades. Els processos biològics més enriquits de les proteïnes identificades es van trobar relacionats amb el metabolisme (17%), resposta a l'estrès i a l'estrès oxidatiu (15%), processos proteolítics i hidrolítics (12%), sistema immune (10%) i producció d'energia (9%) (Figura 1). En menor proporció també es van identificar processos relacionats amb la fertilització i l'embriogènesi (3%), i amb l'espermatogènesi i la funcionalitat de l'espermatozoide (2%) (Figura 1). De manera similar, altres estudis que analitzen el plasma seminal també han caracteritzat els processos metabòlics i la resposta a l'estrès com els processos més comuns (Batruch *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013). No obstant, l'anàlisi del proteoma del plasma seminal és molt complexa, ja que la concentració de 10 proteïnes majoritàries s'estima que representen el 80% del proteoma del plasma seminal. Per exemple, les semenogelinas representen un 30% del proteoma del plasma seminal, de tal manera que aquesta alta concentració dificulta la identificació de les proteïnes menys abundants mitjançant espectrometria de masses (Drabovich *et al.*, 2014; Jodar *et al.*, 2016). Per tal de millorar la caracterització del plasma seminal s'haurien d'utilitzar estratègies per a reduir/eliminar les proteïnes més abundants, tals com l'ús de columnes HPLC amb anticossos per les proteïnes més abundants o mètodes per a equalitzar les proteïnes per tal de reduir el rang dinàmic d'aquestes (Jodar *et al.*, 2016).

### *Alteració en l'abundància de proteïnes presents en el plasma seminal en pacients infèrtils*

L'anàlisi estadística (Kruskal-Wallis) va mostrar diferències significatives (p-valor < 0,05) en l'abundància de 7 proteïnes del plasma seminal entre els diferents

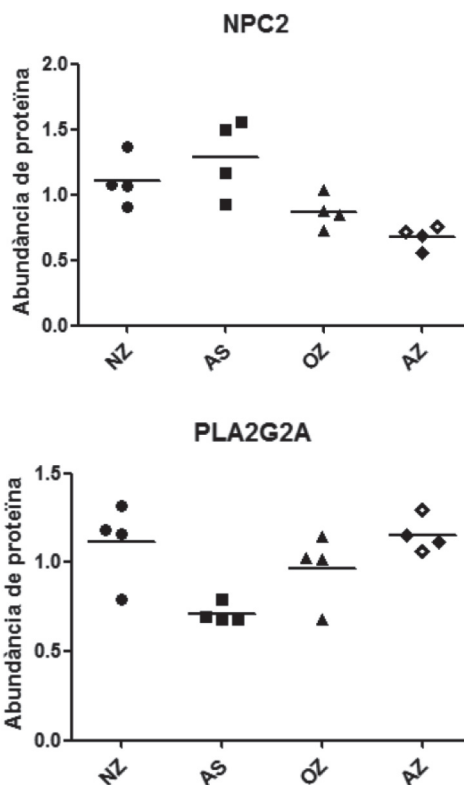


**Figura 1.** Classificació de les proteïnes identificades en el plasma seminal d'acord amb la seva funció cel·lular. Font d'informació: *Gene Ontology Consortium database*.

subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els seus paràmetres seminals (Figura 2). A més, els Tests Post-Hoc ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) van reflectir que, en la majoria de les proteïnes diferencials, les principals diferències en l'abundància de proteïna eren principalment degudes a canvis en la concentració d'espermatozoides (els nivells de proteïna es troben alterats en els pacients oligozoospermics i azoospermics, pacients que presenten una baixa o nul·la concentració d'espermatozoides, respectivament). No obstant, la proteïna PLA2G2A és l'excepció. L'abundància de la proteïna PLA2G2A es trobava disminuïda en pacients astenozoospermics, pel que semblaria estar relacionada amb la mobilitat dels espermatozoides. La proteïna PLA2G2A pertany a la família de la fosfolipasa A2 (PLA2), igual que la proteïna PLA2G3, la qual hi ha evidència que és necessària per a la motilitat dels espermatozoides (Sato *et al.*, 2010).

#### **Proteïnes correlacionades amb la concentració d'espermatozoides i possible origen**

L'abundància de tres proteïnes (NPC2, LDHC i ECM1) es va correlacionar positivament, de manera significativa, després de la correcció de múltiple comparació ( $p$ -valor ajustat a FDR 5%; Taula 1). El fet que hi hagi una baixa abundància d'aquestes proteïnes en el plasma seminal de pacients amb absència (AZ) o amb baixa concentració (OZ) d'espermatozoides podria estar reflectint que: (i) Existeix una desregulació de les secrecions de les glàndules sexuals accessòries o, (ii) Existeix una baixa abundància de romanents de l'espermatozoide que puguin provenir d'espermatozoides apoptòtics o del citoplasma residual (gotes citoplasmàtiques de les cues dels espermatozoides).



**Figura 2.** Abundància de proteïnes del plasma seminal (NPC2, PLA2G2A) en els diferents subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els paràmetres seminals. (OA: rombes negres; NOA: rombes blancs).

