



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Expressão de proteínas do plasma seminal em carneiros
das raças Santa Inês e Morada Nova: associações com
parâmetros seminais e influência de fontes de proteína e
de nitrogênio não protéico nas dietas.**

Marco Antonio de Magalhães Rodrigues

Médico Veterinário

Fortaleza-Ce

2011

RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Expressão de proteínas do plasma seminal em carneiros das raças Santa Inês e Morada Nova: associações com parâmetros seminais e influência de fontes de proteína e de nitrogênio não protéico nas dietas

Autor: Marco Antonio de Magalhães Rodrigues

Orientador: Profº Arlindo de Alencar Araripe N. Moura, PhD.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia – Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Fortaleza-Ce

Setembro - 2011

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho da dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

MARCO ANTONIO DE MAGALHÃES RODRIGUES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe N. Moura – Universidade Federal do Ceará (UFC)

Presidente

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo – Universidade Estadual do Ceará (UECE)

1º Examinador

Prof. Dr. Davide Rondina – Universidade Estadual do Ceará (UECE)

2º Examinador

Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues – Universidade Estadual do Ceará (UECE)

3º Examinador

Carlos E Souza, PhD, DVM;

4º Examinador

Ao meu querido pai Aluísio Martins Rodrigues *in memoriam*, pelo seu grande exemplo de honestidade, dedicação ao trabalho, a família e que infelizmente não está aqui presente para compartilhar este importante momento de realização pessoal e profissional.

OFEREÇO

À minha esposa Luanna e aos meus filhos Marília e Luan, pelo apoio, incentivo e compreensão durante esta longa caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu eterno norte e fonte maior de inspiração durante os momentos de felicidade e de aflição.

Aos meus pais Aluísio *in memoriam* e Noíta que sempre lutaram para dar a educação necessária para que eu chegassem a este estágio de minha formação profissional

À minha esposa Luanna, eterna companheira de luta diária que sempre me aceitou em todos os momentos desta longa caminhada, dando força nos momentos difíceis e estimulando sempre para que eu conseguisse completar mais esta etapa em minha vida.

Aos meus filhos Marília e Luan pela compreensão de minha ausência durante o desenvolvimento do trabalho que em muitas ocasiões sacrificaram nossos momentos de família.

Ao meu orientador Prof. Arlindo de Alencar Araripe Moura pelos seus ensinamentos que me foram dados ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao colega Dr. Carlos Eduardo e ao Zootecnista M. Sc. João Paulo Arcelino do Rego pela ajuda na execução dos trabalhos de montagem dos mapas eletroforéticos bidimensionais.

À todos que trabalham no laboratório 1085 (Bioquímica) da UFC pela aceitação e ajuda na análise de minhas amostras.

À toda equipe da Reprodução Animal (Zootecnia), Alethéia, Érica, Rodrigo, Ítalo, Micheli, David, Jorge Martins e a todos que sempre me auxiliaram direta ou indiretamente na execução do meu trabalho.

Aos professores do curso de Doutorado em Biotecnologia (Renorbio) que contribuíram para meu aprendizado durante o curso.

À banca examinadora pela atenção dispensada na correção desse trabalho.

A todas as pessoas que participaram comigo em mais esta conquista

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) pela formação durante esse curso.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Proteínas do plasma seminal de carneiros adultos Santa Inês identificadas por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF)	73
Tabela 2. Médias e desvio-padrão das características seminais avaliadas de carneiros da raça Santa Inês criados no semi-árido brasileiro	75
Tabela 3: Média e desvio padrão de parâmetros seminais de carneiros Morada Nova criados no semi-árido Nordestino.	77
Tabela 4. Proteínas do plasma seminal de carneiros adultos Morada Nova identificadas por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF)	79

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Composição dos ingredientes das dietas experimentais	112
Tabela 2. Composição química da forragem e concentrados experimentais (%) MS	112
Tabela 3. Peso corporal (kg), em cordeiros Morada Nova alimentados com dieta contendo diferentes fontes protéicas	119
Tabela 4. Parâmetros seminais de cordeiros Morada Nova alimentados com dieta contendo diferentes fontes protéicas	120

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Diagrama esquemático de aspectos da fisiologia espermática e fertilização que são potencialmente influenciadas pelas proteínas identificadas no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros adultos Holstein 16

CAPÍTULO 1

Figura 1: Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de carneiros adultos da raça Santa Inês. (A) representa o gel master gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado no pareamento de todos os geis utilizados no estudo. (B) corresponde ao gel referência (carneiro 517), do qual o gel master foi prioritariamente gerado. As proteínas foram coradas com Cromassie blue coloidal. 74

Figura 2: Localização dos spots nos mapas bidimensionais que diferiram estatisticamente ($p<0,05$) em animais de alto percentual de espermatozoides móveis (A) e baixo percentual de espermatozoides móveis (B) 76

Figura 3: Intensidade dos spots expressos diferentemente ($p<0,05$) em grupos de carneiros com alta (85 e 90%)(A) e baixa (60 a 80%)(B) motilidade espermática. Os spots referem-se aqueles mostrados nas figuras 2A e B que representa o gel master das proteínas seminais de carneiros Santa Inês que foram expressos em animais de alta e baixa motilidade respectivamente. 76

Figura 4: Mapa bi-dimensional das proteínas seminais de carneiros adultos Morada Nova. (A) Representa o gel master gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA) baseado no match set de todos os géis usados no estudo. (B) Corresponde ao mapa referência (carneiro 72), do qual o gel master foi gerado. Proteínas foram coradas com Coomassie blue. 80

Figura 5: A- Representa o gel master do plasma seminal de carneiros Morada Nova e os spots que foram mais intensos em animais de alta motilidade espermática. B- Intensidade dos spots expressos diferentemente ($p<0,05$) em grupos de carneiros com alta motilidade e que estão indicados em A. 81

Figura 6: Probabilidades de ter mais de 80% dos espermatozoides móveis estimada por regressão logística ($y = \frac{e^{a+bx}}{1+e^{a+bx}}$) dos spots que diferiram ($p <0,01$) entre os grupos de alta e baixa motilidade. 85

CAPÍTULO 2

Figura 1. Parâmetros de desenvolvimento testicular em cordeiros Morada Nova 118 alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína.

Figura 2. Mapa bidimensional de proteínas do plasma seminal de cordeiros Morada 121 Nova. A figura representa o gel master gerado pelo PDQuest (Bio Rad, EUA) e é baseada na correspondência de todos os géis utilizados no estudo. Proteínas foram coradas com Comassie blue. Setas identificam os pontos cujas intensidades foram diferentes ($p <0,05$) entre grupos de animais alimentados com dietas com farelo de soja, feno de folhas de leucena ,torta de algodão e uréia.

Figura 3. Intensidade dos spots expressos diferentemente ($p <0,05$) em grupos de animais que receberam dietas com farelo de soja, feno de leucena ,torta de algodão e uréia. Números dos spots referem-se àqueles do mapa 2-D do plasma seminal, mostrado na Figura 9 123

LISTA DE ABREVIATURAS

μg - micrograma

μl - microlitro

BSP – proteína ligante do espermatozóide

C – concentração espermática

g – gravidade

DHP – dihidroxi-pirdina

HAP – proteína com afinidade pela heparina

HBP – proteína ligadora de heparina

IA – inseminação artificial

kDa - kiloDalton

kg - quilograma

LF - lactoferrina

mA - miliAmpere

mL - mililitro

MM – motilidade massal

MMP-2 – metaloproteinase 2 da matriz

MOP – motilidade espermática progressiva

MOT – motilidade espermática

NEPHGE – eletroforese em gel de pH não equilibrado

OPN - osteopontina

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PGDS – prostaglandina D sintetase

pH – potencial hidrogeniônico

PLA2 – fosfolipase A2

PROT – concentração total de proteína no sêmen

SDS – dodecil-sulfato de sódio

Seq. - Sequência

TIMP-2 – inibidor tecidual da metaloproteinase 2

V - volt

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REVISÃO DE LITERATURA	14
Proteínas do plasma seminal e sua relação com mecanismos reprodutivos no macho	14
Proteínas envolvidas com o mecanismo de capacitação espermática	16
Proteínas com função de proteção espermática	19
Proteínas relacionadas à motilidade espermática	21
Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação espermatozóide-oócyto	23
Nutrição e Fertilidade no macho	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

CAPÍTULO 1: PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS SANTA INÊS E MORADA NOVA E ASSOCIAÇÕES COM MEDIDAS TESTICULARES E PARÂMTROS SEMINAIS.

Resumo	56
Abstract	58
INTRODUÇÃO	60
OBJETIVOS	63
MATERIAL E MÉTODOS	63
Delineamento experimental	63
Coleta e processamento do sêmen	64
Determinação da concentração de proteína total no plasma seminal	65
Eletroforese bidimensional do plasma seminal	66
Digitalização e análise dos géis	67
Digestão das proteínas	67
Espectrometria de massa - MALDI-TOF (<i>matrix-associated laser desorption ionization-time of flight</i>)/tof	68
Pesquisa em banco de dados	69
Análise estatística	69
RESULTADOS	
Carneiros da raça Santa Inês	71
Carneiros da raça Morada Nova	77

DISCUSSÃO

Carneiros da raça Santa Inês	82
Carneiros da raça Morada Nova	86
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA E DE NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO NA DIETA SOBRE O DESENVOLVIMENTO TESTICULAR, GANHO DE PESO, PARÂMETROS SEMINAIS E EXPRESSÃO PROTÉICA NO PLASMA SEMINAL DE CORDEIROS MORADA NOVA.

RESUMO	103
ABSTRACT	105
INTRODUÇÃO	107
OBJETIVOS	110
MATERIAL E MÉTODOS	111
Animais e dieta	111
Procedimentos experimentais	113
Coleta e análise do sêmen	113
Eletroforese em gel bidimensional do plasma seminal e análise dos mapas protéicos	114
Digitalização e análise dos géis	115
Análises estatísticas	116
RESULTADOS	
Peso corporal e desenvolvimento testicular	117
Parâmetros seminais	119
Proteínas do plasma seminal	120
DISCUSSÃO	124
CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
ANEXOS	138

INTRODUÇÃO GERAL

O Nordeste brasileiro detém aproximadamente a metade do rebanho ovino nacional, segundo o último senso agropecuário do PPM/IBGE (2011) de um rebanho estimado em 20 milhões de cabeças. Os problemas de fertilidade dos rebanhos são devidos na sua grande maioria a problemas na reprodução das fêmeas que podem ser influenciadas por uma grande variedade de fatores, tais como a oferta de alimentos que se torna mais escassa nos períodos secos. Diversos fatores podem influenciar a reprodução dos machos, inclusive a alimentação que tem um efeito direto sobre a atuação do eixo hipotálamo-hipofisário, sendo assim a natureza da sub-fertilidade masculina é tão complexa quanto à da fêmea (Saacke et al., 2000). Trabalhos realizados no Nordeste brasileiro mostram a compreensão do desenvolvimento reprodutivo, idade a puberdade (Souza et al., 2010), espermatogênese (Souza, 2003) e perfil protéico do plasma seminal de carneiros Santa Inês (Souza et al., 2010)

Apesar da grande quantidade de informação obtida por esses estudos sobre carneiros adaptados a tropicalidade do Brasil, nós ainda precisamos entender como os parâmetros espermáticos estão relacionados à expressão de componentes moleculares do trato reprodutivo.

A nutrição influencia diretamente a fertilidade dos ruminantes pelo suprimento de nutrientes específicos requeridos para os processos de desenvolvimento do oócito e do espermatozóide, ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário e estabelecimento da gestação. Ela também influencia a fertilidade indiretamente através do seu impacto na circulação da

concentração de hormônios e outros metabólitos nutriente sensitivos que são requeridos para o sucesso desses processos (Robinson et al., 2006). Outra dimensão da rescente pesquisa nutricional na fertilidade de ruminantes é a identificação de alimentos estratégicos que aumentem a qualidade de criopreervação do espermatozóide nos machos e respostas super-ovulatórias e qualidade embrionária em fêmeas envolvidas em programas de múltiplas ovulações e transferência de embrião.

Em face dos avanços obtidos com as pesquisas sobre marcadores moleculares da fertilidade e a importância deste tema para o setor de biotecnologia aplicada à produção animal, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias para a identificação de componentes do plasma seminal de raças ovinas e indicadores de parâmetros seminais, e potencial capacidade reprodutiva. Portanto, em um primeiro capítulo temos o objetivo de mostrar um estudo detalhado sobre a expressão das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês e Morada Nova que potencialmente estejam associados com medidas testiculares e parâmetros seminais e a qualidade reprodutiva dos animais analisados. Em um segundo estudo será avaliado o efeitos de quatro diferentes fontes de proteínas usadas na alimentação de carneiros da raça Morada Nova (Soja, feno de leucena, ureia e torta de algodão) sobre o desenvolvimento testicular e epididimal, peso corporal dos animais entre 24 e 39 semanas de vida, seu perfil protéico através da análise de mapas protéicos bidimensionais pela técnica de eletroforese do plasma seminal dos animais as 39 semanas de idade e qualidade espermática através da mensuração dos principais parâmetros seminais e de morfologia espermática.

REVISÃO DE LITERATURA

Proteínas do plasma seminal e sua relação com mecanismos reprodutivos no macho.

Após a determinação da sequência do genoma completo de muitos procariontes e eucariontes, a elucidação da função do gene/proteína é o próximo grande desafio da biotecnologia (Strzeek et al., 2005). Relatos anteriores indicam a associação empírica entre as proteínas no fluido reprodutivo e a fertilidade geneticamente comprovada em touros cujo sêmen é frequentemente inseminado. Essas associações foram derivadas do fenótipo de touros reprodutivamente normais com o escore de fertilidade de milhares de inseminações (Souza et al., 2008). Os escores de fertilidade dos touros eram positivamente correlacionados com a quantidade das proteínas osteopontina e fosfolipase A₂ no plasma seminal, negativamente correlacionada com a proteína espermadesina Z13 e mostrou uma associação quadrática com a proteína ligadora ao espermatozóide bovino (Binder of Sperm Protein) de 30 kDa (Killian, et al., 1993; Moura et al., 2006)

Comparando o perfil de expressão protéica de espermatozóides de touros de alta e baixa fertilidade para caracterizar as diferenças na fertilidade pelo nível protéico, Peddint et al (2008) mostraram que a expressão de 2051 e 2281 proteínas era específica de espermatozóides de alta e baixa fertilidade respectivamente e que 1518 proteínas eram comuns aos dois. Estudos tanto *in vivo* como *in vitro* têm indicado que as BSPs bovina e a osteopontina (OPN) estavam entre as proteínas das glândulas sexuais acessórias relacionadas à

fertilidade de touros (Souza et al., 2008). As BSPs compreendem aproximadamente 86% de todas as proteínas detectadas no fluido das glândulas sexuais acessórias de bovinos (Moura et al., 2007) e sabe-se que elas induzem o efluxo de fosfolipídeos e colesterol da membrana espermática (Manjunath e Thérien, 2002).

É comumente aceito que o espermatozóide adquire a capacidade de fertilizar o oócito *in vivo* enquanto ele está no epidídimo (Bedford, 1970; Amann e Griel, 1974), mas existem evidências que as secreções das glândulas sexuais acessórias influenciam a fisiologia espermática (Moura et al., 2007).

Funções espermáticas que podem ser afetadas pelas proteínas do plasma seminal incluem capacitação espermática e reação acrosômica (Manjunath e Thérien, 2002), motilidade (Elzanaty et al., 2002; Curi et al., 2003) e interação com o oócito (Riffo e Párraga, 1997). Secreções das glândulas sexuais acessórias são misturadas com o espermatozóide na ejaculação e contribuem para maior parte da composição e volume do sêmen. Algumas proteínas das glândulas sexuais acessórias são conhecidas por se ligarem à membrana do espermatozóide e afetam suas funções e propriedades e a depleção dessas glândulas em ratos causa redução no número e desenvolvimento embrionário (Chen et al., 2002), sugerindo que os componentes das glândulas sexuais acessórias têm uma influência importante nos eventos pós-fertilização. Em uma outra perspectiva, o fluido coletado das glândulas sexuais acessórias de touros tem sido capaz de aumentar a capacidade de penetração do espermatozóide da cauda do epidídimo (Henault et al., 1995). Essas evidências embasam a noção de que as secreções das glândulas sexuais acessórias participam em eventos chaves relacionados à função espermática, fertilização e desenvolvimento

embrionário no trato reprodutivo da fêmea (Moura et al., 2006). A discussão de como essas proteínas pode influenciar na fisiologia espermática é apresentada na figura 1 abaixo:

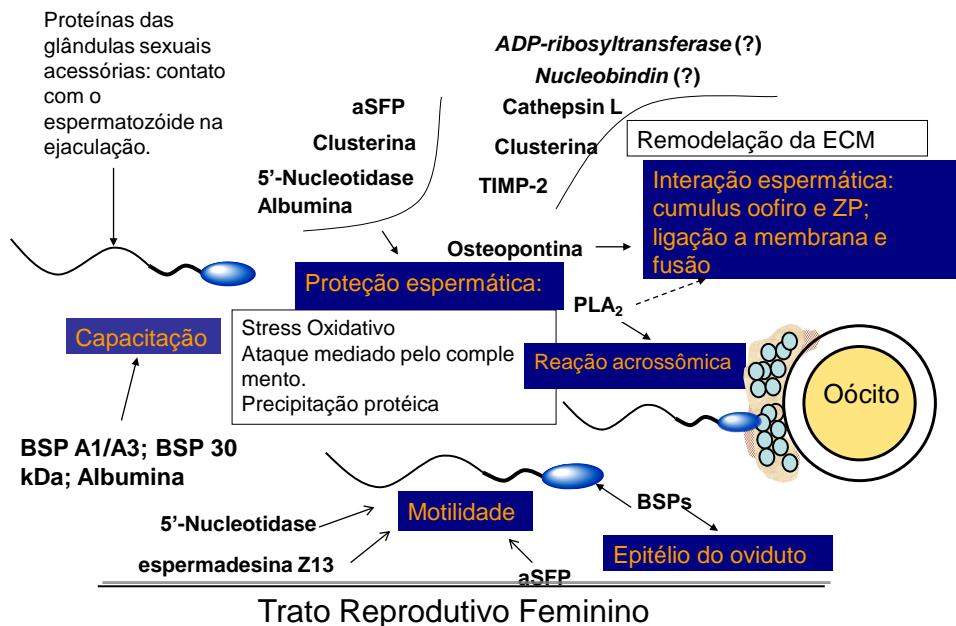


Figura 1: Diagrama esquemático de aspectos da fisiologia espermática e fertilização que são potencialmente influenciadas pelas proteínas identificadas no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros adultos Holstein (Moura et al., 2006)

Proteínas envolvidas com o mecanismo de capacitação espermática

A capacitação é um dos eventos mais precoces que ocorrem após o espermatozóide ser misturado às secreções das glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2007). O complexo de proteínas BSP (A1/A2, A3 e BSP 30 kDa) presente no fluido das glândulas sexuais acessórias são conhecidas por induzir o efluxo de colesterol da membrana espermática (Manjunath e Thérien, 2002) e juntamente com sua habilidade de mediar a capacitação espermática, a BSP

A1/A2 liga-se à células epiteliais do oviduto e parece contribuir para a formação de um reservatório espermático (Gwathmey et al., 2003). A capacitação é um processo complexo que ocorre após o espermatozóide estar presente no trato genital feminino (Martinez, P. e Morros, 1996) e tal processo envolve alterações bioquímicas e estruturais da membrana, que incluem a perda de componentes adsorvidos, alterações em sua composição lipídica e maior permeabilidade a íons (De Lamirande et al., 1997; Cross, 1998; Visconti; Kopf, 1998). O plasma seminal de inúmeras espécies contém proteínas ligadoras de fosfolipídeos, coletivamente denominadas de BSPs (*Binder of Sperm Proteins*) que são secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas e atuam na capacitação espermática (Manjunath et al., 1987, 2009; Desnoyers et al., 1993; Villemure et al., 2003; Bergeron et al., 2005; Lusignan et al., 2007). A BSP A1/A2 é a principal proteína de ligação à heparina do plasma seminal bovino, ligando-se especificamente aos colina-fosfolipídeos do espermatozóide no momento da ejaculação, mediando à capacitação pelo efluxo de colesterol e fosfolipídeos (Thérien et al., 1999). As proteínas BSP são conhecidas por se ligarem à heparina e essa ligação é um potente indutor da capacitação espermática do espermatozóide bovino (Chandonnet et al., 1990; Miller et al., 1990; Thérien et al., 1999). Estas proteínas compõem a maior parte do fluido das glândulas sexuais acessórias e do plasma seminal (Manjunath et al., 1987; Moura et al., 2006a) e, em bovinos, são denominadas BSP 1, BSP 3 e BSP 5 (Manjunath et al., 2009). Estas proteínas são estruturalmente relacionadas, compostas de peptídeos de cadeia única, acídicas, com massas moleculares variando de 15-16 kDa (BSP 1 e 3) a 28-30 kDa (BSP 5), apresentando dois domínios de fibronectina tipo II, (Esch et al., 1983; Calvete et al., 1996), os

quais lhes conferem a capacidade de se ligarem a fosfolipídeos (Moreau et al., 1998) e à heparina (Chandonnet et al., 1990). Certas proteínas do plasma seminal têm sido descritas como fatores de infertilidade (Brandon et al., 1999) enquanto outras proteínas ligadoras de heparina têm sido associadas com a fertilidade espermática (Miller et al., 1990). Homólogos dessas proteínas BSP tem sido encontrado no plasma seminal do porco (pB1; Sanz et al., 1992; Calvete et al., 1997), cavalo (HSP-1, HSP-2 e HSP-12 kDa; Calvete et al., 1996, 1997; Ménard et al., 2003), bode (GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa e GSP-22 kDa; Villemure et al., 2003) e bisão (BiSV-16 kDa, BiSV- 17 kDa, BiSV-18 kDa e BiSV-28 kDa; Boisvert et al., 2004). As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas que variam de 14 a 20 kDa, encontradas em fluidos corporais (Dennis, 1994). No trato reprodutivo, a PLA2 regula a maturação espermática e a reação acrossônica (Upreti et al., 1994), convertendo fosfolipídios em lisolipídios, como a lisolecitina. Os espermatozóides tratados com lisolecitina apresentam fusão das membranas plasmática e acrossônica durante a reação acrossônica (Roldan; Fraggio, 1993), um evento essencial para a fertilização. Estas enzimas foram detectadas no sêmen de carneiros (Roldan; Fraggio, 1993), bodes (Atreja; Gandhi, 1992) e touros (Soubeyrand et al., 1997), próxima ao acrossoma (Riffo; Parraga, 1996). No carneiro, há baixos níveis desta proteína no plasma seminal, sugerindo que a PLA2 origina-se no epidídio ou é liberada do espermatozóide (Upreti et al., 1999).

Em bodes, altas concentrações de PLA2 estão presentes no plasma seminal durante a estação não reprodutiva, com forte afinidade por heparina. Esta proteína pode estar relacionada à deterioração da qualidade seminal quando se utiliza diluidores baseados em leite. Provavelmente, estes efeitos

deletérios estão relacionados com a hidrólise de fosfolipídeos da membrana espermática pela PLA2 presente na fração protéica com afinidade pela heparina (HAP). Uma função para a PLA2 no plasma seminal na estação reprodutiva poderia estar relacionada à capacitação espermática, uma vez que sua modulação altera a fluidez da membrana espermática, o que constitui uma das etapas da capacitação (La Falci et al., 2002).

Proteínas com função de proteção espermática

O fluido das glândulas sexuais acessórias contém proteínas que intervém, tanto direta como indiretamente nos mecanismos que levam à prevenção de dano à membrana espermática e stresse oxidativo e ataque imunológico (Moura et al., 2007). A albumina absorve peróxidos lipídicos, o que contribui para seu efeito protetor tanto na membrana e motilidade espermática (Alvarez e Storey, 1995). A proteína aSPF bovina compartilha identidade com as proteínas da família das espermadesinas (Romão et al., 1997). A ligação da aSPF ao espermatozóide ejaculado ocorre mas é perdida após a capacitação (Dostalovà et al., 1994), sugerindo que diferentemente das espermadesinas suínas (Caballero et al., 2004) a proteína aSPF bovina não participa da interação espermatozóide –oócito.. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas, em parte, pelos espermatozóides, e desempenham funções ligadas à fisiologia reprodutiva (Aitken et al., 2004), porém, se produzidos em excesso, as ROS podem causar uma série de danos ao trato reprodutivo e à função espermática, culminando em infertilidade (Rao et al., 1989; Agrawal; Saleh, 2002). Para combater a ação de ROS sobre os espermatozóides, o epidídimos dispõe de diversas enzimas antioxidantes, presentes em diferentes quantidades, de acordo com a região do epidídimos, atuando sobre diferentes substratos

(Hinton et al., 1996). Dentre elas, já foram identificadas glutatona S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase e gama-glutamil-transpeptidase (Alvarez; Storey, 1983; Jeulin et al., 1989; Fouchécourt et al., 2000; Dacheux al., 2006). A glutatona peroxidase (GSHPx) constitui um dos principais meios enzimáticos de proteção espermática, ela está presente no epidídimo e no espermatozóides em diversas espécies (Perry et al., 1992; Dacheux et al., 2005). A GSHPx utiliza os hidrogênios de duas moléculas de GSH para conversão de peróxido de hidrogênio em água, produzindo uma molécula de glutatona oxidada (Halliwell; Gutteridge, 1990). Esta enzima é abundante no fluido da cauda epididimária, e também pode se ligar à membrana dos espermatozóides (Jimenez et al., 1990). A lactoferrina é uma proteína que tem a propriedade de se ligar ao ferro, é um dos principais componentes do fluido epididimal (Fouchécourt et al., 2000; Dacheux et al., 2006), chegando a compor mais de 40% do total de proteínas em algumas regiões, onde participa como agente antimicrobiano e na regulação da expressão gênica (Furmanski, 1995; Nozaki et al., 2002; Dacheux et al., 2005). Esta proteína foi identificada no plasma seminal de carneiros (Araújo, 2000), e possui a propriedade de liga-se aos espermatozóides durante o trânsito epididimário (Jin et al., 1997) ou durante a ejaculação (Thaler et al., 1990) e é provável que estes efeitos estejam relacionados à sua capacidade de seqüestrar ferro iônico, prevenindo a formação de peróxidos lipídicos, danosos à membrana espermática (Wakabayashi et al., 1999).

A clusterina é um constituinte multifuncional das secreções das glândulas sexuais acessórias e pode prevenir o dano oxidativo do

espermatozóide (Reyes-Moreno et al., 2002) ligando e aglutinando espermatozóides anormais em touros (Ibrahim et al., 1999) e humanos (O'Bryan et al., 1994) e age tipo uma chaperona, protegendo os espermatozóides dos efeitos tóxicos da precipitação protéica (Humpherys et al., 1999; Wilson e Easterbrook-Smith, 2000). A clusterina tem a capacidade de inibir a lise do espermatozóide pela ativação do sistema complemento (Jenne e Tchopp, 1989; O'Bryan et al., 1994; Ibrahim et al., 1999). Outras funções da clusterina incluem interações intercelulares (Fritz et al., 1983), maturação espermática (Jenne e Tschopp, 1989), metabolismo de lipídeos, secreção endócrina (Tenniswood et al., 1992) e remodelamento da membrana celular (Sylvester et al., 1991; Bailey; Griswold, 1999; Humphreys et al., 1999). No trato reprodutivo, a clusterina foi encontrada na próstata, glândulas vesiculares, testículo, espermatozóides luminais e epidídimos (Sensibar et al., 1993; Bailey Griswold, 1999; Braundmeier; Miller, 2001). Estas observações possibilitou a Aronow et al. (1993) a apontar que essa proteína participaria na proteção das membranas celulares expostas a moléculas hidrofóbicas potencialmente tóxicas nas barreiras fluido-teciduais. Isto pode ser importante para a proteção dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino (Rosenborg; Silkensen, 1995; Meri; Jarva, 2001).

Proteínas relacionadas à motilidade espermática

Enquanto várias alterações bioquímicas ocorrem nos gametas masculinos desde a ejaculação até à fertilização, o espermatozóide deve também atravessar o trato reprodutivo feminino para encontrar o oócito. Isso é efetuado pela combinação das contrações do trato reprodutivo da fêmea e a motilidade espermática. (Moura et al., 2007). Algumas proteínas das glândulas sexuais

acessórias têm o potencial de influenciar a motilidade espermática, incluindo BSP A1/A2 (Sanchez-Luengo et al., 2004) , aSFP (Schoneck et al., 1996) e a fosfolipase A₂ (Bao et. al.,2004). O plasma seminal possui diversos componentes capazes de afetar a motilidade dos espermatozóides. Parte destes componentes integra um sistema enzimático conhecido como Kalikreína-Cininas que na espécie bovina e ovina melhoram a motilidade espermática (Bratanov et al., 1978ab). O plasma seminal contém cininogênio, o substrato específico da enzima kalikreína (Fink et al., 1990), que ao fim da interação enzima/substrato produzem as cininas, o principal produto desta reação. As cininas ativam a motilidade espermática após a ejaculação (Schill et al., 1989). A enzima cininase II é outro componente do sistema kalikreína-cininas encontrado no plasma seminal (Miska et al., 1988). Esta enzima, identificada como enzima conversora da angiotensina 1 (ACE) (Hohlbrugger et al., 1984) é secretada pelos testículos, epidídimos e próstata (Krassnig et al., 1989) e é inespecífica com relação a seus substratos. A ACE presente no plasma seminal do carneiro é secretada pelas células germinativas e é liberada da membrana espermática ao longo do trânsito epididimal (GATTI et al., 1999). De acordo com esses estudos, utilizando 2D-PAGE, a ACE estava totalmente ausente no fluido epididimal de carneiros azoospérmicos. É possível que esta enzima atue na maturação espermática (Köhn et al., 1998), evitando ativação prematura da motilidade, mas isto ainda não foi confirmado. A atividade seminal da ACE ovina está relacionada significativamente com a concentração espermática do ejaculado. Em um estudo a campo, carneiros de baixa fertilidade tenderam a apresentar menor atividade da ACE que aqueles de alta fertilidade. Nesse caso, as ovelhas foram inseminadas cervicalmente e o índice de fertilidade foi

determinado como a proporção de ovelhas que pariram em relação ao número total de fêmeas inseminadas. Os machos com maior atividade de ACE seminal emprenharam significativamente mais fêmeas que aqueles com mais baixa atividade, confirmando os estudos *in vitro* (Métayer et al., 2001). Baseando-se nesses achados, pode-se inferir que a atividade da ACE testicular está relacionada a alguns parâmetros de qualidade seminal importantes para a fertilidade.

Proteínas envolvidas na reação acrossônica e interação espermatozóide-oóbito.

Nos mamíferos, os espermatozóides oriundos do testículo são incapazes de fertilizar o óvulo, mas eles adquirem essa habilidade durante sua passagem pelo aparelho reprodutor masculino e feminino (Austin, 1951 e Chang, M.C., 1951). Esse período requerido de condicionamento é denominado capacitação (Austin, 1951). A capacitação espermática é um múltiplo processo que envolve várias mudanças bioquímicas e ultraestruturais na membrana espermática. Essas mudanças incluem a perda de componentes absorvidos originalmente do plasma seminal, modificações na composição lipídica e aumento a permeabilidade a íons (Yanagimachi, R., 1994 e de Lamirande et al., 1997). O processo de capacitação rende ao espermatozóide a capacidade de interação com o oóbito e em consequência disso a reação acrossônica (Thérien et al., 2001). A análise do fluido das glândulas sexuais acessórias (AGF) de touros Holsten maduros revela um diverso grupo de proteínas, algumas das quais são reconhecidas em influenciar diversos mecanismos fisiológicos reprodutivos, sendo um deles a

capacitação espermática e a interação espermatozóide-oócito (Moura et al., 2006). Uma das características mais marcantes adquiridas pelos espermatozóides durante a maturação espermática é a capacidade de ligação à zona pelúcida e fertilização (Amann; Hammerstedt, 1993). Esta propriedade desenvolve-se como produto de aquisição de novas proteínas do fluido epididimal (Cooper et al., 1986) ou modificação de proteínas já existentes (Baker et al., 2005; Dacheux et al., 2006), criando sítios de ligação para estruturas oocitárias ou expondo sítios já existentes (Sullivan et al., 2005). A família das proteínas BSP são proteínas de ligação aos fosfolipídeos (BSP A1/A2, BSP-A3 e BSP-30-kDa) que são secretadas pelas vesículas seminais (Manjunath, 1984 e Manjunath e Sairam, 1987). Propriedades bioquímicas e estrutura dessas proteínas têm sido estudadas em detalhes (Manjunath, 1984 e Calvete et. al., 1996). As proteínas BSP ligam-se aos espermatozóides epididimários através da sua interação com colina-fosfolipídeos (Desnoyers e Manjunath, 1992), interagindo com fatores de capacitação espermática em bovinos, heparina (Chandomet et al., 1990) e liga-se a apolipoproteína A-I humana e apolipoproteína A-I associada com lipoproteína de alta densidade (HDL)(Manjunath et al., 1988 e 1989). Além disso, as proteínas BSP aceleram a capacitação do espermatozóide epididimário induzido por heparina e HDL sérico (Thérien et al., 1997 e 1995). Este mesmo autor anteriormente citado mostrou que a exposição do espermatozóide epididimal somente as proteínas BSP por um curto período resultou na estimulação significante do efluxo de colesterol da membrana espermática acompanhado por algum efluxo de fosfolipídeos.

O epidídimo possui uma série de glicosidases que atuam na maturação epididimal (Dacheux, 2006). Por um lado, estas atuam modificando glicoproteínas presentes na membrana espermática (Srivastava e Olson, 1991; Skudlarek et al., 1992), ativando-as ou inativando-as. Por outro lado, algumas dessas proteínas podem se ligar à membrana espermática, atuando como sítios de ligação de carboidratos. Sabendo-se que o fluido da cauda do epidídimo é rico em β -galactosidases (Skudlarek et al., 1993), e que a remoção de resíduos de β -galactose da zona pelúcida bloqueia a ligação dos espermatozóides (Mori et al., 1997), é possível que esta enzima possa ligar-se aos espermatozóides durante a maturação epididimal, funcionando como lectina (Cheng et al., 1994; Tulsiani et al., 1995). Algumas dessas enzimas, funcionando como lectinas, desempenham uma função importante no processo de fertilização, podendo, pelo menos em parte, explicar sua relação com os índices de fertilidade em bovinos (Moura et al., 2006b).

A osteopontina (OPN) é outra multifuncional proteína identificada no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros e foi originalmente descrita na matrix extracelular de tecidos ósseos (Senger et al., 1979). Moura et. al (resultados não publicados) sugerem que a osteopontina interage com a membrana do espermatozóide do ejaculado de touros e tanto afeta a interação oócito-espermatozóide, como o início do desenvolvimento embrionário. Killian et al., 1993 e Cancel et al., 1997 descreveram que mais OPN foi expressa no plasma seminal de touros de alta fertilidade comparado com os de baixa fertilidade. A análise proteômica de touros Holstein de alta-fertilidade demonstrou que tinham mais OPN no fluido de suas glândulas sexuais acessórias do que no de touros de baixa fertilidade (Moura et al., 2007). Nos

fluidos do trato reprodutivo bovino foram encontradas isoformas de osteopontina variando de 14 a 70 kDa (Erikson et al., 2007), possivelmente resultado de modificações pós-traducionais, tais como clivagem, glicosilação e fosforilação (Patarca et al., 1993; Sorensen et al., 1994; Moura, 2005). Estudos demonstraram que a intensidade do *spot* correspondente a esta proteína no plasma seminal e no fluido das glândulas sexuais acessórias está associada à fertilidade em bovinos (Killian et al., 1993; Cancel et al., 1997; Moura, 2005) e em eqüinos (Brandon et al., 1999). A osteopontina pode ser encontrada na forma solúvel ou associada à membrana celular (Patarca et al., 1993) e parece estar envolvida em diversas atividades, incluindo adesão celular, remodelamento de membranas, alterações no citoesqueleto e modulação imunológica (Denhardt et al., 1995, 2001; Mazzali et al., 2002; Denhardt, 2004). Estruturalmente, a osteopontina é uma glicoproteína fosforilada de cadeia simples ácida com extensão de 264 a 301 aminoácidos e sofrem extensiva modificações pós-traducionais que resulta em massa molecular de 25 a 75 kDa (Johnson et al., 2003). Isso resulta em uma proteína multifuncional que contém a sequência Gly-Arg-Asp-Ser (GRGDS) que se liga a integrinas da superfície celular e promove a adesão célula-célula, comunicação com a matriz extracelular da célula (ECM), migração de osteócitos e células imunes (Oldberg et al., 1986 e Somerman et al., 1987). Ela também estimula a produção de imunoglobulinas pelas células B, altera a concentração de cálcio intracelular, promove a deposição do fosfato de cálcio no osso e afeta a mineralização dos tecidos (Johnson et al., 2003). No trato reprodutivo masculino, essa proteína é expressa nas células epiteliais das ampolas e glândulas vesiculares, em espermátidies alongadas nos testículos, além do epidídimos e em espermatozoides

epididimários (Siiteri et al., 1995; Rodriguez et al., 2000). Foi demonstrado, que a OPN também se liga à membrana de espermatozóides bovinos ejaculados (Erikson et al., 2007). Considerando que a OPN é uma molécula que atua na adesão celular, esta proteína está envolvida diretamente na interação entre espermatozóide e oócito (Gonçalves et al., 2007). Uma hipótese aceita para a mediação da OPN na fertilização (Moura, 2005), é o de que, durante a ejaculação, osteopontina proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias (Rodriguez et al., 2000) se liga à membrana espermática através de integrinas, e que o complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D'cruz, 1996). Além disso, o fluido do oviduto bovino é rico em osteopontina (GABELER et al., 2003) e é possível que moléculas de OPN presentes nesse fluido também se liguem à membrana espermática.. Trabalhos recentes com fertilização *in vitro* em bovinos trazem evidências que apoiam a hipótese da participação da OPN no processo de fertilização, e mostram efeitos benéficos dessa proteína sobre o desenvolvimento embrionário inicial (Monaco et al., 2009). Moura et al.(resultados não publicados) trabalhando com imunocitoquímica e Western blots de proteínas extraídas da membrana espermática revelaram que a osteopontina liga-se ao espermatozóide do ejaculado de touros. Além disso, a incubação de oócitos bovinos intactos com fluido do oviduto que também continha osteopontina (Gabler et al., 2003) e anticorpos contra a osteopontina inibiram tanto a ligação espermatozóide-oócito e o desenvolvimento embrionário (Moura et al., resultados não publicados).

Em 1993, Killian et al., descreveram a presença de quatro proteínas associadas à fertilidade no plasma seminal bovino que parecem ter valor na predição de pequenas diferenças relativas na fertilidade de touros. A separação

por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) das amostras do plasma seminal indicaram que duas proteínas de peso molecular 26 kDa (pI 6.2) e 55 kDa (pI 4.5) ocorreram com maior freqüência em touros de maior fertilidade, enquanto duas outras proteínas adicionais (16 kDa, pI 4.1 e 16 kDa e pI 6.7) foram mais proeminentes em touros de baixa fertilidade. Neste estudo, os autores encontraram correlação significativa entre a concentração dessas proteínas no plasma seminal e a fertilidade de machos utilizados em inseminações com sêmen congelado. A prostaglandina D sintetase (26 kDa) catalisa a isomerização da prostaglandina H₂ a prostaglandina D₂ (Urade et al., 1985) e existe em duas formas distintas (Urade; Hayaishi, 2000a), uma necessitando de glutationa, e a outra independente desta (Urade et al., 1987). Fouchécourt et al. (2002) identificaram esta proteína no fluido epididimal do carneiro, com cerca de 191 aminoácidos, com massa molecular de 21,1 kDa. Estudos têm sugerido que a PGDS teria dupla função, funcionando como enzima produtora de prostaglandina D₂ intracelular, e como lipocalina após sua secreção no espaço extracelular e diversos fluidos corporais (Tanaka et al., 1997; Urade; Hayaishi, 2000b). A alta expressão da prostaglandina D sintetase é observada nos testículos e no trato reprodutivo de várias espécies, incluindo o camundongo (Hoffman et al., 1996; Gerena et al., 2000), o rato (Sorrentino et al., 1998), homem (Blodorn et al., 1996; Tokugawa et al., 1998) e bovino (Rodriguez et al., 2000; Gerena et al., 2000). Dentro do testículo, há uma aparente variação de espécie no local de expressão da prostaglandina D sintetase, pois a proteína ou o mRNA é localizado nas células de Sertoli nos touros e ratos e nas células de Leydig nos camudongos (Hoffman et al., 1996; Sorrentino et al., 1998; Gerena et al., 2000; Rodriguez et al., 2000. Utilizando *Northern Blotting* e hibridização

in situ, a expressão da PGDS foi observada em células epiteliais da cabeça, corpo e cauda do epidídimo em touros (Rodríguez et al., 2000a), mas ele mostrou-se mais abundante nas células principais da cabeça (Gerena et al., 2000). Em carneiros, PGDS mRNA foi detectado apenas na cabeça do epidídimo, e sua secreção representou cerca de 25% da quantidade total de proteínas secretadas no tecido. Semelhante ao encontrado em bovinos, sua quantidade é reduzida progressivamente durante o trânsito epididimal, atingindo um valor 5 vezes menor no fluido da cauda comparado àquele da cabeça, com alterações em suas propriedades bioquímicas (Fouchécourt et al., 1999). Nos espermatozóides, a PGDS se concentra no segmento apical do acrossoma, e parece associar-se com a membrana plasmática da cabeça do espermatozóide, uma vez que não é mais detectável em espermatozóides bovinos após reação acrossônica (Gerena et al., 2000). A castração induz redução na expressão da PGDS (Fouchécourt et al., 1999), sugerindo que andrógenos influenciam, provavelmente, a expressão gênica desta proteína ou estabilidade do RNA mensageiro.

Nutrição e fertilidade no macho

O processo de reprodução é uma função coordenada de vários tecidos, tipos celulares e sistemas regulatórios, o que é possível apenas quando os animais são providos com suficiente quantidade de nutrientes dietéticos. A indústria agropecuária depara-se com diferentes situações, como a preocupação com a nutrição protéica em diferentes países. Na maior parte dos países do terceiro mundo, os animais sobrevivem com volumosos de baixa qualidade e resíduos de colheitas que são deficientes em vários nutrientes essenciais. O

maior constrangimento de ambos os alimentos é a deficiência protéica, pois a digestibilidade da proteína bruta desses volumosos é bastante baixa. Em certos países da Ásia, da África e América, os animais geralmente pastam sem muito complemento alimentar. Além disso, a disponibilidade de nutrientes, particularmente a proteína, permanece inadequada a maior parte do ano, exceto durante a estação chuvosa ou por algum tempo após e é durante esse período que ciclos estrais regulares são normalmente exibidos (Leng, 1990)

Fotoperíodo, temperatura e nutrição são os fatores ambientais mais bem estudados que influenciam a reprodução em mamíferos. Do ponto de vista prático, a nutrição desperta uma enorme atenção, pois caso haja necessidade, os criadores podem alterá-la mesmo em rebanhos criados extensivamente, enquanto alterações de fotoperíodo ou temperatura, só podem ser realizadas em situações de manejo intensivo (Dunn, T.G. e Moss, G.E. 1992). Em carneiros machos, a atividade reprodutiva é afetada por uma série de fatores externos, incluindo manejo sócio-sexual, fotoperíodo e nutrição (Blanche et. al., 2000). Em carneiros Merino sexualmente maduros a nutrição é sem dúvida o mais poderoso desses fatores e a sua resposta pode ser dividida em efeitos de curto prazo que agem principalmente no sistema neuro-endócrino controlando a atividade testicular e efeitos de longo prazo que agem no crescimento testicular e produção espemática (Blache et al., 2000).