**Taula 1.** Anàlisi de correlació entre l'abundància de proteïnes en el plasma seminal i la concentració d'espermatozoides.

| Nom del Gen | p-valor | p-valor ajustat a FDR | Coefficient de Correlació |
|-------------|---------|-----------------------|---------------------------|
| LDHC        | 0,00003 | 0,007                 | 0,853                     |
| NPC2        | 0,0003  | 0,034                 | 0,790                     |
| ECM1        | 0,0006  | 0,048                 | 0,764                     |

De fet, d'acord amb les dades publicades en *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>), la proteïna extracel·lular ECM1 (*Extracellular matrix protein 1*) s'expressa principalment a l'epidídim i no és detectada en el testicle, el que suggereix que hi ha una desregulació en la secreció de l'epidídim en pacients que presenten absència o baix recompte espermàtic. Per contra, l'enzim glicolític LDHC (*L-lactate dehydrogenase C chain*) s'expressa exclusivament en el testicle, suggerint que la LDHC present en el plasma seminal prové de les restes dels espermatozoides. D'altra banda, la proteïna NPC2 (*Epididymal secretory protein E1*) és



un component principal en les secrecions de l'epidídim i sembla estar involucrada en la modificació de la concentració de colesterol present en la membrana de l'espermatozoide durant la seva maduració a l'epidídim (Giacomini *et al.*, 2015). Tot i així, l'origen testicular o extra-testicular de la proteïna NPC2 en el plasma seminal no es pot determinar, ja que aquesta proteïna també es troba present en el testicle.

## CONCLUSIÓ

Els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que la presència d'espermatozoides, per si sols, influeixen en les secrecions de l'epidídim, el que planteja la possibilitat d'una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí. L'anàlisi en profunditat d'aquestes proteïnes diferencials del plasma seminal podria conduir a la identificació de noves dianes per a desenvolupar noves teràpies orientades a regular la fertilitat masculina.

## AGRAÏMENTS

Aquest estudi es troba subvencionat amb càrrec al projecte del Ministerio de Economía y Competitividad, Fondos FEDER, ISCIII (PI16/00346, PI13/00699), Fundación Salud 2000 (SERONO 13-015) i EUGEN-UB (EU-REP 2014), a RO. FB i MJ es troben subvencionats pel Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU15) i per la Generalitat de Catalunya (PERIS 2016-2020), respectivament.

## BIBLIOGRAFIA

- Azpiazu, R. [*et al.*] (2014). «High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction». *Hum Reprod*, vol. 29, núm. 6, p. 1225–1237.
- Batrach, I. [*et al.*] (2012). «Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility». *J Proteome Res*, vol. 11, núm. 3, p. 1503–1511.
- Brackett, NL. [*et al.*] (1996). «Seminal Plasma of Spinal Cord Injured Men Inhibits Sperm Motility of Normal Men». *J Urol*, vol. 155, núm. 5, p. 1632–1635.
- Camargo, M. [*et al.*] (2016). «Proteomic profile of seminal plasma in adolescents and adults with treated and untreated varicocele». *Asian J Androl*, vol. 18, núm. 2, p. 194–201.
- Castillo, C. [*et al.*] (2011). «Anàlisi del proteoma de nuclis d'espermatozoides humans per cromatografia líquida i espectrometria de masses (LC-MS/MS)». *Biol Repr*, vol. 12, p. 57–60.
- Ding, Z. [*et al.*] (2007). «Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma». *Mol Reprod Dev*, vol. 74, p. 1124–1131.
- Drabovich, AP. [*et al.*] (2014). «Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders». *Nat Rev Urol*, vol. 11, p. 278–288.
- Giacomini, E. [*et al.*] (2015). «Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men». *Reprod Biomed Online*, vol. 30, núm. 5, p. 522–531.
- Gilany, K. [*et al.*] (2015). «Exploring the human seminal plasma proteome: An unexplored gold mine of biomarker for male Infertility and male reproduction disorder». *J Reprod Infertil*, vol. 16, núm. 63, p. 61–71.
- Henault, MA. [*et al.*] (1996). «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*, vol. 108, p. 199–204.
- Jodar, M. [*et al.*] (2016). «Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics*». (*In Press*).
- Moldenhauer, LM. [*et al.*] (2009). «Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy». *J Immunol*, vol. 182, núm. 12, p. 8080–8093.
- Paiva, C. [*et al.*] (2015). «Human sperm motility: A high-throughput differential proteomics approach». *Biol Repr*, vol. 14, p. 9–14.
- Pilch, B. [*et al.*] (2006). «Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma». *Genome Biol*, vol. 7, p. R40.1–R40.10.
- Robertson, SA. (2005) «Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract». *Cell Tissue Res*, vol. 322, p. 43–52.
- Rodriguez-Martinez, H. [*et al.*] (2010). «Spermathecin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow». *J Reprod Immunol*, vol. 84, p. 57–65.
- Sato, H. [*et al.*] (2010). «Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice». *J Clin Invest*, vol. 120, núm. 5, p. 1400–1414.
- Sharma, R. [*et al.*] (2013). «Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress». *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 11, p. 85–100.
- Vilagran, I. [*et al.*] (2015). «Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freeza-

- bility ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker». *Andrology*, vol. 3, p. 345–356.
- Wang, J. [*et al.*] (2009). «Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality». *Asian J Androl*, vol. 11, p. 484–491.
- World Health Organization (2010). «*Examination and processing of human semen*». WHO Lab Man Exam Process Hum Semen.
- Zhao, C. [*et al.*] (2007). «*Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis*». *Fertil Steril*, vol. 87, p. 436–438.