A influência da quantidade de proteína da dieta, sobre a fertilidade do macho bovino tem merecido o interesse de vários pesquisadores. No entanto, tem-se muita pouca informação sobre esse efeito na espécie ovina (Gonzalez, 2000). Em geral, os ovinos necessitam de no mínimo 7% de proteína bruta na dieta, para um desenvolvimento normal das bactérias e funcionamento do rúmen. A deficiência de

proteína pode ser um indicativo de algumas alterações produtivas, tais como, o decréscimo da produção de lã, queda no desenvolvimento, incluindo o reprodutivo, distúrbios imunológicos, anemia, disfagia, edema e morte. Já o excesso de proteína na dieta usualmente causa aumento no custo de produção, fator esse que pode influenciar a rentabilidade produtiva e elevação dos índices de doenças, como estresse calórico e urolitíase (Pugh, 2002). O excesso de proteína encarece e diminui o aproveitamento de energia, e o aumento excessivo pode produzir quadros toxêmicos agudos. O excesso de nitrogênio não protéico ou de proteína degradável causa intoxicação por amônia. Animais afetados apresentam disfunções nervosas como incoordenação (NRC, 1985). Dietas com níveis altos de PB, compostos nitrogenados ou a falta de substratos ruminais para a transformação completa da amônia em proteína bacteriana pode aumentar a concentração de uréia plasmática e ruminal. A uréia plasmática pode alcançar os túbulos seminíferos (Mann & Mann, 1981) e a expressão dos transportadores de uréia nos testículos pode indicar que haja alteração no processo de espermatogênese (Tsukaguchi et al., 1997). O aumento de compostos nitrogenados na dieta de touros pode prejudicar sua reprodução (Branton et al., 1947; Castillo et al. 1987). Outros pesquisadores não confirmam estes dados em touros (Rocha et al., 1995; Rocha et al. 1996) e em carneiros (Oldham et al., 1978; Thompson et al., 1972; Cortada, 2000). O aporte de nutrientes, particularmente a proteína produz aumento no metabolismo e na concentração de enzimas microssomais no fígado. Esses resultados aumentam os níveis metabólicos de estradiol, refletindo nos níveis de FSH e LH (Blanche, et al., 2000). O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) controla a função testicular associado ao LH (Hormônio Luteinizante), tendo como principais locais de atuação as células de Leydig e de Sertoli, respectivamente. O FSH atua nos túbulos seminíferos estimulando a espermatogênese e o LH estimula a produção de andrógenos principalmente da testosterona (Bettencourt,

1999). O tamanho dos testículos de carneiros Merino aumentaram quando os animais são tratados com uma dieta de alto valor biológico e diminui quando lhes é fornecida uma ração pobre nutricionalmente (Oldham et al., 1978). Essas respostas são relativas às alterações concomitantes do peso corporal e tamanho testicular detectável em poucas semanas e quando persistentes por meses, estão diretamente ligadas às mudanças nas taxas de produção espermática (Oldham et al. 1978). Uma prática comum é a suplementação dos machos por oito semanas antes do início da estação demonta, conhecido como Flushing, o que proporciona o tamanho testicular e a produção de espermatozoides no limite máximo (Martin et al., 2004). Em carneiros os espermatozoides são produzidos pelos testículos em uma taxa relativamente constante, em média, 20×10^6 espermatozoides/ g de testículo/dia (Martin et al., 2004). Esta relação também pode ser estabelecida entre o peso vivo e o tamanho testicular do carneiro. Carneiros grandes geralmente possuem testículos grandes. Particularmente cada raça tem um limite presumido de tamanho de testículo pelo potencial genético de cada carneiro, com a nutrição influenciando previamente no desenvolvimento testicular, havendo vários indícios que podem coagir este potencial. Uma observação interessante do ponto de vista prático é que o volume dos testículos dos carneiros usualmente diminui durante a estação de monta provavelmente pela redução do aporte nutricional. Entretanto, as taxas de perdas de volume testicular não são significativas do volume original ao início da estação de monta ou a relação macho / fêmea (Lyndsay et al., 1976). Na Austrália é muito comum a utilização do lupin como suplemento de alto nível energético e protéico, 16,4 MJ/Kg MS e 337,5 PB/Kg MS, respectivamente (Oldhan et al., 1978). A suplementação com lupin por alguns dias alteram a condição corporal e também o desenvolvimento testicular em carneiros, hipótese sustentada pelo estudo de Oldham et al. (1978). Desde então se tenta definir e identificar os mecanismos de

respostas metabólicas e endócrinas envolvidas. Com a existência dos dois fatores, energético e protéico, os efeitos provavelmente estão interrelacionados (Boukliq & Martin, 1997). O estímulo na secreção das gonadotropinas e desenvolvimento testicular em animais suplementados com lupin foi observado em muitos experimentos (Boukhliq, 1993). Em dois a três dias após o inicio da suplementação o primeiro sinal é um aumento na pulsatilidade do LH. A segunda resposta é que o aumento do FSH passa a ser detectável de uma semana à dez dias após o inicio da suplementação e é mantido por muitas semanas. A terceira resposta é um aumento na circunferência escrotal detectável a partir de duas semanas do inicio da suplementação (Boukhliq, 1993). Carneiros alimentados com dietas de alto nível de proteínas mostram um significante acréscimo no volume testicular e no peso corporal. Os resultados dos estudos mostram que o volume testicular é mais sensível a mudanças na dieta que o peso corporal indicando a preferência da alocação dos nutrientes no sistema reprodutivo. Isso é observado pela boa relação existente entre o balanço do nitrogênio e a resposta do desenvolvimento testicular a suplementação com lupin, sugerindo que a proteína pode ser o nutriente mais importante para o carneiro adulto (Boukliq & Martin, 1997). As evidências acerca do mecanismo de nutrição influindo na atividade reprodutiva dos carneiros podem parecer contraditórias. A hipótese que a indução nutricional para as alterações do tamanho testicular resultam das alterações nos pulsos de LH como descrito por Martin et al. (1987) também são encontradas que a suplementação protéica por nove semanas não tem interferência na secreção de LH e testosterona nem nas respostas para o GnRH ou o hCG. Porém pode-se concluir que o tamanho testicular é independente ao grau de resposta dos testículos ao LH. Lindsay et al. (1984) ratificaram que a alteração dos pulsos de LH é proporcionada pela dieta. Porém, causando pequeno efeito na circunferência e volume testiculares. As alterações nas dietas de manutenção com

acréscimo de componentes protéicos promovem a retro alimentação negativa dos hormônios testiculares para as mudanças na responsividade do hipotálamo. É possível que mudanças nas taxas de clearance hepático altere os índices de secreção que pode ter efeito potencial sobre as concentrações plasmáticas dos hormônios reprodutivos. Aumento no plano nutricional pode causar um acréscimo no clearance ou testosterona hepático liderando um decréscimo nas concentrações circulantes das gonadotropinas e por isso alterar a atividade testicular nos carneiros. (Boukliq & Martin, 1997). Martin et al. (1994) determinaram que as alterações testiculares foram induzidas pela manipulação da dieta estão associadas unicamente à secreção de gonadotropinas por alterações nas atividades do eixo hipotalâmico-hipofisário desempenhando o papel de mediador das respostas reprodutivas dos carneiros com dietas alteradas. As inconsistências entre a relação da secreção das gonadotropinas e o tamanho testicular sugerem que um mecanismo GnRH independente pode também estar envolvido. Entretanto as altas relações entre dieta, massa testicular e produção de hormônios testiculares indicam que a nutrição afeta os compartimentos somáticos e gametogênicos dos testículos, sobretudo as partes com funções endócrinas. Porém as concentrações de gonadotropinas não são as únicas responsáveis pelas alterações testiculares, sendo que as concentrações de andrógenos também se alteram. Em carneiros adultos a imunização ativa anti-GnRH resulta em regressão testicular. Entretanto esses efeitos são neutralizados por um plano de aporte nutricional (Hotzel et al., 1992) sugerindo que o efeito da nutrição no desenvolvimento testicular seja parcialmente independente das alterações nas secreções de gonadotropinas indicando presença de mecanismos GnRH dependentes e independentes, podendo exibir que as alterações protéicas na dieta afetam o desenvolvimento testicular mesmo sem a alteração das gonadotropinas. Com isso pode ser sugerido que o FSH é mais importante que a LH nestes efeitos (Hotzel et al.,

1997). A interferência da proteína na dieta sobre a produção espermática foi relatado por Lindsay et al. (1979). Assim, carneiros mantidos em um alto nível de proteína na dieta, produziram maior número de espermatozóides do que carneiros mantidos em regime alimentar deficiente (26×10^6 v.s. 18×10^6 espermatozóides / grama de peso testicular / por dia). González et al. (2000), não encontraram diferenças na qualidade seminal em animais tratados com diferentes níveis protéicos, porém houve diferença na concentração de uréia plasmática e de uréia no plasma seminal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **The Urologic Clinics of North America**, Amsterdam, v. 29, p. 817-827, 2002.
- AITKEN, R.J. et al. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 36, p. 994-1010, 2004.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.42, 585 334-346, 1995.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 28, p. 1129-1136, 1983.
- AMANN, R.P. & GRIEL, L.C. (1974) Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymides and ejaculated semen. **J. Dairy Sci.** 57, 212-219.
- ARAÚJO, A.A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle.** Tours. L'Universite François-Rabelais de Tours. These de Doctorat. 200p, 2000.
- ARONOW, B.J. et al. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.90, p.725-729, 1993.
- ATREJA, S.K.; GANDHI, K.K. Goat sperm phospholipases. **Indian Journal of Dairy Science**, Karnal, v.45, p.246, 1992.

AUSTIN CR (1951). Observations on the penetration of sperm in the mammalian egg.

Aust J Sc. Res (B) 4, 581-596.

BAILEY, R.; GRISWOLD, M.D. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.151, p.17-23, 1999.

BAO, S. et al. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 38194-38200, 2004.

BEDFORD, J. M. Sperm capacitation and fertilization in Mammals . **Biology of Reproduction**, Madison, v2 (suppl2): 128–158, 1970.

BERGERON A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.71, 461–470, 2005.

BLANCHE et al., 2000. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep.

Journal of Reproduction and Fertility (2000) 120, 1-11

BLODORN B, MADER M, URADE Y, HAYASHI O, FELGENHAUER K AND BRUCK W (1996) Choroid plexus: the major site of mRNA expression for the betatrace protein (prostaglandin D synthase) in human brain. **Neuroscience Letters** 209 117–120

BOISVERT et al., 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biol Reprod** 70:656-661.

BOUKHLIQ, R.; MARTIN, G.B. Nutrition and reproduction in the ram in amediterranean environment, **CIHEAM - Options Méditerranéennes** p.227-232, 1997.

BRANDON, C.I. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, Amsterdam, v.52, p.863-873, 1999.

BRANTON, C.; BRANTON, R.W.; SALISBURY, G.W. Total digestible nutrients and protein levels for dairy bulls used in artificial breeding. **Journal of Dairy Science**, v.XXX, n.12, p.1003-13, 1947.13

BRATANOV, K. et al. Effect of kallikrein on bull sperm motility in vitro. **Journal of Fertility**, v.23, p.73-75, 1978a.

BRAUNDMEIER, A.G., MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.84, p.1915-1925, 2001.

CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., GIL, M.A., CALVETE, J.J., ROCA, J., SANZ, L., PARRILLA, I., GARCIA, E.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., MARTINEZ, E.A., 2004. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? **J. Androl.** 25, 1004–1012.

CALVETE J. et al. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.407, p.201–6, 1997.

CALVETE, J.J. et al. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.399, p.147-152, 1996.

CAMERON AWN, MURPHY PM, OLDHAM CM (1988). Nutrition of rams and output of spermatozoa. **Proc Aust Soc Anim Prod** 17, 162-165

- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v.57, p.1293-1301, 1997.
- CASTILLO, E.; TIZOL, G.; ALVAREZ, J.L.; PEREZ, M.; BAEZ, R. Reduction of the protein concentrate level in the ration for Holstein sires. I. Effect of semen quality. **Cuban Journal Agricultural Science**, v.21, n.3, p.247-50, 1987.
- CHANDONNET, L. et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 26, p. 313-318, 1990.
- CHANG MC (1951). Fertilization capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature** 168, 697-698.
- CHEN, H., CHEUNG, M.P.L., CHOW, P.H., CHEUNG, A.L.M., LIU, W., O, W.S. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v. 124, p. 491–499, 2002.
- CHENG, A. et al. Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 125, p. 867-878, 1994.
- CORTADA, C.N.M.; LUCCI, C.S.; GONZALEZ, R.A.F; VALENTIN, R.; MATTOS, C.B. Plasma urea levels on reproductive parameters of wool-less rams (*Ovis aries*, LINNAEUS, 1758)* **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.37 n.6 SãoPaulo dez. 2000.
- CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Madison, v.59, p.7-11, 1998.
- D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 1, p. 161-176, 1996.

- DACHEUX, J.L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, p.319–341, 2005.
- DACHEUX, J.L. et al. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 250, p. 36-42, 2006.
- DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.3, p.175-194, 1997.
- de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1999
- DENHARDT, D.T. et al. Osteopontin-induced modifications of cellular functions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.760, p.127-142, 1995.
- DENHARDT, D.T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10-12, 2002. **Calcified Tissue International**, New York, v.74, p.213-219, 2004.
- DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annual Reviews on Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 41, p. 723-749, 2001.
- DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.269, p.13057-13060, 1994.
- DESNOYERS L, MANJUNATH P. Interaction of a novel class of phospholipid-binding protein of bovine seminal fluid with different affinity matrices. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v.305, p.341–349, 1993.
- DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; TÖPFER-PETERSEN, E. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AWN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda v.376, p.237–242, 1995.

- DUNN, T. G. and MOSS, G. E. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **Journal of Animal Science**, 70:1580-1593, 1992.
- ELZANATY, S., RICHTHOFF, J., MALM, J., GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2904–2911, 2002.
- ERIKSON, D.W. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, Bristol, v.133, p.909-917, 2007.
- ERIKSON, D.W.; KILLIAN, G.J. Evidence for binding of osteopontin from oviductal fluid to epididymal spermatozoa of the rat. **The Biochemical Journal**, London, v.156, p.527-537, 1976.
- ESCH F.S. et al. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v.113, p.861–867, 1983. 74
- FINK, E., SCHILL, W.B., MISKA, W. Kinin-containing kininogen activity in blood plasma, urine and saliva. **Advances in Experimental Medical Biology**, v.247, p.311-316, 1990.
- FOUCHÉCOURT, S. et al. Mammalian lipocalin-type prostaglandin D-2 synthase in the fluids of the male genital Tract: Putative biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, Madison, v.66, p.458-467, 2002.
- FOUCHÉCOURT, S. et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, Madison, v.62, p.1790-1803, 2000.

FOUCHÉCOURT, S. **Protéines epididymaires chez l'étalon; caractérisation d'une spécifique de la région antérieure: la prostaglandine D2 synthétase, approche fonctionnelle et étude comparée chez d'autres mammifères.** Tours. L'Université François-Rabelais de Tours. These de Doctorat. 183p., 1999. 75

FRITZ, I.B. et al. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. **Biology of Reproduction**, Madison, v.28, p.1173-1188, 1983.

function in sheep. **Tese (Doutorado)**, The University of Western Australia., 1993

FURMANSKI, P.H.J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. **Nature**, London, v.23, p.721-724, 1995.

GABLER, C.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. **Reproduction, Bristol**, v. 126, p. 721-729, 2003.

GATTI, J.L. et al. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. **Biology of Reproduction**, Madison, v.60, p.937-945, 1999.

GERENA, R.L. et al. Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v.62, p.547-556, 2000.

GONÇALVES, R.F.; WOLINETZ, C.D.; KILLIAN, G.J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (αv and $\alpha 5$) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 67, p. 468-474, 2007.

- GONZALEZ, R.A.F.; LUCCI, C.S.; CORTADA, C.N.M.; MAZZA-RODRIGUES, P.H.; RODRIGUES, R.R. Efeitos do nível de nitrogênio na dieta sobre características do sêmen de ovinos **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.37 n.5, 2000.
- GWATHMEY, T.M. et al. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, Madison, v.69, p.809-815, 2003.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 280, p. 1-8, 1990.
- HENAUT, M.A. et al. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.52, p.390-397, 1995. 78
- HINTON, B.T. et al. The role of the epididymis in the protection of the spermatozoa. **Current Topics in Developmental Biology**, Amsterdam, v. 33, p. 61-102, 1996.
- HOFFMANN A, BACHNER D, BETAT N, LAUBER J AND GROSS G (1996). Developmental expression of murine b-trace in embryos and adult animals suggests a function in maturation and maintenance of blood–tissue barriers. **Developmental Dynamics** 207 332–343
- HOHLBRUGGER, G., PSCHORR, J., DAHLHEIM, H. Angiotensin I-converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, Amsterdam, v.41, p.324-325, 1984.
- HÖTZEL, M.J., MARTIN, G.B. AND CARATY, A.. Effect of nutrition on testicular growth in rams immunized against GnRH. In: **Proceedings of the Endocrine Society of Australia**, 35: 87, 1992

HOTZEL, M.J.; CARATY, A.; MARTIN, G.B. Effects of nutrition on testicular growth in mature Merino rams actively immunized against GnRH. **J. Reprod. Fertil.** v.110, p. 307-313, 1997.

HUMPHREYS, D.T. et al. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, p.6875-6881, 1999.

IBRAHIM, N.M. et al. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.20, n.2, p.230-240, 1999.

JENNE, D.E., TSCHOPP, J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein-2, a constituent of rat testis fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.86, p.7123-7127, 1989.

JEULIN, C. et al. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, Malden, v. 24, p. 185-196, 1989.

JIMENEZ, C. et al. Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. **Biology of the Cell**, London, v. 68, p. 171-174, 1990.

JIN, Y.Z. BANNAI, S; DACHEUX, F; DACHEUX, J.L; OKAMURA, N. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 47, p. 490-496, 1997.

JOHNSON GA, BURGHARDT RC, BAZER FB, SPENCER TE. 2003. Osteopontin: roles in implantation and placentation. **Biol Reprod**, 69:1458-1471.

- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KÖHN, F.M. et al. Effect of angiotensin converting-enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. **Andrologia**, Berlin, v.30, p.207-215, 1998. 81
- KRASSNIGG, F. et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) of human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.12, p. 22-28, 1989.
- LA FALCI, V.S.N. et al. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, Amsterdam v.57, p.1035-1048, 2002.
- LENG, R.A. (1990). Nutrition of ruminant at pasture in the tropics: implications for selection criteria. **Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Edinburg, U.K. pp 298-309.
- LINDSAY, D.R., GHERARDI, P.B. E OLDHAM, C.M. The effect of feeding a high protein supplement before joining on testicular volume of rams. In: **Sheep Breeding**, 571-575. Butterworths, London, UK. ,1979. 14
- LINDSAY, D.R., GRAY, S.J., OLDHAM, C.M. E PEARCE, D.T. (1984). The single injection of progesterone: Alternative methods for synchronisation of ewes in spring using the “ram effect”. **Anim. Prod. Aust.**, 15: 158-170.
- LUSIGNAN, M.F. et al. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 76, p. 424-432, 2007.
- MANJUNATH, P., THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109–119, 2002.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, New York, v. 7, p. 231-238, 1987.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 53, p. 109-119, 2002.

MANJUNATH, P; LEFEBVRE, J; JOIS, P.S; FAN, J; WRIGHT, M.W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.80, p.394-397, 2009.

MANN, T.; MANN, C.L. Male reproductive function and semen. **Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology**. Berlin : Spring- Verlag, 1981. 495p.

MARTIN, G.B. SUTHERLAND, S.R.D., LINDSAY, D.R. Effects of nutritional supplements on testicular size and secretion of LH and testosterone in Merino Booroola rams. **Anim Reprod. Sci.**v.12, p.267-81,1987.

MARTIN, G.B., RODGER, J., BLACHE, D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. **Reprod. Fertil. and Dev.**v.16, p.491-501, 2004.

MARTIN, G.B., TJONDRONEGORO, S., BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. **J. Reprod. and Fertil.**, v.101, p.121-128,1994.

MARTINEZ, P.; MORROS, A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. **Frontiers in Bioscience**, Albertson, v. 1, p. 103-117, 1996.

MAZZALI, M. et al. Osteopontin: a molecule for all seasons. **QJM: An International Journal of Medicine**, Oxford, v. 95, p. 3-13, 2002.

MÉNARD M. et al., 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-bnding proteins reveals the presence of a novel member of this family

- of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 66:349-357.
- MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, London, p.1-7, 2001.
- MÉTAYER, S. et al. Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of angiotensin I-converting enzyme. **Biology of Reproduction**, Madison, v.65, p.1332-1339, 2001.
- MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v.42, p.899-915, 1990.
- MISKA, W., CROSECK, H., SCHILL, W.B. Kininase II from human seminal plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.369, p.493-496, 1988.
- MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on invitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v.71, p.450-457, 2009.
- MORI, E.; MORI, T.; TAKASAKI, S. Binding of mouse sperm to β -galactose residues on egg zona pellucida and asialofetuin-couple beads. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 238, p. 95-99, 1997.
- MOTA, E.C.; SANTOS, A.M.; TOSTE, F.P; SAMPAIO, F.J.B.; RAMOS, C.F. Effects of malnutrition in the testis. **Brazilian Journal of Urology**, v 27, p.500-506, 2001.
- MOULE GR, BRADEN AWH, LAMOND DR (1963) The significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production. **Anim Breed Abstr** 31, 139-157
- MOURA A, DORÉ JR. JJ, EBERHARDT DM, ERICKSON BH, GODKIN JD. Immunolocalization of retinol-binding protein (RBP) and profiles of RBP mRNA as related to testicular development in the beef bull. **Domestic Animal Endocrinology**. v.15, p.35-44, 1998.

MOURA AA. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Anim. Reprod.** v.2(1), p.3-10, 2005.

MOURA, A. A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 214-222, 2007.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 201–211, 2006.

MOURA, A.A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.98, p.169-188, 2007a.

MOURA, P.P. et al. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do semen criopreservado em ovinos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL- NRC. Nutrient Requirements of Sheep. 6ed. **National Academy of Sciences**, 99p. Washington, D.C., 1985.

NOZAKI, A. et al. Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C. **Nippon Rinsho**, Tokyo, v.60, p.819-829, 2002.

O'BRYAN, M.K., MALLIDIS, C., MURPHY, B.F., BAKER, H.W., 1994. Immunohistological localization of clusterin in the male genital tract in humans and marmosets. **Biol. Reprod.** 50, 502–509.

- OLDHAM, C.M.; ADAMS, N.R.; GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D.R.; MACKINTOSH, J.B. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, n.1, p.173-9, 1978.
- Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. **Tese (Mestrado)**. Faculdade PATARCA, R.; SAAVEDRA, R. A.; CANTOR, H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. **Critical Reviews in Immunology**, Redding, v.13, p.225-246, 1993.
- PERRY, A.C. et al. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. **The Biochemical Journal**, London, v. 285, p. 863-870, 1992.
- PPM/IBGE**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em: 23 de março de 2011.
- PUGH, D.G. Sheep and Goat Medicine. Saunders, Philadelphia, 2002.
- RAO, B. et al. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, Malden, v. 24, p. 127-134, 1989.
- REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Characterization of cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.63, p. 500–509, 2002.
- RIFFO, M. S.; PARRAGA, M. Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine. **Journal of Experimental Zoology**, Malden, v.275, p.459-468, 1996.

- RIFFO, M., PÁRRAGA, M. Role of phospholipaseA2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. **Journal of Experimental Zoology**, v.79, p.81–88, 1997.
- ROBINSON J.J. et al. **Nutrition and fertility in ruminant livestock.** Animal Feed Science and Technology.126 (2006) 259-276
- ROCHA, A.; CARPENA M.; TRIPPLETT, B.; FORREST, D.W.; RANDEL, R.D. Effect of ruminally undegradable protein from fish meal on growth and reproduction of peripuberal Brahman bulls. **Journal of Animal Science**, v.73, n.4, p.947- 53, 1995
- ROCHA, A.; CARPENA M.; TRIPPLETT, B.; NEUENDORFF, D.A.; FORREST, D.W.; RANDEL, R.D. Testicular and epididymal function during the peripuberal period in Brahman bulls receiving various amounts of protein degradable in the rumen. **Theriogenology**, v.45, n.2, p.477-88, 1996.
- RODRÍGUEZ, C. M.; DAY, J. R.; KILLIAN, G. J. Expression of the lipocalin-type prostaglandin D synthase gene in the reproductive tracts of Holstein bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.120, p.303-309, 2000a.
- ROLDAN, E. R. S.; FRAGIO, C. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, p.13962-13970, 1993.
- ROMÃO et al., 1997. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (asfp) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. **J. Mol. Biol.** 274, 650-660.
- ROSENborg, M. E.; SILKENSEN, J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. **International Journal Biochemistry and Cell Biology**, London, v.27, p.633-645, 1995.

SAACK RG, DALTON JC, NADIR S, NEBEL RL, BAME JH: Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal reproduction science** 2000, 60-61: 663-677.

SANCHEZ-LUENGO, S. et al. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 25, n. 2, p. 234-244, 2004.

SANZ, L. et al. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. **European Journal of Biochemistry**, Malden, v.205, p.645–652, 1992.

SAUDERS, P.T.K., 2003. **Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis**. Reprod. Suppl.61, 91-101.

SCHILL, W.B. et al. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: FRITZ, H., SCHIMIDT, I., DIETZE, G. (Eds), **The kallikrein-kinin system in health and disease**. Braunschweig, 1989, p.171-203.

SCHÖNECH, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Amsterdam v.45, p.633-642, 1996.

SENGER, D.R., WIRTH, D.F., HYNES, R.O., 1979. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. **Cell** 16, 885–893

SENSIBAR, J. A. et al. Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis and epididymis of rats. **Biology of Reproduction**, Madison, v.49, p.233-242, 1993.

SIITERI, J. E. et al. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 40, p. 16-28, 1995.

- SKUDLAREK, M. D. et al. β -D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 49, p. 204-213, 1993.
- SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v.198, p.200-205, 1994. 91
- SORRENTINO C, SILVESTRINI B, BRAGHIROLI L ET AL. (1998) Rat prostaglandin D2 synthetase: its tissue distribution, changes during maturation, and regulation in the testis and epididymis **Biology of Reproduction** 59 843–853
- SOUBEYRAND, S. *et al.* Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.272, p.222-227, 1997.
- SOUZA C.E.A.; ARAÚJO, A.A.; OLIVEIRA, J.T.A. et al. Reproductive Development of Santa Inês Rams During the First Year of Life: Body and Testis Growth, Testosterone Concentrations, Sperm Parameters, Age at Puberty and Seminal Plasma Proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.644-653, 2010.
- SOUZA, C.E.A, MOURA, A.A, MONACO, E, KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins BSP A1/A2, BSP 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim. Reprod. Sci.** v.105, p.72-89, 2008.
- SOUZA, C.E.A., 2003. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: gonadal development, sperm production, age at puberty and seminal plasma proteins. M.Sc. Thesis, Department of Animal Science, Federal University of Ceará, Brazil (in Portuguese with English Abstract).

SRIVASTAVA, A.; OLSON, G. E. Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 29, p. 357-364, 1991

STRZEŽEK, JERZY, PAWEŁ WYSOCKI, WŁADYSŁAW KORDAN, MAGDALENA KUKLIŃSKA, MARZENA MOGIELNICKA, DANIEL SOLIWODA, LEYLAND FRASER. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction1. **Reproductive Biology**, 2005.

SYLVESTER, S. R.; MORALES, C.; OKO, R.; GRISWOLD, M. D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**, Madison, v.45, p.195-207, 1991.

TANAKA, T. et al. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (□-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.272, p.15789-15795, 1997.

TEIXEIRA, J.C. Minimização das perdas de nitrogênio em ovinos. In: **Nutrição de Ovinos**, Ed. Funep, Jaboticabal, 1996.

TENNISWOOD, M. P. et al. Active cell death in hormone-dependent tissues. **Cancer Metastasis Reviews**, New York, v.11, p.197-220, 1992.

THALER, C. J.; VANDERPUYE, O. A.; MCINTYRE, J. A.; FAULK, W. P. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v.43, p.712–717, 1990.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v.61, p.590-598, 1999.

THIÉRY JC and MARTIN GB (1991). **Neurophysiological control of secretion of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep – a review** *Reproduction Fertility and Development* 3 137-173.

THOMPSON, L.H.; GOODE, L.; MYERS, R.M.; LINNERUD, A.C. Effect of urea on semen quality and fertility of ruminant males. **Journal of Animal Science**, v.35, n.1, p.195, 1972.

TOKUGAWA Y, KUNISHIGE I, KUBOTA Y ET AL. (1998) Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. **Biology of Reproduction** 58 600–607

TSUKAGUCHI, H.; SHAVAKUL, C.; BERGER, U.V.; TOKUI, T.; BROWN, D.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of the urea transporter UT3: localization in rat kidney and testis. **Journal of Clinical Investigation**, v.99,n.7, p.1506-15, 1997

TULSIANI, D.R.P. et al. Purification and characterization of two forms of β -D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). **The Biochemical Journal**, London, v.365, p.41-50, 1995.

UPRETI, G.C. et al. Characterization of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. In: International Symposium on Spermatology, 7, 1994, Cairns. **Proceedings....**, Cairns, 1994. v. 9, p. 32, 1994.

UPRETI, G.C. et al. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.56, p.107-121, 1999.

- URADE, Y. et al. Biochemical and immunological characterization of rat spleen prostaglandin D synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.3820-3825, 1987.
- URADE, Y., HAYAISHI, O. Prostaglandin D synthase: structure and function. **Vitamins and Hormones**, Amsterdam v.58, p.89-120, 2000a.
- URADE, Y.; HAYAISHI, O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1482, p.259-271, 2000b.
- VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v.1, p.39-50, 2003.
- VISCONTI, P.E., KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Madison, v.59, p.1-6, 1998.
- WAKABAYASHI, H. et al. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.63, p.955-957, 1999.
- WILSON, M. R.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. **A Journal of the International Biometric Society**, Texas, v.25, p.95-98, 2000.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, Cambridge, v.3, p.371-372, 1994.

Capítulo 1: Proteínas do plasma seminal de carneiros das raças Santa Inês e Morada Nova e associações com medidas testiculares e parâmetros seminais

RESUMO

O Nordeste brasileiro possui aproximadamente quase metade do rebanho ovino brasileiro, estimado em vinte milhões de animais. Das raças aqui criadas, destacam-se as raças Santa Inês e Morada Nova que têm bom desenvolvimento corporal, ganho de peso e boa adaptação ao clima tropical. Recentemente mostrou-se o perfil protéico de carneiros maduros através das técnicas de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa, onde várias proteínas foram identificadas, entre elas as RSVPs 14 e 22 kDa, pertencentes à família das BSPs e as bodesinas – 1 e 2, que fazem parte da família das espermadesinas, bem como as alterações que sofre o perfil protéico do plasma seminal dos animais durante o desenvolvimento reprodutivo, simultaneamente a mudanças nos parâmetros de motilidade e concentração espermática, embora a associação entre a expressão protéica dessas proteínas com parâmetros reprodutivos e medidas testiculares ainda não tenham sido feitas no nordeste do Brasil. Amostras de sêmen foram coletadas de 21 carneiros adultos Santa Inês e 11 da raça Morada Nova com normalidade reprodutiva e idade média de dois anos. O plasma seminal foi obtido através da centrifugação e submetido à eletroforese bidimensional, sendo os spots que diferiram estatisticamente entre os grupos de animais de alta (G1) e baixa motilidade (G2) digeridos com tripsina e submetidos a espectrometria de massa e pesquisa em banco de dados para identificação. Os géis foram corados com Cromassie coloidal, digitalizados e analisados no aplicativo PDQuest e as quantidades dos spots estimados quantitativamente. Avaliaram-se, então, associações estatísticas entre estas variáveis e

os parâmetros reprodutivos como, circunferência escrotal (CE), percentual de células móveis (PEM) e total de defeitos espermáticos maiores (TDM) dos animais Santa Inês e Circunferência escrotal (CE), Motilidade Individual Progressiva (MIP), Percentual de células móveis (PEM), Concentração espermática (CONC) e Motilidade Massal (MM) para os animais Morada Nova. Em média foram detectados $236 \pm 7,65$ spots por gel, de acordo com o pareamento gerado pelo aplicativo PDQuest para a raça Santa Inês e $261 \pm 15,09$ spots por gel do plasma seminal dos animais Morada Nova, variando entre 182 e 375 spots por gel. Para a raça Santa Inês um total de 63 spots foi identificado consistentemente em todos os géis, o que representou 41,5% da intensidade todos os spots detectados. Para os animais Morada Nova, um total de 98 spots foram detectados de forma consistente em todos os géis. A intensidade desses spots somou 60,82% da intensidade de todos os spots mostrados no gel master. Foi observado a grande expressão de proteínas de baixo peso molecular (14,5 a 18,4 kDa) e pI variando de 4,2 a 5,9 para a raça Santa Inês. Do total médio de 236 spots encontrados, treze spots apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais de alta e baixa motilidade, sendo dez spots mais intensos em animais de alta motilidade e três em animais de baixa motilidade. Após digestão dos spots e identificação por espectrometria de massa esses spots foram identificados como as proteínas Arilsulfatase A e Zinco alfa 2 glicoproteína, mais intensas no G1 e RSVP-22 e Bodesina-2 com maior expressão no grupo G2. Para a raça Morada Nova, quatro spots apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para o parâmetro percentual de células móveis (PEM). Após digestão dos spots e identificação por MALDI-Tof-Tof, foram identificadas as proteínas RSVP-14, RSVP-22, Proteína α -1 do complexo-t e aldose redutase, sendo todas mais intensas em animais de alta motilidade (G1).

Palavras chaves: carneiros, proteínas, plasma seminal

ABSTRACT

The Brazilian Northeast has about almost half of Brazilian sheep livestock, estimated at twenty million animals. The races created here, Santa Ines and Morada Nova stand out because they have good physical development, weight gain and good adaptation to the tropical climate. Recently showed the protein profile of mature rams through the techniques of two-dimensional electrophoresis associated with mass spectrometry, which several proteins have been identified, including those RSVPs 14 and 22 kDa, belonging to the family of BSPs and bodesinas - 1 and 2, that are part of the family of espermadesinas as well as the changes suffered by the protein profile of seminal plasma of animals during reproductive development, while changes in the parameters of sperm concentration and motility, although the association between the protein expression of these proteins with reproductive parameters testicular and measures have not yet been made in northeastern Brazil. Semen samples were collected from twenty-one adult sheep Santa Ines and eleven Morada Nova with normal reproductive and mean age of two years and seminal plasma was obtained by centrifugation and subjected to two-dimensional electrophoresis, and the spots that differed significantly between the groups of animals from high (G1) and low motility (G2) were digested with trypsin and subjected to mass spectrometry and research database for identification. The gels were stained with colloidal Cromassie, scanned and analyzed with PDQuest application and quantity of the spots quantitatively estimated. Evaluated, then, statistical associations between these variables and the reproductive parameters scrotal circumference (EC), percentage of motile cells (PEM) and total sperm defects (MDD) of the animals Santa Inês and scrotal circumference (EC) motility individual rogressive (MIP), percentage of motile cells (PEM), Sperm concentration (CONC) and Massal motility (MM) for the animals Morada Nova. Were detected on average 236 ± 7.65 spots per gel, according to the pairing generated by PDQuest application to the Santa Ines and 261 ± 15.09 spots per gel in the seminal plasma of animals Morada Nova, ranging between 182 and 375 spots gel. For Santa Inês a total of 63 spots were identified consistently in all gels, which represented 41.5% of all spots detected intensity. For Morada Nova animails, a total of 98 spots were detected consistently in all gels. The intensity of these spots amounted to 60.82% of the intensity of all spots shown on the master gel was observed a great expression of proteins of low molecular weight (14.5 to 18.4 kDa) and pI ranging from 4.2 to 5, 9. to Santa Ines. The

average total of 236 spots found thirteen spots showed significant difference ($p < 0.05$) between animals of high and low motility, being more intense ten spots in animals with high motility and three in animals with low motility. After digestion of spots and identification by mass spectrometry these spots were identified as proteins Arylsulfatase A and zinc alpha 2 glycoprotein more intense in G1 and RSVP-22 and Bodesina with higher expression in G2. For the Morada Nova race, four spots showed significant difference ($p < 0.05$) for the parameter percentage of motile cells (PEM). After digestion of spots and identification by MALDI-TOF-TOF, we identified as proteins, RSVP-14, RSVP-22, a protein α -1 of t-complex and aldose reductase, which are all more intense in animals with high motility (G1)

Key Words: rams, proteins, seminal plasma

INTRODUÇÃO

De acordo com o último senso agropecuário do PPM/IBGE (2011), o efetivo ovino do Brasil é composto por quase 20 milhões de ovinos. Na região Nordeste são criados 9.566.968 milhões de cabeças, perfazendo um total de 56,9% do rebanho nacional. Os maiores criatórios são encontrados nos estados da Bahia (3,03 milhões/cabeças), Ceará (2,07 milhões/cabeças), Pernambuco (1,48 milhões/cabeças) e Piauí (1,38 milhões/cabeças). Nesta região predominam os genótipos deslanados. Estudos relataram que cerca de 60 a 70% dos ovinos criados na região Nordeste, pertencem à categoria sem padrão racial definido (SPRD) seguido dos grupos genéticos Santa Inês, Morada Nova e Somalis Brasileira. Apesar dos números absolutos do rebanho nacional, os índices de fertilidade do rebanho ovino deslanado ainda necessitam de incrementos significativos para que os sistemas de produção dos rebanhos ovinos de corte atinjam índices confortáveis de rentabilidade e competitividade no mercado mundial. Em grande parte, os problemas de fertilidade deve-se a aspectos da fisiologia e manejo reprodutivo das matrizes, agravados por aspectos nutricionais e/ou ambientais desfavoráveis. No entanto, os machos também influenciam este quadro dado que estudos realizados com bovinos mostram que o percentual de reprodutores definitivamente inférteis e subférteis definitivos ou temporários em serviço de monta natural no Brasil são elevados (Fonseca, 1989; Fonseca et al., 1997; Moraes et al., 1998). A infertilidade no macho é o maior problema para a reprodução de mamíferos (Peddinti et. al, 2008). A natureza da sub-fertilidade devido ao macho é tão complexa quanto a da fêmea (Saacke et al., 2000). A infertilidade devido a fatores relacionados ao macho contribui com a proximadamente 40% da infertilidade em humanos (Peddinti et

al., 2008). Por essa razão é bastante importnte investigar os fatores que afetam a fertilidade masculina (Peddinti et al., 2008)

O desenvolvimento de programas de melhoramento genético da população de ovinos da região Nordeste pode vir a aumentar os índices produtivos a médio e longo prazo, mas tais programas dependem de estratégias e tecnologias eficientes para disseminação dos genótipos de interesse, como a transferência de embriões (TE) e inseminação artificial (I.A.). Entretanto, o sucesso destas biotecnologias depende de métodos de processamento de sêmen que garantam a viabilidade das células após resfriamento ou criopreservação, evitando uma capacitação prematura e perda da função. Estudos apontam as ações de diversas proteínas encontradas no sêmen na aquisição e conservação da capacidade fecundante e descreveram a ligação de proteínas da vesícula seminal a espermatozoides nos mamíferos (Carballada e Esponda, 1998). Entretanto os resultados dessas interações foram contraditórios e pareciam variar entre as espécies, induzindo a capacitação de células de ratos (Manco e Abrescia, 1988; Metafora et al, 1988; Peitz, 1988) e inibindo em camundongos (Huang et al, 2000).

Em bovinos, altos índices de fertilidade estão associados com a quantidade das proteínas osteopontina e fosfolipase A2 (PLA2) no plasma seminal, negativamente correlacionada com a espermadesina Z13 e mostrou uma associação quadrática com a proteína bovina do plasma seminal (BSP) 30 kDa (Killian et al., 1993; Moura et al., 2006b). Estas proteínas provavelmente influenciam a fertilidade dos touros de várias formas dado que as mesmas participam de diversas fases do processo de fertilização, desde a capacitação espermática (BSP 30 kDa) e reação acrossômica (PLA2) até a interação dos espermatozoides com o ovócito (Osteopontina) (Moura, 2005; Moura et al., 2006a; Moura et al., 2007a).

A baixa temperatura altera a função do espermatozíde (Watson, 1981). O choque ao frio resulta na desestabilização da membrana espermática e danos na função espermática, e sabe-se que os espermatozoides de carneiro são mais sensíveis ao stress do choque ao frio do que outros animais, tais como o touro, coelhos e o homem (Watson, 1981; Holt et al., 1997). Tem sido sugerido que o choque ao frio induz a capacitação espermática prematura (Ashworth et al., 1994; Perez et al, 1996) e a principal função do plasma seminal é manter o espermatozóide em um estado de decapacitação (Cross, 1998) Recentemente, Barrios e colaboradores (2005) relataram a caracterização bioquímica e seqüência de aminoácidos de duas proteínas seminais de ovinos com aproximadamente 14(P14) e 20(P20) kDa, as quais são capazes de proteger os espermatozoides do choque do frio (Barrios et al., 2005). Este achado indica um papel importante dessas proteínas na manutenção da capacidade fecundante do sêmen submetido às técnicas de conservação. Esses mesmos autores (Barrios et al.,2000) demonstraram que a absorção de proteínas do plasma seminal na membrana plasmática espermática de carneiros submetidos ao choque ao frio modificaram as características funcionais dos espermatozoides danificados, levando-os a um estado similar das células vivas. O re-estabelecimento dessa capacidade fecundadnte está relacionado a inibição da fosforilação da tirosina das proteínas espermáticas durante a capacitação (Pérez-Pé et al., 2002)

OBJETIVOS

Em face dos avanços obtidos com as pesquisas sobre marcadores moleculares da fertilidade e a importância deste tema para o setor de biotecnologia aplicada à produção animal, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias para a identificação de componentes do plasma seminal de raças ovinas e indicadores de parâmetros seminais, e potencial capacidade reprodutiva. Portanto, este primeiro capítulo mostra um estudo detalhado sobre a expressão das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês e Morada Nova que potencialmente estejam associados com medidas testiculares e parâmetros seminais e a qualidade reprodutiva dos animais analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Amostras de sêmen de 21 carneiros adultos da raça Santa Inês e 11 carneiros da raça Morada Nova foram coletados e o plasma seminal submetido à eletroforese bidimensional. Em seguida, os géis foram digitalizados e analisados (PDQuest, Bio-Rad Laboratories, Rockville, NY, USA) e as quantidades dos spots estimados quantitativamente. Avaliou-se, então, associações estatísticas entre estas variáveis e os parâmetros reprodutivos dos animais. Os animais foram divididos em dois grupos, denominados G1(alta motilidade) aqueles com Motilidade Massal acima de 80% e G2 (baixa motilidade) o grupo de animais que apresentaram motilidade massal até 80%. Os spots que apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos 1 (G1) e 2 (G2) foram cortados dos géis, digeridos com tripsina, submetidos a espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF). Para identificação das proteínas, os arquivos obtidos foram

submetidos à busca utilizando a ferramenta Mascot (Matrix Science, USA; www.matrixscience.com) e o banco de dados não redundante NCBInr e SWISSPROT.

Coleta e processamento do sêmen

Os animais foram mantidos em regime de estabulação, recebendo como alimentação capim elefante, feno e concentrado, além de água e sal mineral *ad libitum*. Foi realizada uma coleta de sêmen de cada animal das raças Santa Inês e Morada Nova, utilizando-se o método eletroejaculação. De cada animal, mediu-se a circunferência escrotal (CE) com uso de fita métrica, anteriormente à coleta de sêmen. Uma alíquota de cada amostra de sêmen foi retirada para análise dos parâmetros seminais (Souza et al., 2010), incluindo concentração, turbilhonamento espermático, percentual de espermatozóides móveis (PEM) e motilidade individual progressiva (MIP). Para o turbilhonamento ou movimento de massa, colocou-se uma gota de sêmen puro sobre lâmina aquecida e observou-se em microscópio óptico, sendo esta classificada de zero a cinco (Chemineau et al., 1991). Uma alíquota de 10 μ L foi diluída em solução salina fisiológica para estimar o percentual de espermatozóides móveis e motilidade individual progressiva (MIP), sendo, logo após a diluição, uma alíquota de 10 μ l foi colocada sobre uma lâmina e observada em microscópio óptico. O valor da PEM foi atribuído em valores de porcentagem e a MIP classificada de zero a cinco (Chemineau et al., 1991). A concentração espermática foi determinada pela diluição do sêmen em formol salina a 0,01% na proporção de 1:400 (v/v). Esta suspensão foi colocada em câmera de Neubauer, contado os dois lados, e então realizada a média. Depois de realizada todas as contagens a fórmula abaixo foi utilizada para determinação da concentração espermática: [] espermatozóides = Total de espermatozóides (Neubauer) / 1/taxa de diluição x 1/10 x 1/5 x 1000 onde, 10 - distância entre a lamínula e câmera, 5 - quadrantes contados na câmera de Neubauer e 1000 - fator de conversão de mm para

mL. A morfologia espermática foi avaliada por meio de esfregaços corados por eosina-nigrosina e contados 200 células, segundo o método de *Blom*, 1973. Os parâmetros morfológicos avaliados foram: total de defeitos maiores (TDMA) e menores (TDME). O restante do ejaculado foi prontamente transportado ao laboratório, para separação do plasma seminal.

Determinação da concentração de proteína total no plasma seminal

Inicialmente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões, com concentrações de proteína conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). A cada 100 μ L padrão, 2,5mL do reagente de Bradford (Bradford, 1976) foi adicionado e as leituras de absorbância feitas a 595nm (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA), após 10 minutos de incubação. A curva de calibração foi, então, estabelecida pelas médias das triplicatas das absorbâncias obtidas, gerando uma equação linear de absorbância versus concentração através da qual foi possível a determinação do teor de proteínas totais em cada uma das amostras experimentais. Para quantificação dos teores de proteína nas amostras, também em triplicata, estas foram previamente diluídas na proporção de 1:1000(v/v), em água milli-Q(Millipore, Billerica, MA, USA) 100 μ L da amostra diluída misturada com 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos, leituras em 595 nm foram feitas e a média das triplicatas usadas para o cálculo do teor de proteína de cada amostra.

Eletroforese bi-dimensional do plasma seminal

As amostras de sêmen foram congeladas em gelo seco e levadas para laboratório, onde foram centrifugadas a 700 g por 10 minutos a 4°C para uma pré-separação. Em seguida, estas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 g por uma hora a 4° C, conforme descrito previamente (Moura et al., 2006; Souza et al., 2010). Após a última centrifugação, o plasma seminal foi aliquotado e armazenado a -80° C. Para a preparação dos géis, um volume contendo 400µg de proteínas foi misturado a um volume tampão de re-hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, Ditiotreitol (DTT) 65mM, anfólitos livres 0,5% (IPG buffer, 4-7), CHAPS 0,5% e azul de bromofenol (traços) suficiente para 250µl (Souza et al., 2010). A solução acima foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de 13 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 4 – 7(IPGs; GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA) por, aproximadamente, 15 a 20 horas. A focalização isoelétrica foi conduzida em um equipamento ETTANTM IPGphor 3 (GE Lifesciences, USA), com a seguinte programação: 200V (200 Vh), 500V (1000 Vh), 5000V (10000 Vh), 10000V (22000 Vh) totalizando 33200 Vh. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio I (6M uréia, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT) e re-equilibradas por 15 minutos adicionais no tampão de equilíbrio II (similar ao tampão de equilíbrio I, mas contendo 2,5% de iodoacetamina no lugar do DTT). Após a etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida (SDS -PAGE; 15%T/0,8%C, 250V, 30 mA por gel), com base em sua massa molecular (Hoefer SE 600, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA) (O' Farrel, 1975, Souza et al., 2010). Após a separação, as proteínas foram visualizadas utilizando-se o método do Coomassie coloidal (Candiano et al., 2004), com modificações. Para tanto, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos, nas soluções 1 e 2, sequencialmente (200 mL/gel): Solução

1:Ácido fosfórico 2% e etanol 30%, em água. Solução 2 : Ácido fosfórico 2%, em água. Após a última lavagem com a solução 2, os géis permaneceram em contato com uma solução contendo ácido fosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 15% em água, por 20 minutos(200 mL/gel). Em seguida, adicionou-se à esta solução 4 mL/gel de Coomassie Blue G-250(solução aquosa a 2%). O corante permaneceu em contato com os géis por cerca de 72 horas. Após este período, a solução contendo o corante foi desprezada, e os géis lavados com água destilada.

Digitalização e análise dos géis

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando o ImageScanner II(GE Lifesciences, USA) na resolução de 300 dpi modo transparente e filtro verde . As imagens foram salvas como arquivos TIFF (tif) e analisadas utilizando o aplicativo PDQuest versão 7.3.0 (Bio-Rad Laboratories, USA). Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os indivíduos. Spots presentes consistentemente nos mapas também foram adicionados ao gel sintético, conforme descrito (Moura et al., 2006; Souza et al., 2010). Proteínas presentes em diferentes regiões dos géis foram utilizadas como marcos de localização de forma a permitir o alinhamento correto de cada spot nos diferentes géis. A quantificação dos spots foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo (Moura et al., 2006).

Digestão das proteínas

As proteínas separadas por eletroforese 2D e marcadas como *spots* no gel master foram submetidas à digestão com tripsina conforme (MOURA et al., 2006a; ROCHA et al., 2009). Os *spots* que apresentaram diferença significativa entre os grupo um (G1) e

dois (G2) foram cortados individualmente de três géis em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e completamente descorados com 400 µL de solução contendo acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio (50% a 25 mM, pH 8,0) ficando nesta solução aproximadamente 16 horas. Os *spots* foram desidratados com 200 µL de acetonitrila absoluta durante 5 minutos e secos à temperatura ambiente. As proteínas foram incubadas por, aproximadamente, 20 horas, a 37° C, com solução contendo tripsina (Promega cat.# V5111, Madison, WI, USA), ácido acético 50 mM (solução estoque 200 ng/µL) e diluída com bicarbonato de amônio 50 mM (concentração final 20 ng/µL). Os peptídeos foram extraídos com ácido trifluoroacético (TFA) 5%/acetonitrila 50%, por 30 minutos e sendo submetidos a três lavagens. Os extratos foram acondicionados em micro tubos e concentrados a vácuo até o volume final de 10 µL.

Espectrometria de Massa - MALDI-TOF (*matrix-associated laser desorption ionization-time of flight*)/TOF

Os peptídeos proveniente da digestão tríptica foram misturados (1:1,5, v/v) com solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinamico em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,3% em água, sendo 1 µl da mistura aplicada na placa de MALDI e seco à temperatura ambiente, antes da análise no espectrômetro de massas. Os espectros de massas foram obtidos utilizando-se o equipamento ABI 4700 ToF/ToF 41 no modo interativo, onde todas as amostras foram analisadas, automaticamente, no modo refletor MS, sendo, posteriormente, os dez picos mais intensos submetidos a uma análise posterior por MS/MS. A intensidade do laser utilizada foi 4800 para o modo MS e 5200 para o modo MS/MS e a célula de colisão configurada para 1kV em pressão de 1x 10⁻⁶ torr em presença de gás atmosférico (ROCHA et al., 2009).

Pesquisa em banco de dados

Os espectros iônicos obtidos para cada peptídeo foram submetidos a buscas utilizando a ferramenta MASCOT (www.matrixscience.com) no banco de dados NCBInr e SWISSPROT, utilizando o modo MS/MS *ion search*. Para busca, foram considerados valores de massa monoisotópicos, com carga +1 e tolerância de massa dos peptídeos de ± 100 ppm e dos fragmentos de $\pm 0,6$ Da, tendo apenas 1 clivagem perdida. As modificações pós-traducionais variáveis consideradas foram acetilação amino-terminal, carbamidometilação dos resíduos de cisteína e oxidação dos resíduos de metionina. A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína for significativo ($p<0,05$), e pela coincidência próxima da massa molecular e pI teóricos e experimentais da proteína. A sequência dos peptídeos e a distribuição dos domínios referentes aos principais *spots* identificados nos mapas eletroforéticos por espectrometria de massas, foram graficamente representados ao aplicativo Caititu (CARVALHO et al., 2008 <http://pcarvalho.com/things/caititu>).

Análise estatística

Todas as variáveis, tais como os parâmetros seminais e densidade óptica integrada total dos spots presente nos mapas 2-D foram submetidos à avaliação da distribuição normal pelos testes de Shapiro-Wilk, Assimetria e Curtose, usando o procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do pacote estatístico SAS, versão 9.0(SAS, 2002). Variáveis com distribuição normal foram consideradas paramétricas e aquelas sem distribuição normal foram submetidas à transformação logarítmica($\log(x+1)$) e angular($\arcsine(\sqrt{x}/100)$). As variáveis transformadas com sucesso foram também consideradas paramétricas e aquelas sem distribuição normal

mesmo após a transformação foram consideradas como não paramétricas. Os animais foram divididos em dois grupos baseados no percentual de células móveis (PEM). Variáveis paramétricas que diferiram entre os grupos ($p<0,05$) foram avaliadas pela análise de variância e as medias foram comparadas pelo teste t de Student usando PROC GLM do SAS. Variáveis não paramétricas que também apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney, usando PROC NPAR1WAY com opção WILCOXON do SAS (2002). Modelos de regressão logísticos dos spots que diferiram estatisticamente foram estimados por meio do procedimento LOGISTIC do SAS. Os modelos representaram a probabilidade de carneiros Santa Inês possuírem alta motilidade (acima de 80%) em função da intensidade do spot analisado,

por meio da equação $y = \frac{e^{(a+bx)}}{1 + e^{(a+bx)}}$, onde:

y = probabilidade de o animal possuir alta motilidade;

e = exponencial de base natural;

a = intercepto do modelo. Estimado pelo procedimento LOGISTIC do SAS;

b = coeficiente de inclinação do modelo. Estimado pelo procedimento LOGISTIC do SAS;

x = intensidade do spot estudado.

RESULTADOS

Carneiros da raça Santa Inês

Os animais apresentaram volume ejaculado médio de $1,7 \pm 0,4$ mL, com $81,7 \pm 8,9\%$ de espermatozóides móveis, vigor espermático de $3,7 \pm 0,7$, motilidade massal (MM) de $4,1 \pm 0,7$, $3,3 \pm 0,4$ bilhões de espermatozóides por mililitro de sêmen, $3,6 \pm 2,9\%$ de células com defeitos maiores e $4,6 \pm 3,7\%$ com defeitos menores. A partir do parâmetro percentual de espermatozóides móveis (PEM), que representa consistentemente o movimento espermático, os animais foram divididos com base na mediana em dois grupos, aqueles com mais de 80% de células móveis (G1), e aqueles com até 80% de células móveis (G2). Apenas os parâmetros associados à motilidade espermática, como PEM, VIG e MM apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos, conforme mostrado na tabela 2. Em média, foram detectados $236,19 \pm 7,65$ spots por gel de plasma seminal ovino. Com base na imagem do gel master (Figura 1A) a qual representa uma combinação de todos os spots presentes no gel de referência (Figura 1B), além de spots adicionados de outros géis, identificou-se um total de 63 spots consistentemente presentes em todos os géis. A intensidade desses spots somou 41,5% da intensidade de todos os spots mostrados no gel master.

No que diz respeito às comparações entre os grupos 1 e 2, verificou-se que os spots 3304 (pI 5,2 e 31,13 kDa), 3601 (pI 5,2 e 58,78 kDa), 4607 (pI 5,3 e 57,68 kDa), 4701 (pI 5,3 e 68,01 kDa), 5501 (pI 5,5 e 50,90 kDa), 8001 (pI 6,5 e 13,75 kDa), 9002 (pI 6,8 e 14,98 kDa), 4401 (pI 5,3 e 49,28 kDa), 4604 (pI 5,4 e 58,91 kDa) e 5303 (pI 5,5 e 64,14 kDa), foram mais intensos no G1, com ejaculados contendo maior percentual de células móveis, enquanto que a expressão dos spots 5403 (pI 5,7 e 45,30 kDa), 301 (pI 4,2 e 33,03 kDa) e 5001 (pI 5,5 e 14,40 kDa) foi maior em G2 (Figuras 2 e 3). Os spots 3304, 3601, 4607, 4701, 5501, 8001, 9002, 4401, 4604, 5603, 5403, 301 e

5001 que apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) entre os dois grupos estudados, estavam presentes em 95, 95, 55, 100, 100, 100, 95, 90, 85, 90, 62, 80 e 100% dos animais, respectivamente. Um modelo de regressão logística foi construído, e os spots 3601, 3304, 5501 e 8001 apresentaram nessa ordem a maior probabilidade de um ejaculado apresentar maior percentual de células móveis, a partir da intensidade desses spots nos géis bidimensionais. , conforme figura 4.

Quatro spots foram identificados por **MALDI-ToF** e representaram quatro diferentes proteínas. O spot 301(pI 4,2 e 33,03 kDa) foi identificado como RSVP-22 e o spot 5001 (pI 5,5 e 14,40 kDa) foi identificado como a proteína Bodesina-2, sendo esses dois spots mais expressos em G2. Os spots 4701 e 5501 com mais intensidade no G1 e com pI de 5,3 e 5,5 e massa molecular de 68,01 e 50,90 respectivamente foram identificados como as proteínas arilsulfatase A (#4701) e zinco-alfa-2 (#5501), conforme mostrado na Tabela 1.

Protein	Experimental kDa/pI	NCBI accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	False Discovery rate	m/z	z
Seminal vesicles 22 kDa protein (<i>Ovis aries</i>)	29.4/4.3	219521812	83	15	(76)EWCSLDEDYVGR(87) (134)EYAWQYCDR(142) (134)EYAWQYCDRY(143)	68 36 25	0,00%	1529.7885 1291.6484 1454.7282	1 1 1
Spot 01									
Bodhesin 2 (<i>Capra hircus</i>)	14.1/5.6	121484235	132	18	(87)SSNQPVSPFDIFYYERPSA(105)	132	0,00%	2205.1104	1
Spot 02									
Arylsulfatase A (<i>Bos taurus</i>)	66.8/5.3	115497982	135	9	(59)FTDFYVPVSLCTPSR(73) (85)MGLYPGVLEPSSR(97)	37 29	0,00%	1789.8284 1422.6754	1 1
Spot 03					(201)YVAFAR(206) (371)HTLFFYSAYPDEVR(384)	28 43		727.3512 1746.8322	1 1
Zinc-alpha-2-glycoprotein (<i>Bos taurus</i>)	66.8/5.3	77735615	94	8	(109)EGSHTFQGAFGCEL(123) (222)CLAYDFYPR(230)	50 44	0,00%	1695.8884 1205.6266	1 1
Spot 04									

Tabela 1. Proteínas do plasma seminal de carneiros adultos Santa Inês identificadas por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF).

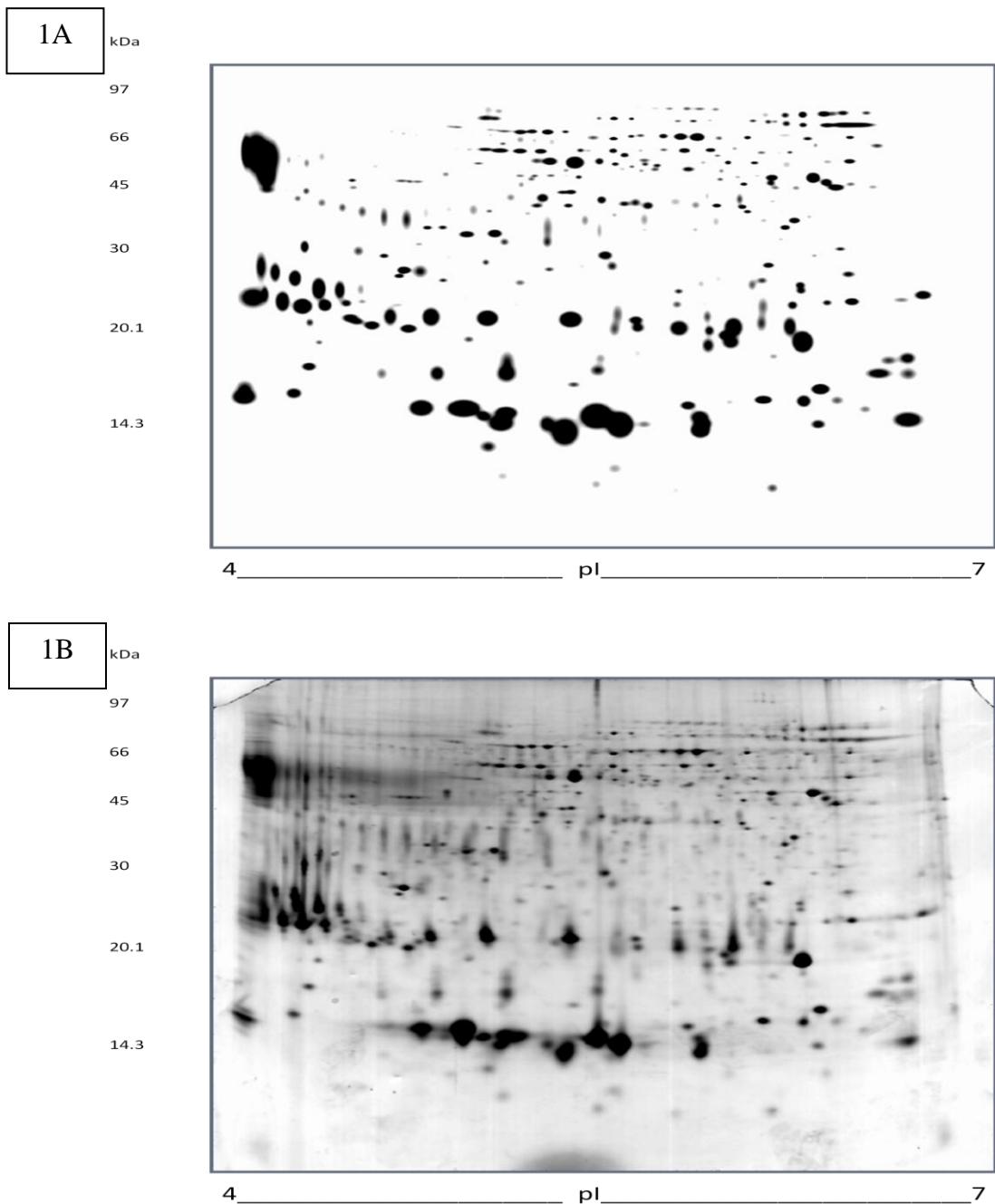
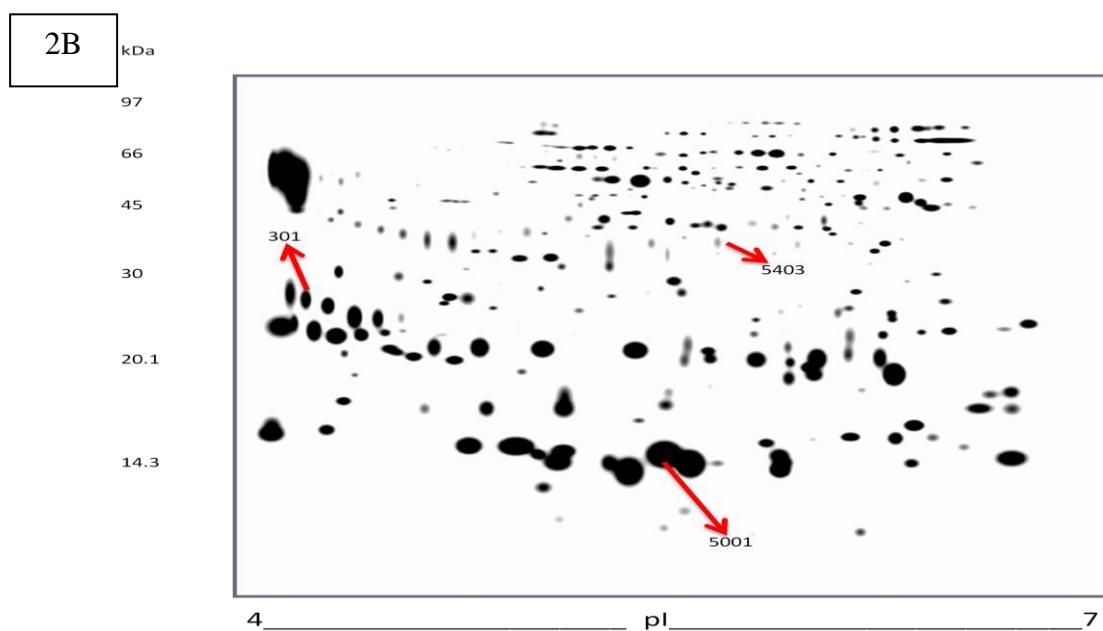
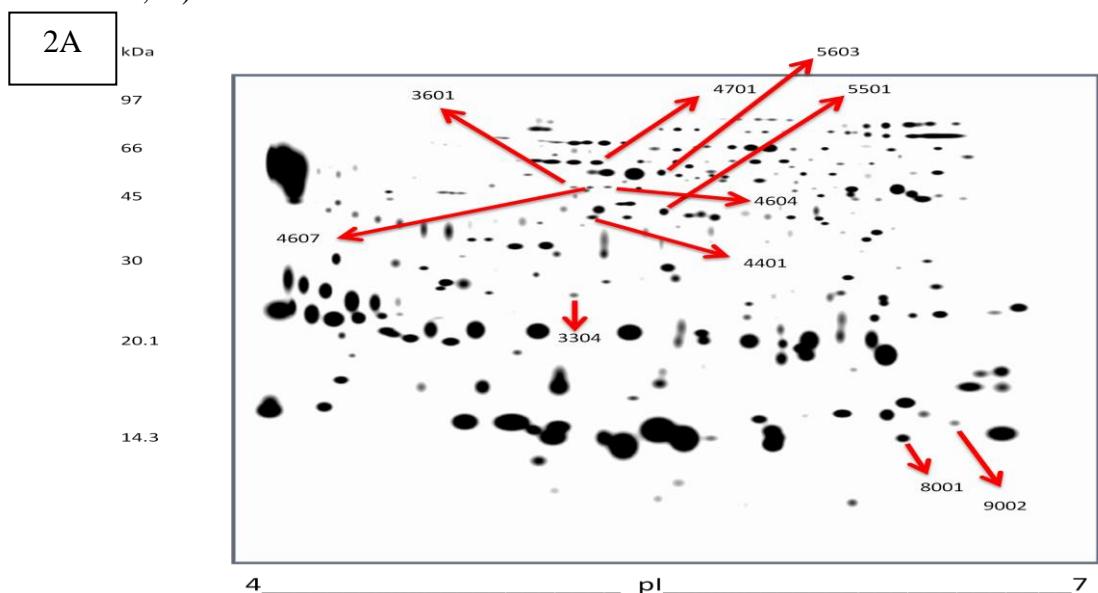


Figura 1 Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de carneiros adultos da raça Santa Inês. (A) representa o gel master gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado no pareamento de todos os geis utilizados no estudo. (B) corresponde ao gel referência (carneiro 517), do qual o gel master foi prioritariamente gerado. As proteínas foram coradas com Cromassie blue coloidal.

Tabela 2: Médias e desvios-padrão das características seminais avaliadas de carneiros da raça Santa Inês criados no semi-árido brasileiro.

Característica seminal	Alta motilidade (G1)	Motilidade normal (G2)
Volume ejaculado (ml)	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.5
Concentração espermática ($\times 10^6$ /ml)	2.3 ± 0.7	2.7 ± 0.7
Motilidade espermática (%)	89.5 ± 1.6^a	74.5 ± 6.5^b
Vigor espermático (1-5)	4.3 ± 0.4^a	3.4 ± 0.6^b
Motilidade massal (1-5)	4.3 ± 0.5^a	3.7 ± 0.6^b
Defeitos espermáticos maiores (%)	2.3 ± 1.8	5.1 ± 4.4
Defeitos espermáticos menores (%)	4.3 ± 2.2	4.5 ± 4.0

Médias seguidas de letras diferentes sobrescritas são diferentes por Mann-Whitney ($p < 0,01$)



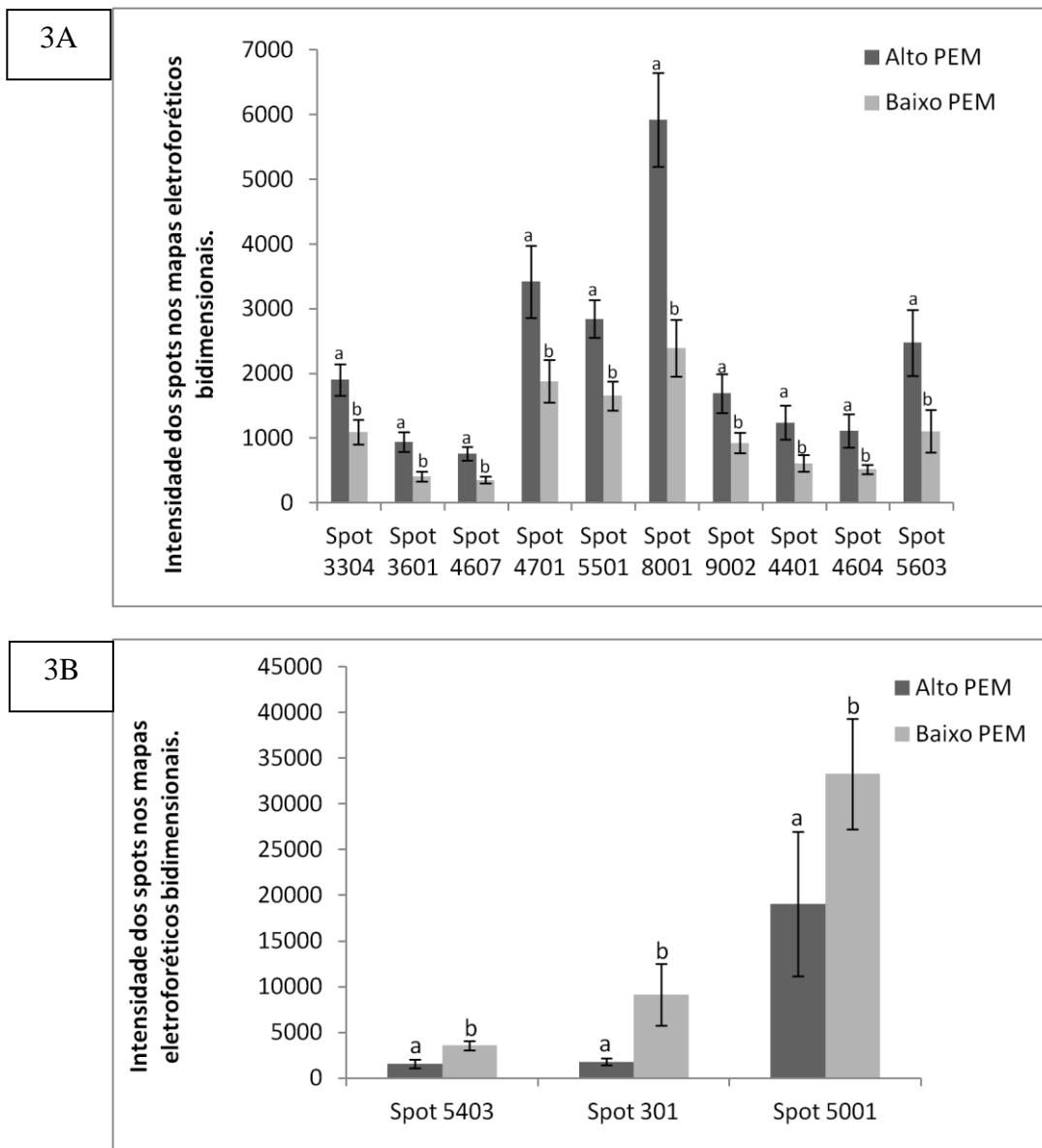


Fig. 2: Localização dos spots nos mapas bidimensionais que diferiram estatisticamente ($p<0,05$) em animais de alto percentual de espermatozóides móveis (A) e baixo percentual de espermatozóides móveis (B)

Fig. 3: Intensidade dos spots expressos diferentemente ($p<0,05$) em grupos de carneiros com alta (85 e 90%)(A) e baixa (60 a 80%)(B) motilidade espermática. Os spots referem-se aqueles mostrados nas figuras 2A e B que representa o gel master das proteínas seminais de carneiros Santa Inês que foram expressos em animais de alta e baixa motilidade respectivamente.

Carneiros da raça Morada Nova

Avaliou-se a expressão dos spots que apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) em relação aos parâmetros circunferência escrotal (CE), volume espermático (VOL), motilidade massal (MM), vigor espermático (VIG), percentual de células móveis (PEM) e concentração espermática (CONC). Apenas os valores para vigor espermático (VIG), motilidade massal (MM) e percentual de células móveis (PEM) apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre os animais. (Tabela 3) Por representar melhor o movimento físico espermático, o parâmetro percentual de células móveis (PEM) foi escolhido para que os grupos fossem divididos em animais de alto (G1) e baixo (G2) PEM, tomando por base a mediana dos dados encontrados.

Tabela 3: Média e desvio padrão de parâmetros seminais de carneiros Morada Nova criados no semi-árido Nordestino.

Parâmetro reprodutivo	Alta motilidade (G1)	Normal (baixa motilidade)(G2)
Circunferência escrotal (cm)	26.5 ± 1.9	28.0 ± 1.2
Volume do ejaculado (ml)	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.4
Perc. de células móveis (%)	83.3 ± 5.2^a	54.0 ± 16.7^b
Vigor espermático (1-5)	3.6 ± 0.7	2.6 ± 0.7
Motilidade massal (1-5)	3.7 ± 0.7	2.4 ± 1.1

Médias seguidas de letras diferentes sobreescritas são diferentes por Mann-Whitney ($p <0,01$)

Em média, foram detectados $261 \pm 15,09$ spots por gel do plasma seminal dos animais Morada Nova, de acordo com o pareamento gerado pelo aplicativo PDQuest® com base no gel master (Figura 4A). Baseado na imagem do gel master (Figura 4A) a qual representa uma combinação de todos os spots presentes no gel de referência (Figura 4B), além dos spots adicionados dos outros géis, os quais foram pareados. Um total de 98 spots foram detectados de forma consistente em todos os géis pareados pelo aplicativo PDQuest®. A intensidade desses spots somou 60,82% da intensidade de todos os spots mostrados no gel master (Figura 4A)

A intensidade dos spots 4604 (pI 5,5 e 63,93 kDa), 6602 (pI 5,7 e 68,73 kDa), 3102 (pI 5,0 e 13,75 kDa), 6303 (pI 5,7 e 28,34 kDa) e 7507 (pI 6,2 e 51,17 kDa) apresentou diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos um e dois, sendo todos estes spots expressos em animais de alto PEM. A localização dos spots e a intensidade óptica integrada dos referidos spots estão representadas nas figuras 4 e 5. Após digestão dos spots e espectrometria de massa, os spots 6602, 7507, 6303 e 3102 foram identificados como as proteínas 1- α do complexo t (TCP α -1), aldose redutase, RSVP-22 e RSVP-14 respectivamente, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Proteínas do plasma seminal de carneiros adultos Morada Nova identificadas por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF).

Protein	Experimental kDa/pI	Accession number	MS/MS protein score	Sequence covered (%)	Matched peptides	Ion score	False discovery rate
Seminal vesicles 22 kDa protein (<i>Ovis aries</i>)							
Spot 3102*	28.4/4.4	219521812	128	15	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾ ⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDR ⁽¹⁴²⁾ ⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	79 40 39	0.00%
Chaperonin containing TCP-1 α (<i>Canis familiaris</i>)							
Spot 6602	66.9/6.0	57032236	122	5%	⁽¹¹²⁾ IHPHTSVISGYR ⁽¹²²⁾ ⁽⁴³⁴⁾ EQLAIAEFAR ⁽⁴⁴³⁾ ⁽⁴⁶⁹⁾ AFHNEAQVNPER ⁽⁴⁸⁰⁾	23 61 38	0.00 %
Aldose reductase (<i>Bos taurus</i>)							
Spot 7507*	48.1/6.2	113594	56	13%	⁽³³⁾ VAIDLGYR ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁶⁹⁾ REDLFIVSK ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁰⁾ EDLFIVSK ⁽⁷⁷⁾ ⁽¹²⁰⁾ DFFPLDEDGNVIPSEK ⁽¹³⁵⁾ ⁽²⁴³⁾ TTAQVLIR ⁽²⁵⁰⁾	48 59 27 18 49	0.00%
Seminal vesicles 14 kDa protein (<i>Ovis aries</i>)							
Spot 3102	13.7/5.2	219521810	179	34%	⁽⁵⁵⁾ HFDCTFHGSIFPWCSLDADYVGR ⁽⁷⁷⁾ ⁽¹⁰⁶⁾ IGSIFGAWCSLSPNYDQDGAWK ⁽¹²⁷⁾	130 49	0.00%

*Proteínas identificadas por MALDI-Tof-Tof

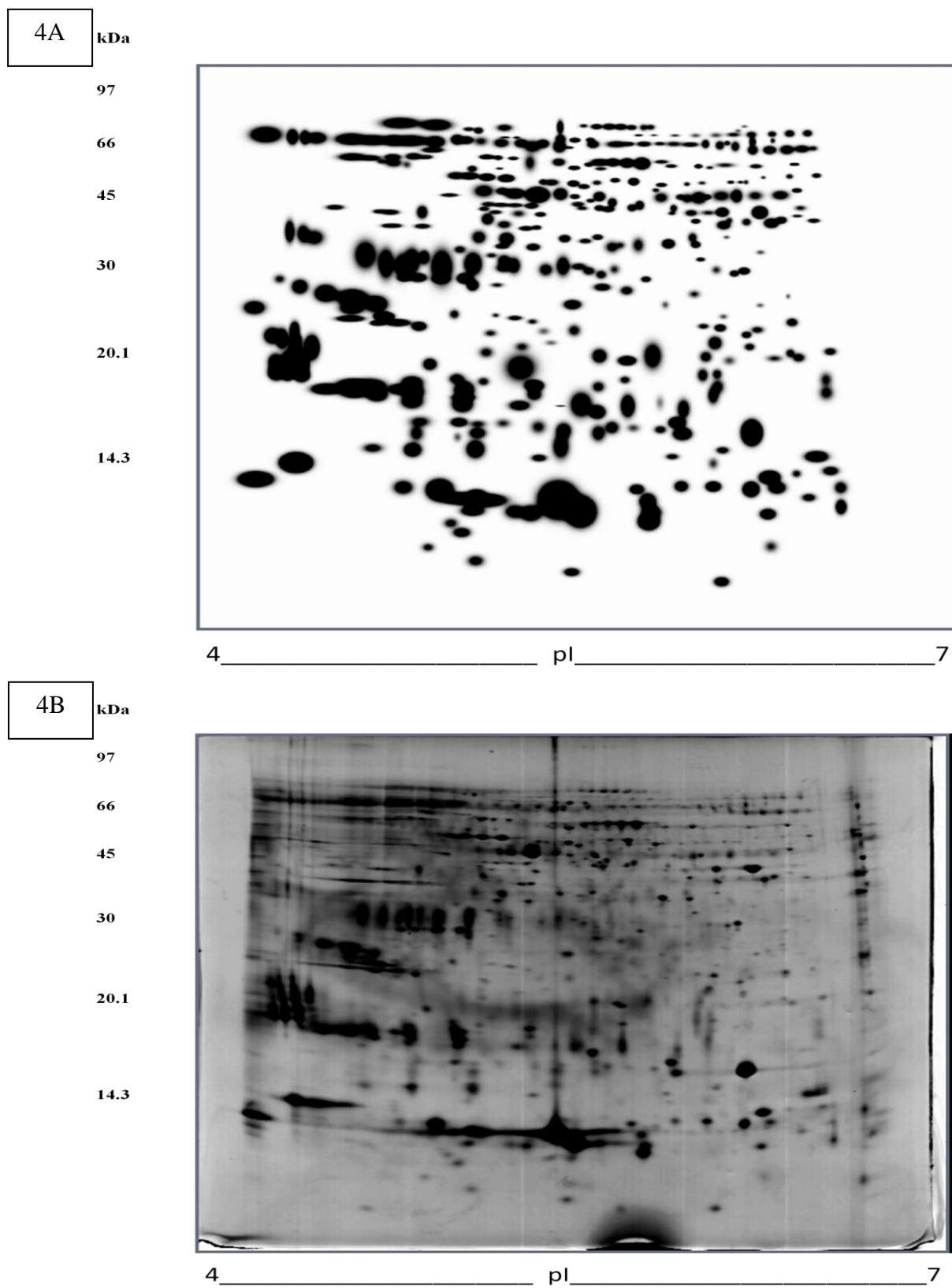


Figura 4. Mapa bi-dimensional das proteínas seminais de carneiros adultos Morada Nova. (A) Representa o gel master gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio-Rad, USA) baseado no match set de todos os géis usados no estudo. (B) Corresponde ao mapa referência (carneiro 72), do qual o gel master foi gerado. Proteínas foram coradas com Coomassie blue.

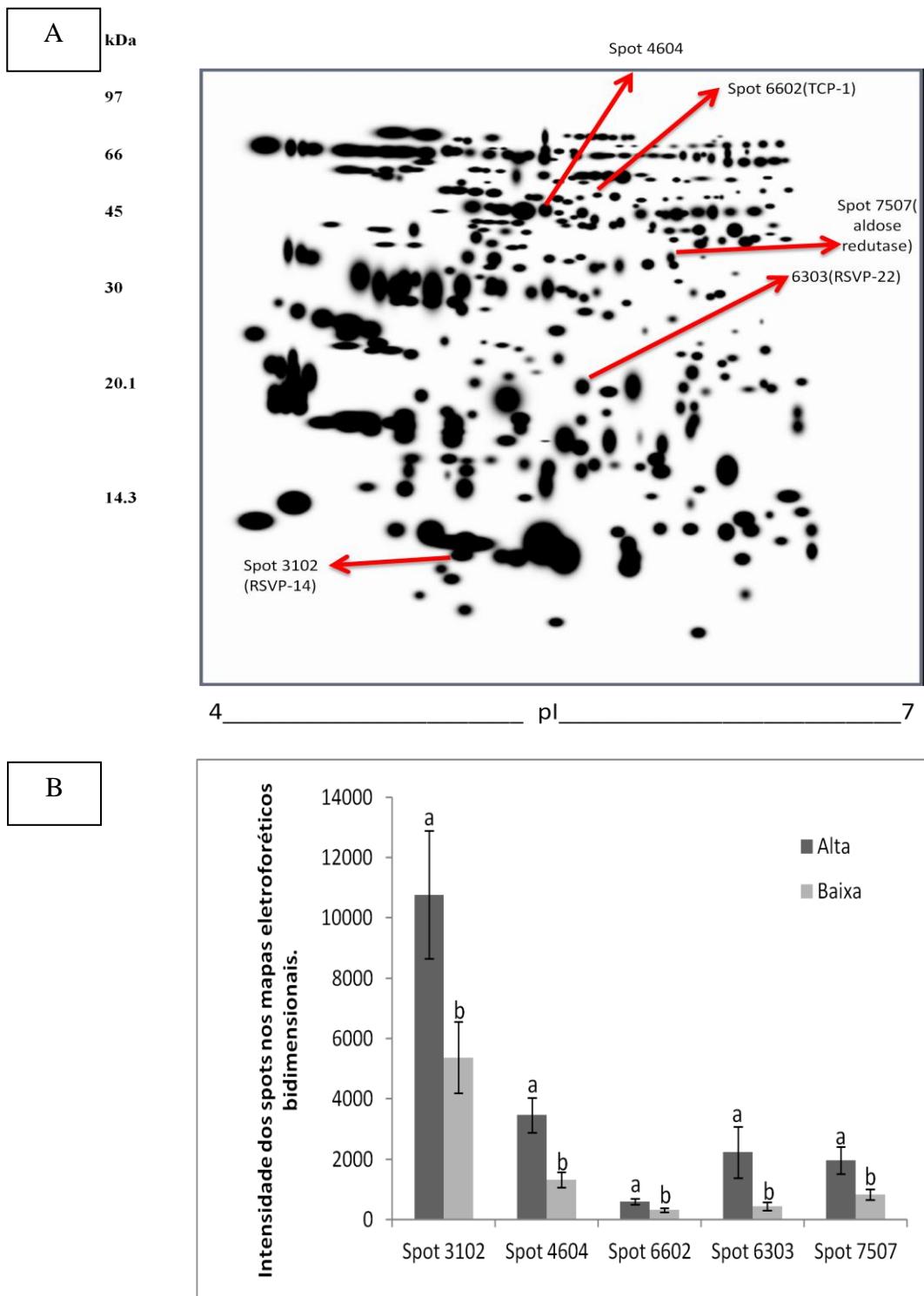


Figura 5. A- Representa o gel master do plasma seminal de carneiros Morada Nova e os spots que foram mais intensos em animais de alta motilidade espermática. B- Intensidade dos spots expressos diferentemente ($p<0,05$) em grupos de carneiros com alta motilidade e que estão indicados em A.

DISCUSSÃO

Carneiros da raça Santa Inês

O presente estudo descreve as proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês criados no Nordeste brasileiro associadas à motilidade espermática. As proteínas do plasma seminal são produzidas majoritariamente no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias, mas também podem ser oriundas dos próprios espermatozóides, e desempenham inúmeras funções na regulação da fisiologia espermática (Moura et al., 2007). A presença de determinadas proteínas no plasma seminal de mamíferos, pode claramente diferenciar animais de alto e baixo valor reprodutivo (Yeung et al., 2009) e determinar a habilidade de células espermáticas usadas para congelamento e resfriamento, visto que diversas proteínas estão associadas a manutenção ou recuperação da viabilidade espermática após choque térmico. (Pérez-Pe et al., 2001, Jobim et al., 2005). Em nosso estudo, os spots 3304 (pI 5,2 e 31,13 kDa), 3601 (pI 5,2 e 58,78 kDa), 5501 (pI 5,5 e 50,9 kDa) e 8001 (pI 6,5 e 13,75 kDa) apresentaram diferença significativa entre os grupos, sendo os quatro spots mais intensos em animais de maior percentual de células móveis. Após regressão logística, observamos que o spot 3601 apresenta maior probabilidade de ser encontrado em animais de altíssima motilidade espermática mesmo quando presente em menores intensidades, seguido pelos spots 3304, 5501 e 8001, conforme descrito na Figura 6. O spot 5001 (pI 5,5 e 14,4 kDa) foi identificado como sendo bodhesina 2, membro da família das espermadesinas. Uma espermadesina encontrada no plasma seminal de touros, chamada de espermadesina Z13, aparece como um monômero de 13 kDa nos mapas 2-D do plasma seminal, acreditando-se que ela origina-se de um dímero de 26-kDa (Tedeschi et al.(2000). Essa mesma proteína foi descrita por Moura et al., (2006) como oriunda das glândulas sexuais acessórias de touros Holandês, constituída de três

spots de 14 kDa e um, menos intenso, de 29 kDa. Moura et al.,(2006) demonstraram que a espermadesina Z13 é o segundo grupo de proteínas mais abundante no mapa protéico do fluido das glândulas acessórias de touros, e demonstrando que a intensidade dos spots associados a esta proteína tem uma relação inversa com a fertilidade dos touros. Em nosso trabalho a intensidade de um spot identificado como bodhesin 2(BDH-2) é maior no grupo de animais de menor PEM, sugerindo que, em carneiros, assim como em bovinos, ela deva exercer efeitos inibitórios sobre alguns aspectos associados à motilidade espermática. Outro spot que apresentou diferença significativa entre os grupos foi o spot 301, igualmente mais intenso em animais de menor PEM. O spot 301 foi identificado com a proteína RSVP-22 (ram seminal vesicle protein 22 kDa). Em nosso trabalho, o spot 301 apresentou pI de 4,1 e massa molecular de 33,03 kDa. A RSVP-22 pertence à família das binder of sperm proteins (BSPs). Membros da família das BSPs são encontradas no plasma seminal e fluido das glândulas sexuais acessórias de inúmeras espécies, incluindo bovinos (Esch et al., 1983; Manjunath e Sairam, 1987; Moura et al., 2007), equinos, suíños (Calvete et l., 1997) e caprinos (Villemure et al., 2003). As BSPs influenciam a capacitação espermática, ligando-se ao espermatozóide após a ejaculação (Manjunath et al., 1993; Dominguez et al., 2008) e permanecem ligadas mesmo após o espermatozóide entrar em contato com as secreções do oviduto (Souza et al., 2008). As BSPs também regulam a interação do espermatozóide com o epitélio do oviduto, e contribui para a sobrevivência espermática nesse ambiente (Gwathmey et al., 2006;). Uma publicação recente mostra que a BSP 1 pode também funcionar como uma chaperona (Sankhala e Swamy, 2010), protegendo enzimas e outras proteínas contra injúrias. Isso deve explicar a grande abundância das BSPs no plasma seminal de carneiros deslanados, animais tipicamente encontrados em climas de características tropicais caracterizado por altas temperaturas, comparados aos

encontrados em carneiros lanados (Bergeron et al., 2005). A associação dessa proteína a animais considerados de menor PEM pode estar relacionada a fatores ambientais da região nordestina. Outro fator que deve também ser considerado é que em nosso trabalho trabalhamos com animais de altíssima qualidade reprodutiva e mesmo aqueles considerados como de menor qualidade também apresentam valores fisiológicos considerados normais dentro do processo reprodutivo animal.

Outra proteína (spot 4701; pI 5,3 e 68,01 kDa) diferencialmente expressa entre os dois grupos foi a Arilsulfatase A (AS-A). Esta proteína estava presente de forma mais intensa ($p<0,05$) nos animais de maior PEM. AS-A tem sido descrita como um componente da cauda do epidídimo em touros (Moura et al., 2010), e liga-se ao espermatozóide durante o trânsito epididimário (Weerachatyanukul, et al., 2003), a qual se liga a superfície do espermatozóide na região da sua cabeça. Tem sido descrito que a AS-A tem habilidade de desfazer o complexo cumulus-oócito (Wu et al., 2007), auxiliando o espermatozóide a penetrar o oócito, mediando a ligação a zona pelícida (Tantibhedhyangkul et al., 2002). Em nosso trabalho, esta proteína tem massa molecular similar aquelas encontradas no plasma seminal do rato e do porco (Tantibhedhyangkul et al., 2002). Esse é o primeiro trabalho que associa a presença da AS-A no plasma seminal com a motilidade espermática mas o mecanismo pelo qual a AS-A pode afetar a motilidade é ainda desconhecido.

O spot 5501 (pI 5,5 e 50,9 kDa) foi identificado como a proteína zinc-alpha-2 glycoprotein (ZAG-2). Essa proteína é usualmente associada com a modulação da lipólise dos adipócitos (Bing et al., 2004) através das vias de sinalização do AMP cíclico e proteína quinase A. Um recente trabalho, reportou que a ZAG-2 está presente no plasma seminal humano e tem habilidade em regular a iniciação da motilidade em espermatozoides epididimários (Ding et al., 2007). A proteína liga-se a membrana

espermática na região pré-equatorial e na peça intermediária e o mecanismo envolvido na regulação da motilidade espermática pela ZAG-2 envolve a mesma via do cAMP/PKA. (Qu et al., 2007). Uma vez que a próstata parece ser a origem da ZAG-2 seminal (Ahlgren et al., 1995), é provável que essa proteína ligue-se ao espermatozóide após a ejaculação e ative as vias que levem ao aumento da motilidade espermática. Além disso, um pequeno aumento na intensidade do spot correspondente a ZAG-2 aumento significativamente a probabilidade do ejaculado apresentar espermatozoides de alta motilidade, baseado em nosso modelo logístico. Além disso, esses achados sugerem que em carneiros, como em humanos, a ZAG-2 desempenha um importante mecanismo na regulação da motilidade espermática.

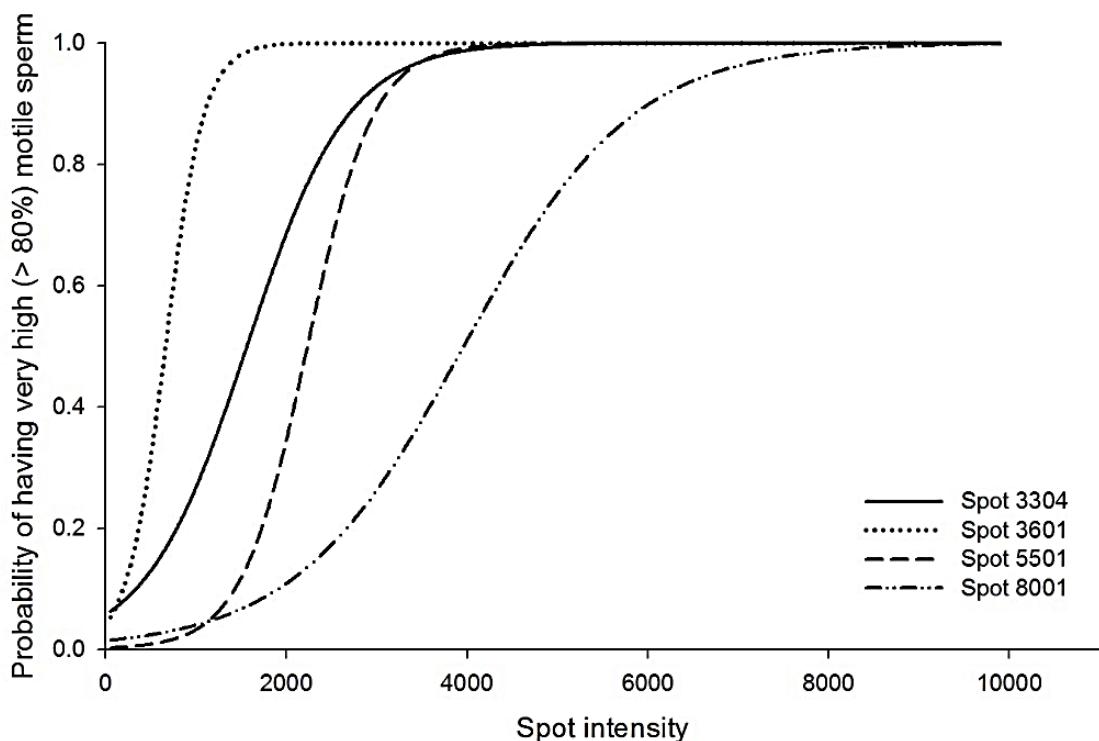


Figura 6: Probabilidades de ter mais de 80% dos espermatozoides móveis estimada por

regressão logística ($y = \frac{e^{a+bx}}{1+e^{a+bx}}$) dos spots que diferiram ($p < 0,01$) entre os grupos de

alta e baixa motilidade.

Carneiros da raça Morada Nova

Em média, foram detectados $261 \pm 15,09$ spots por gel do plasma seminal dos animais Morada Nova, variando entre 182 e 375 spots, mostrando assim a grande variabilidade de expressão protéica que é característica de cada animal. Lefèvre et al., (2007) usando estratégias proteômicas para identificar defeitos na função espermática responsável pela fertilização em humanos identificaram diferenças na expressão de proteínas entre homens férteis e pacientes com espermatozóides que falharam em fertilizar o oócito in vitro. Examinando cinco outros homens, foram encontradas várias diferenças consistentes nos níveis de expressão protéica (Conner et al., 2007) mas estudos suplementares são requeridos para determinar se estas diferenças estão relacionadas à função espermática e em que vias estes defeitos são manifestados.

Ao examinarmos o mapa protéico dos animais do grupo um, caracterizados como de alto PEM (figura 2) observamos a maior expressão do spot 3102 (pI 5,0 e 13,75 kDa), identificado como a proteína da vesícula seminal de carneiro 14 kDa. (RSVP-14), uma proteína encontrada inicialmente no plasma seminal de carneiros adultos Rasa Araganosa (Cardozo et al., 2006). De acordo com estes autores, a RSP-14 protege o espermatozóide do carneiro contra o stress ao frio e tem alta homologia com a BSP A1/A2 e GSP-14/15 presentes no plasma seminal de bovinos e caprinos respectivamente. O padrão de spots de 15-17 kDa no mapa 2-D de carneiros Santa Inês (Souza et al., 2010) é igualmente similar ao das espermadesinas de rebanhos adultos Suffolk (Bergeron et al., 2005) e proteínas tipo BSP 15 kDa identificadas no plasma seminal de carneiros do sul do Brasil (Jobim et al., 2005). Essas espermadesinas e componentes da BSP reagiram com anticorpos contra BSP A1/A2 e A3 (Bergeron et al., 2005). Interessantemente, Moura et al., 2007 havia usado o mesmo tipo de anticorpos para detectar proteínas BSP A1/A2(14 kDa, pIs 4.8-5.2) no fluido das glândulas sexuais

acessórias de touros leiteiros. BSP A1/A2 é sintetizado pelas glândulas sexuais acessórias, liga-se ao espermatozóide durante a ejaculação (Manjunath et al., 1993) e após o contato com os fluidos do oviduto (Souza et al., 2008) influencia a capacitação epermática (Manjunath e Thérien, 2002), motilidade (Sanchez-Luengo et al., 2004) e a interação com o epitélio do oviduto (Gwathmey et al., 2006). Existe a possibilidade, portanto que proteínas de baixo peso molecular encontradas em diferentes rebanhos de carneiros medeiem algumas destas funções acima mencionadas (Souza et al., 2010). Em nosso estudo observamos claramente a associação entre parâmetros reprodutivos superiores de qualidade seminal e proteínas de baixa massa molecular e pI semelhante aqueles encontrados para as proteínas da grande família BSP. Proteínas da família BSP são todas relativamente de baixa massa molecular (12-30 kDa) e podem ser glicosiladas ou não (Manjunath et al., 2002).

O spot 6303 (pI 5,7 e 28,34 kDa) foi identificado como a proteína RSVP-22. Rego et al., (2011) trabalhando com carneiros da raça Santa Inês identificou onze spots no mapa bidimensional do plasmas seminal como RSVP-22, outro membro da família das BSPs. Segundo Bergeron et al., (2005), a família da proteína BSP (RSP- 15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa e RSP-24 kDa) representa aproximadamente 20% das proteínas totais do plasma seminal de carneiros. As proteínas BSP existem em várias formas moleculares e glicoformas. Segundo este mesmo autor, trabalhando com carneiros da raça Suffolk, encontrou a presença de proteínas homólogas no plasma seminal dos carneiros. Eles usaram sua propriedade de ligação a gelatina para isolá-las por afinidade cromatográfica. Quatro proteínas foram isoladas e foram nomeadas de acordo com suas massas moleculares: RSP- 15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa e RSP-24 kDa. A propriedade de ligação das proteínas BSP a gelatina é devido à presença de

dois domínios de fibronectina tipo II na sua estrutura (Esch et al., 1983; Manjunath et al., 1987 e Calvete et al., 1996).

É amplamente conhecido que a criopreservação, que envolve o resfriamento, congelamento e descongelamento são deletérios para a função espermática (Watson PF, 1981). A crioinjúria espermática inclui indução prematura de um estado tipo-capacitação, chamado de criocapacitação (Ashworth et al., 1994; Bailey et al., 2002). Contudo, quando o plasma seminal foi adicionado após o descongelamento do sêmen, este aumentou a resistência do espermatozóide de carneiro ao choque ao frio (Barrios et al., 2000; Barrios et al., 2005) e os efeitos deletérios da criopreservação (Evans et al., 2000; El-Hajj et al., 2007) A adição do plasma seminal ao espermatozóide de carneiro descongelado aumenta a motilidade, viabilidade, integridade do acrossoma e respiração mitocondrial (Ollero et al., 1997; Rebolledo et al., 2007). Esses efeitos benéficos foram atribuídos às proteínas do plasma seminal (Barrios et al., 2000; Ollero et al., 1997; Dominguez et al., 2008; Marti E et al., 2008; Leahy et al., 2009), especialmente RSVPs 14 e RSVP 20 (Barrios et al., 2000; Barrios et al., 2005) produzidas nas vesículas seminais. Essas proteínas foram purificadas (exclusão cromatográfica) da fração do plasma seminal de carneiros Rasa Aragonesa; elas ligam-se à superfície espermática, especialmente à região acrossônica e parecem agir na estabilização da membrana espermática e participam da capacitação (Barrios et al., 2000; Barrios et al., 2005)

O spot 6602 (pI 5,7 e 68,73 kDa) foi identificado como a Proteína α -1 do complexo-t (TCP α -1). A expressão de níveis de TCP 11, proteína da família das TCPs, é 70% menor em amostras que contêm altos níveis de espermatozóides enrolados quando comparadas com aqueles de amostras espermáticas normais. Tem sido revelado através de um estudo de longo tempo de acompanhamento que pacientes que eventualmente comprovam fertilidade mostram níveis baixos de espermatozóides

enrolados (9%) do que pacientes persistentemente inférteis (11%) (Jouannet et al., 1988) e ambas são maiores do que homens férteis (7%) (Auger et al., 2001). Isso sugere que o dobramento espermático está associado com a infertilidade e isso pode comprometer a capacidade de fertilização espermática (Yeung et al., 2009). A espermatogênese é um complexo processo de diferenciação celular, durante a qual muitas mudanças drásticas acontecem, incluindo a formação do acrosoma e do flagelo espermático, como também a condensação nuclear. Cada um desses processos requer a alta regulação de expressão de um número de genes (Wilinson et al., 1987; Heacht 1995; Sassone-Corsi 1997). Em humanos o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) fornece muitos genes candidatos que podem estar envolvidos na espermatogênese, desenvolvimento, embriogênese e neoplasia (Van der Hoorn et al., 1990; Tripodis et al., 1998,2000). O MHC humano é mapeado como sendo uma pequena porção do cromossomo 6 (Willison et al., 1987; Bibbins et al., 1989; Tripodis et al., 1998). No rato, essa região é a inversão distal do complexo-t do cromossomo 17. Ela contém genes conhecidos que influenciam o macho, mas não a fertilidade da fêmea. Adicionalmente, várias proteínas codificadas pelos genes do complexo-t localizam-se no flagelo espermático e apresentam certamente funções relacionadas à motilidade (Olds-Clarke e Johnson 1993; Huw et al., 1995; Harrison et al., 1998; Fraser e Dudley 1999).

O spot 7507 (pI 6,2 e 51,17 kDa) após identificação por MALDI-ToF-ToF é a proteína aldose redutase. A aldose redutase é um membro da família da aldo-ceto redutase e pode assim, estar envolvida no processo de detoxificação da citotoxicidade dos componentes da carbonila (Takahashi et al., 1995). O epidídio é rico em hormônios esteróides e pode ser exposto ao estresse oxidativo. A aldose redutase pode proteger o gameta masculino contra os metabólitos contidos na carbonila. A aldose redutase

também pode estar envolvida na via poliol dentro do epidídimo (Kobayashi et al., 2002). Nessa via metabólica, ela é determinada pela taxa enzimática de conversão da glicose em frutose via sorbitol. É bastante conhecido que o espermatozóide usa esses três carboidratos como fonte de energia (King e Mann, 1959; Murdoch e White, 1968) No lúmen epididimal de diferentes espécies de mamíferos as proteínas chamadas P26h (Bérube e Sullivan, 1994; Gaudreault e Sullivan, 2002), P34H(Boué et al., 1994) e P25b (Parent et al., 1999) são caracterizadas como uma família de proteínas que compartilham características comuns com a carbonila redutase (Frenette et al., 2003, Gaudreault et al., 1999 e Monfort et al., 2002). No lúmen epididimal, essas proteínas estão associadas com vesículas membranosas chamadas epididimoses. (Frenette et al.,2003). Proteossomas são vesículas semelhantes aos epididimoses e tem sido caracterizado no sêmen de diferentes espécies de mamíferos. Proteossomas têm sido descrito como um constituinte secretório da próstata e é proposto que ele desempenha uma função chave na fisiologia espermática tal como a proteção contra o ataque do sistema complemento, modulação do sistema imune da fêmea, aprimoramento da motilidade espermática e estabilização da membrana plasmática espermática. (Saez et al., 2003; Ronquist e Nilson, 2002).

CONCLUSÕES

O estudo feito com o plasma seminal dos carneiros das raças Santa Inês e Morada Nova mostrou claramente a grande variação na expressão de proteínas entre animais da mesma raça e de raças distintas. A identificação destas proteínas que estão claramente associadas a marcadores de fertilidade é o passo inicial para um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos reprodutivos que acontecem com o espermatozóide desde sua produção até sua interação com o oókito. Durante muitos anos, os fatores relacionados ao insucesso reprodutivo foram associados a problemas relacionados à fêmea que apresenta um complexo ciclo reprodutivo que é amplamente influenciado por fatores ambientais e hormonais, mas hoje se sabe que uma grande parcela deste fracasso reprodutivo está localizada no melhor entendimento dos processos relacionados ao macho, chegando a representar a causa de 40% da infertilidade de casais na espécie humana. Nossos resultados mostram claramente que o plasma seminal de ovinos apresenta importantes proteínas que podem melhorar o funcionamento espermático, contribuindo para o aperfeiçoamento de estratégias que visem a aumentar a capacidade de fertilização do sêmen ovino, bem como melhorar a viabilidade de uso do sêmen ovino criopeservado usado em programas reprodutivos a campo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLGREN, G., RANNEVIK, G., LILJA, H., 1995. Impaired secretory function of the prostate in men with oligo-asthenozoospermia. **J. Androl.** 16, 491-498.
- ASHWORTH PJ, HARRISON RA, MILLER NG, PLUMMER JM, WATSON PF. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reprod Fertil Dev** 1994; 6:173–80.
- AUGER, J., EUSTACHE, F., ANDERSEN, A.G., IRVINE, D.S., JORGENSEN, N., SKAKKEBAEK, N.E., SUOMINEN, J., TOPPARI, J., VIERULA, M. & JOUANNET, P. (2001). Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. **Hum. Reprod.**, 16, 2710-2717.
- BAILEY JL, BILODEAU JF, CORMIER N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl** 2000; 21:1–7.
- BARRIOS B, FERNANDEZ-JUAN M, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ JA. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **J Androl** 2005; 26:539–49.
- BARRIOS B, PEREZ-PE R, GALLEGOS M, TATO A, OSADA J, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biol Reprod** 2000; 63:1531–7.
- BERUBE` B, SULLIVAN R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamster against a 26 kDa sperm glycoprotein. **Biol Reprod** 1994; 51:1255–1263.

BERGERON A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.71, 461–470, 2005.

BING, C., BAO, Y., JENKINS, J., SANDERS, P., MANIERI, M., CINTI, S., TISDALE, M.J., TRAYHURN, P., 2004. Zinc-alpha-2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101, 2500-2505.

CALVETE J. et al. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.407, p.201–6, 1997.

CALVETE, J.J. et al. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.399, p.147-152, 1996.

CONNER SJ, LEFIÈVRE L, KIRKMAN-BROWN JC, MICHELANGELI F, JIMENEZ-GONZALEZ C, OLIVEIRA GM, PIXTON KL, BREWIS IA, BARRAT CLR & PUBLICOVER SJ 2007. Understanding the physiology of pre-fertilization events in the human spermatozoa-a necessary prerequisite to developing rational therapy. **Reproduction** 563 237-256.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Madison, v.59, p.7-11, 1998.

DING, Z., QU, F., GUO, W., YING, X., WU, M., ZHANG, Y., 2007. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. **Mol. Reprod. Dev.** 74, 1124- 1131.

- DOMINGUEZ MP, FALCINELLI A, HOZBOR F, SANCHEZ E, CESARI A, ALBERIO RH. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology** 2008; 69:564 –73.
- EL-HAJJ GHAOUI R, GILLAN L, THOMSON PC, EVANS G, MAXWELL WM. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. **J Androl** 2007; 28: 109–22.
- ESCH F.S. et al. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v.113, p.861–867, 1983. 74
- EVANS G, MCPHIE C, MAXWELL WMC. The effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Proceed **14th International Congress on Animal Reproduction** 2000; 2:74.
- FONSECA VO, FRANCO CS, BERGMANN JAG. 1997. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore acasalados com elevado número de vacas. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.49, n.1.
- FONSECA VO. 1989. Puberdade, adolescência e maturidade sexual: aspectos histolopatológicos e comportamentais. In: **Congresso Brasileiro de reprodução Animal, 8, 1989, Belo Horizonte, Anais. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal** P. 77-83.
- FRASER, L.R. & DUDLEY, K. (1999). New insights into the t-complex and control of sperm function. **Bioessays**, 21, 304-312.
- FRENETTE , G.; LESSARD, C.; MADORE E.; FORTIER A., SULLIVAN, R. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. **Biology of Reproduction** 69, 1586-1592 (2003).

GAUDREAU C, LE'GARE' C, BE'RUBE' B, SULLIVAN R. The hamster sperm protein, P26h: a member of the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. **Biol Reprod** 1999; 61:264-273.

GAUDREAU C, SULLIVAN R. Immunization of hamsters against recombinant P26h causes a decrease in fertilization rate. **Reproduction** 2002; 123:307-313.

GWATHMEY, T.M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, Madison, v.75, p.501-507, 2006.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 69, n.3, p.809-15, 2003.

HARRISON, A., OLDS-CLARKE, P. E KING, S.M. (1998). Identification of the t complex-encoded cytoplasmic dynein light chain tctex1 in inner arm II supports the involvement of flagellar dyneins in meiotic drive. **J. Cell Biol.**, 140, 1137-1147.

HECHT, N.B. (1995). The making of a spermatozoon: a molecular perspective. **Dev. Genet.**, 16, 95-103.

HOLT, C. et al. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.18, p.312-323, 1997.

HUANG YH, CHU ST, CHEN YH. A seminal vesicle autoantigen of mouse is able to suppress sperm capacitation. Related events stimulated by serum albumin. **Biol Reprod.** v. 63, p.1562-1566, 2000.

HUW, L. Y., GOLDSBOROUGH, A. S., WILLISON, K E ARTZT, K. (1995). Tctex2: a sperm tail surface protein mapping to the t-complex. **Dev. Biol.**, 170, 183-194.

- JOBIM, M.I.M. et al. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 63, p. 2053-2062, 2005.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KING TE, MANN T. Sorbitol metabolism in spermatozoa. **Proc Roy Soc B** 1959; 151:226–243.
- KOBAYASHI T, KANEKO T, IUCHI Y, MATSUKI S, TAKAHASHI M, SASAGAWA I, NAKADA T, FUJII J. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. **J Androl** 2002; 23:674–683.
- LEAHY T, MARTI JI, EVANS G, MAXWELL WM. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Reprod Fertil Dev** 2009; 21:571– 8.
- MANCO G, ABRESCIA P. A major secretory protein from rat seminal vesicle binds ejaculated spermatozoa. **Gamete Res.** v.21, p.71–84, 1988.
- MANJUNATH, P., THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109–119, 2002.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; BAILLARGEON, L, ROBERTS, KD. The calmodulin-binding proteins of bovine semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.97, p.75-81, 1993. 82
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, New York, v. 7, p. 231-238, 1987.

MARTI E, MARTI JI, MUIÑO-BLANCO T, CEBRIÁN-PÉREZ JA. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **J Androl** 2008; 29:459–67.

METAFORA S, PELUSO G, PERSICO P, RAVAGNAN G, ESPOSITO C, PORTA R. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. **Biochem Pharmacol**. v.38, p.121–131, 1988

MONFORT L, FRENETTE G, SULLIVAN R. Sperm-zona pellucida interaction involves a carbonyl reductase activity in the hamster. **Mol Reprod Dev** 2002; 61:113–119.

MORAES JCF, HORN MM, ROSADO JR. AG. 1998. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural** 28:647-652.

MOURA AA, KOC H, CHAPMAN DA, KILLIAN GJ. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **JOURNAL OF ANDROLOGY**. V. 27(2), P.201-211, 2006a.

MOURA, A. A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 214-222, 2007.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 201–211, 2006.

MOURA, A.A. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.98, p.169-188, 2007a.

MOURA, A.A., CHAPMAN, D.A., KOC, H., KILLIAN, G.J., 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **J. Androl.** 27, 534-541.

MOURA, P.P. et. al., Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do semen criopreservado em ovinos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, 2010.

MURDOCH RN, WHITE IG. Studies of the metabolism of human spermatozoa. **J Reprod Fertil** 1968; 16:351–361.

OLDS-CLARKE, P. & JOHNSON, L.R. (1993). t haplotypes in the mouse **Dev. Biol.**, 155, 14-25.

OLLERO M, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. **J Androl** 1997; 18:732–9.

PARENT S, LEFIE`VRE L, BRINDLE Y, SULLIVAN R. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. **Mol Reprod Dev.** 1999; 52:57–65.

PEDDINTI, D. et al., Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **Bio Med Central.** p.1-14, 2008.

PEITZ B. Effects of seminal vesicle fluid components on sperm motility in the house mouse. **J Reprod Fertil.** v.83, p.169–176, 1988.

PEREZ LJ, VALCARCEL A, DELASHERAS MA, MOSES D, BALDASSARRE H.

Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**. v.46, p.131–140, 1996.

PÉREZ-PÉ R, GRASA P, FERNÁNDEZ-JUAN M, PELEATO ML, CEBRIÁN-

PÉREZ JA, MUIÑO-BLANCO T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. **Mol Reprod Dev**. v.61, p.226–233, 2002.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa.

Theriogenology, Amsterdam, v.56, p.425-434, 2001.

PPM/IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em: 23 de março de 2011.

QU, F., YING, X., GUO, W., GUO, Q., CHEN, G., LIU, Y., DING, Z., 2007. The role of Zn-alpha2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. **Reproduction** 134, 569-576.

REBOLLEDO A, SIERRA L, TAMAYO A, LORIA A, DENIS S, OSSES R, PARRA E, MONSREAL L, UGALDE J. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. **Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidade del Zulia** 2007; 17:73-6.

REGO, J.P.A. **Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Dissertação de Mestrado, 106p. 2010.

RONQUIST G, NILSSON BO (EDS). Prostasomes. **Wenner-Gren Intern Series**, vol 81. London: Portland Press; 2002.

SAACK RG, DALTON JC, NADIR S, NEBEL RL, BAME JH: Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal reproduction science** 2000, 60-61: 663-677.

SAEZ F, FRENETTE G, SULLIVAN R. Epididymosomes and prostasomes: their roles in post-testicular maturation of the sperm cells. **J Androl** 2003; 24:149–154.

SANCHEZ-LUENGO, S. et al. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 25, n. 2, p. 234-244, 2004.

SASSONE-CORSI, P. (1997). Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells. **Cell**, 88, 163-166.

SOUZA C.E.A.; ARAÚJO, A.A.; OLIVEIRA, J.T.A. et al. Reproductive Development of Santa Inês Rams During the First Year of Life: Body and Testis Growth, Testosterone Concentrations, Sperm Parameters, Age at Puberty and Seminal Plasma Proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.644-653, 2010.

SOUZA, C.E.A, MOURA, A.A, MONACO, E, KILLIAN, G.J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins BSP A1/A2, BSP 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Anim. Reprod. Sci.** v.105, p.72-89, 2008.

TAKAHASHI M, FUJII J, MIYOSHI E, HOSHI A, TANIGUCHI N. Elevation of aldose reductase gene expression in rat primary hepatoma and hepatoma cell lines: implication in detoxification of cytotoxic aldehydes. **Int J Cancer** 1995; 15:749–754.

TANTIBHEDHYANGKUL, J., WEERACHATYANUKUL, W., CARMONA, E., XU, H., ANUPRIWAN, A., MICHAUD, D., TANPHAICHITR, N., 2002. Role of

sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm zona pellucida binding. **Biol. Reprod.** 67, 212-219.

TEDESCHI, G. et al. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin.

European Journal of Biochemistry, Malden, v.267, p.6175–6179, 2000.

TRIPODIS, N., MASON, R., HUMPHRAY, S.J., DAVIES, A.F., HERBERG, J.A., TROWSDALE, J., NIZETIC, D., SENGER, G. & RAGOUESSIS, J. (1998). Physical map of human 6p21.2-6p21.3: region flanking the centromeric end of the major histocompatibility complex. **Genome. Res.**, 8, 631-643.

TRIPODIS, N., PALMER, S., PHILLIPS, S., MILNE, S., BECK, S. & RAGOUESSIS, J. (2000). Construction of a high-resolution 2.5-Mb transcript map of the human 6p21.2-6p21.3 region immediately centromeric of the major histocompatibility complex. **Genome. Res.**, 10, 454-472.

VAN DER HOORN, F.A., TARNASKY, H.A. & NORDEEN, S.K. (1990). A new rat gene RT7 is specifically expressed during spermatogenesis. **Dev. Biol.**, 142, 147-154.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v.1, p.39–50, 2003.

WATSON PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **J.Reprod Fertil** 1981; 62:483–92.

WEERACHATYANUKUL, W., XU, H., ANUPRIWAN, A., CARMONA, E., WADE, M., HERMO, L., DA SILVA, S.M., RIPPSTEIN, P., SOBHON, P., SRETARUGSA, P., TANPHAICHITR, N., 2003. Acquisition of arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. **Biol. Reprod.** 69, 1183-1192.

- WILLISON, K., KELLY, A., DUDLEY, K., GOODFELLOW, P., SPURR, N., GROVES, V., GORMAN, P., SHEER, D. & TROWSDALE, J. (1987). The human homologue of the mouse t-complex gene, TCP1, is located on chromosome 6 but is not near the HLA region. **Embo j.**, 6, 1967-1974.
- WU, A., ANUPRIWAN, A., IAMSAARD, S., CHAKRABANDHU, K., SANTOS, D.C., RUPAR, T., TSANG, B.K., CARMONA, E., TANPHAICHITR, N., 2007. Sperm surface arylsulfatase A can disperse the cumulus matrix of cumulus oocyte complexes. **J. Cell Physiol.** 213, 201-211.
- YEUNG, C.H., TUTTELMANN, F., BERGMANN, M., NORDHOFF, V., VORONA, E. & COOPER, T.G. (2009). Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. **Hum. Reprod.**, 24, 1288-1295.

**CAPÍTULO 2: INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FONTES DE PROTEÍNA E
DE NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO NA DIETA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO TESTICULAR, GANHO DE PESO, PARÂMETROS
SEMINAIS E EXPRESSÃO PROTÉICA NO PLASMA SEMINAL DE
CORDEIROS MORADA NOVA.**

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a influência de diferentes fontes de proteína da dieta (farelo de soja, feno de folha de leucena e torta de algodão) e de nitrogênio não-protéico (uréia) sobre o peso corporal, desenvolvimento testicular e qualidade espermática dos animais estudados, bem como a expressão de proteínas no plasma seminal dos animais potencialmente relacionadas às dietas. Foram utilizados 20 cordeiros da raça Morada Nova com idade variando entre 24 e 39 semanas. Para os critérios de desenvolvimento testicular (circunferência escrotal, espessura testicular, largura testicular e comprimento testicular) não houve diferença significativa ($p<0,05$). ao final do período experimental

Animais alimentados com torta de algodão tiveram um aumento significativo do peso corporal ($p<0,05$), quando comparado com feno de leucena. No mesmo período, o peso corporal dos animais alimentados com feno de leucena, soja e uréia foi semelhante. Diferenças entre os tratamentos ($p <0,05$) foram observadas apenas para motilidade progressiva individual e defeitos totais. O sêmen dos animais alimentados com dietas contendo feno de leucena apresentou baixa motilidade progressiva individual quando comparados aqueles alimentados com dietas contendo farelo de soja. No entanto, animais alimentados com dietas contendo torta de algodão e uréia tinham valores

semelhantes para a motilidade progressiva. Quando os defeitos totais foram analisados, houve uma diferença significativa entre os grupos de feno de leucena e uréia.

Foi detectado uma quantidade de $246,6 \pm 13,9$, $236,0 \pm 12,4$, $261,2 \pm 20,2$ e $243,8 \pm 20,5$ spots por gel nos grupos de farelo de soja, feno de folhas de leucena, torta de algodão e uréia, respectivamente. Não houve diferenças significativas no número de spots por gel, entre os grupos. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nas intensidades de doze spots dos mapas protéicos. Foi observado um aumento da expressão do spot S8707 (62,8 kDa, pI 6,9) em animais alimentados com feno de folhas de leucena, quando comparados àqueles alimentados com farelo de soja, bem como correlação negativa com a motilidade progressiva individual (MPI). Estas observações indicam que fatores presentes no feno de folhas de leucena promovem um aumento na expressão da proteína (S8707), o que provavelmente provoca alterações deletérias no mecanismo que controla a motilidade progressiva da célula espermática, já que neste grupo observou-se valores mais baixos para MPI.

Palavras chaves: cordeiros, nutrição, proteína, plasma seminal

ABSTRACT

This study evaluated the influence of different sources of dietary protein (soybean meal, leucaena leaf hay and cottonseed meal) and non-protein nitrogen (urea) on body weight, testicular development and sperm quality of the animals studied and protein expression in the seminal plasma of the animals potentially related to the diets. We used 20 Morada Nova lambs aged between 24 and 39 weeks. For the testicular development criteria (circumference scrotal, testicular thickness, width and length testicular) no significant difference ($p < 0.05$) was observed at the end of experiment. Animals fed cottonseed meal had a significant increase in body weight ($p < 0.05$) compared with Leucaena hay. In the same period, the body weight of animals fed leucaena hay, soybeans and urea was similar. Differences between treatments ($p < 0.05$) were observed only for individual progressive motility and total defects. The semen of animals fed diets containing leucaena showed low motility individual when compared with those fed diets containing soybean meal. However, animals fed diets containing cottonseed meal and urea had similar values for progressive motility. When the total defects were analyzed, there was a significant difference between groups of leucaena hay and urea. Detected an amount of 246.6 ± 13.9 , 236.0 ± 12.4 , 261.2 ± 20.2 and 243.8 ± 20.5 spots per gel in groups of soybean meal, leucaena leaf hay, cottonseed meal and urea, respectively. No significant differences in the number of spots per gel, in both groups. Significant differences ($p < 0.05$) were observed in the intensities of twelve spots in the proteic maps. An increased expression of spot S8707 (62.8 kDa, pI 6.9) in animals fed with hay and leaves of leucaena compared to those fed soybean meal, and a negative correlation with individual motility (MPI). These observations indicate that factors present in hay sheets leucaena promote an increase in protein expression

(S8707), the likely cause deleterious changes in the mechanism controlling the motility of sperm cells, as observed in this group lowest for MPI.

Key words: sheep, nutrition, protein, seminal plasma

INTRODUÇÃO

Vários estudos tiveram como objetivo determinar as fontes alternativas de proteínas para ruminantes, a fim de reduzir os custos com concentrado sem influenciar o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais. A nutrição desempenha um papel crucial nos processos de fisiologia animal, e tornar-se mais pronunciado em animais em crescimento, uma vez que, neste período ocorre a maturação, que envolve processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, importantes para a reprodução (Brown, 1994). Em carneiros adultos, um dos efeitos da nutrição sobre a reprodução é observado na alteração do peso dos testículos e também na diminuição da produção de gametas (Hötzl et al, 1998, Martin et al 2010;). A nutrição influencia a fertilidade de ruminantes diretamente pelo suprimento de nutrientes específicos necessários para o desenvolvimento do óvulo e do espermatozóide, ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário e prenhez. A nutrição também influencia a fertilidade indiretamente, através do seu impacto na concentração circulatória de hormônios e outros metabólitos nutrientes-sensitivos que são requeridos para o sucesso desses processos. (Robinson et al., 2006). No entanto, os compostos presentes na dieta podem provocar efeitos deletérios sobre a função reprodutiva normal (Porat, 1990, Taitzoglou et al., 2001,).

Alguns mecanismos sobre os possíveis efeitos da proteína na fertilidade podem ser postulados fundamentados no metabolismo protéico do ruminante. O primeiro efeito pode ser o excesso de ingestão de proteína degradável no rúmen (PDR), que provoca uma elevação nos níveis plasmáticos e teciduais de amônia (NH_3), uréia e outros compostos nitrogenados. A maioria da amônia absorvida no rúmen é convertida em uréia pelo fígado. Níveis elevados de uréia e amônia no sangue provocam aumento nos níveis presentes nos tecidos e flúidos reprodutivos (Ferguson & Chalupa, 1989). A

ingestão de quantidades excessivas de proteína bruta ou PDR aumenta a concentração de nitrogênio uréico no sangue (NUS) e no leite (NUL), e altera algumas funções uterinas, que podem comprometer a taxa de concepção (Santos & Amstalden, 1998). Segundo Barton et al. (1996), dietas contendo elevado teor de proteína, em geral, com incremento na PDR têm mostrado decréscimo na fertilidade, causando morte embrionária devido ao comprometimento do ambiente uterino. O excesso de PDR, PNDR (proteína não degradável no rúmen) ou de NNP (nitrogênio não protéico) nas dietas de vacas em lactação provocam redução da fertilidade no pós-parto, alteração da fisiologia ovariana e uterina, monitorados pelos teores de uréia no sangue e no leite. Assim, Butler (1998) observou que teor de N-uréia plasmática (NUP) acima de 19 mg/dL foi associado à redução da concentração plasmática de progesterona e alteração do pH e ambiente uterino, constituindo as principais causas da redução da fertilidade de vacas no início da lactação.

Sobre os efeitos da nutrição protéica sobre as variáveis reprodutivas no macho, os estudos são contraditórios, uma vez que tem sido demonstrado que o tamanho dos testículos e produção de espermatozóides foram aumentados com o aumento no consumo de proteína dietética (Martin et al., 1994, Fernández et al. 2004, , Fourie et al., 2004). Por outro lado, tem sido também relatado que altos níveis de proteína dietética produz reduções significativas na qualidade do sêmen (Al-Haboby et al 1999; Elmaz et al, 2007). Várias são as fontes nutricionais e protéicas usadas na alimentação animal. Essa disponibilidade alimentar pode variar enormemente entre as regiões e também em estações climáticas diferentes. O uso de determinadas fontes nutricionais pode determinar o sucesso de um bom reprodutor durante sua fase de crescimento e também influenciar na qualidade espermática de animais submetidos a tratamentos alimentares diversos. O desenvolvimento testicular tem uma relação direta com os níveis hormonais

liberados pelo eixo hipotálamo-hipofisário que tem ação específica sobre o desenvolvimento testicular e consequentemente na produção dos hormônios que irão agir diretamente sobre o mecanismo reprodutivo e o processo de formação dos gametas. Apesar da discrepância destes resultados, é evidente a importância de se avaliar se diferentes fontes alimentares, notadamente as fontes protéicas ou aquelas que fornecem nitrogênio não-protéico podem influenciar o desempenho produtivo e reprodutivo de cordeiros.

O plasma seminal contém proteínas derivadas principalmente das glândulas sexuais acessórias e do epidídimos, que interagem com componentes da membrana do espermatozóides e participam de vários processos associados com a fertilidade masculina. Tais processos incluem, reação acrossômica e capacitação (Manjunath e Therien, 2002), motilidade (Elzanaty et al., 2002), a integridade do DNA (Chen et al., 2002), proteção das células contra o choque térmico, as reações oxidativas e imunológicas (Moura et al, 2007, Muiño-Blanco et al, 2008.), o transporte de íons e substâncias lipofílicas e interação com o oviduto e fertilização do óvulo (Riffo e Párraga 1997, Gwathmey et al, 2003, Yuan et al 2003; Moura et al 2007). Apesar destas associações entre proteínas no plasma seminal e os espermatozóides, não há um conhecimento específico sobre os efeitos potenciais de fontes de proteína das dietas sobre essas proteínas seminais.

A avaliação dos valores de desenvolvimento testicular, associado ao crescimento corporal e comparado ao comportamento de expressão de proteínas no plasma seminal pode ser bastante conclusivo quando ao uso ou não de determinadas fontes alimentares encontradas no Nordeste Brasileiro

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeitos de diferentes fontes de proteína e de fonte de nitrogênio não-protéico usadas na alimentação de cordeiros da raça Morada Nova (Soja, feno de leucena, ureia e torta de algodão) sobre o desenvolvimento testicular (circunferência escrotal, espessura testicular, largura testicular e comprimento testicular) e qualidade espermática através da mensuração dos principais parâmetros seminais e de morfologia espermática.

Será avaliado a influência dos diferentes tratamentos alimentares sobre o desenvolvimento do peso corporal dos animais da 24^a a 39^a semanas de vida. O perfil protéico do plasma seminal será avaliado através da análise de mapas protéicos bidimensionais pela técnica de eletroforese dos animais às 39 semanas de idade, visando observar a influência ou não dos diferentes nutrientes sobre a qualidade espermática dos animais em estudo através da expressão ou não de proteínas que possam influenciar processos reprodutivos no macho, tais como aqueles relacionados a motilidade ou defeitos espermáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e dieta

O experimento foi conduzido no Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura da Universidade Federal do Ceará, localizado na latitude 3°45', de longitude oeste 38°32' e 15,5 m acima do nível do mar. O clima desta região é caracterizado como quente e úmido, de acordo com a classificação de Koeppen

Vinte cordeiros Morada Nova com peso corporal de $14,8 \pm 1,0$ kg e idade de $182,4 \pm 13,6$ dias, foram usados. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (5 animais por grupo) de fonte de proteína e nitrogênio não-protéico na dieta: farelo de soja, uréia, feno de folha de leucena (*Leucaena leucocephala*) e torta de algodão.

Os tratamentos com fonte de proteína foram uréia e feno de folha de leucena substituindo 100% da fonte de proteína com tratamento convencional e farelo do caroço de algodão substituindo 51,8% do valor máximo para o qual não houve mudanças na composição química da dieta. As dietas foram: feno de capim-elefante como volumoso e foram formuladas de acordo com o NRC (2007) para ganhos de 100 g por animal por dia sendo isocalóricas (68% NDT) e isoprotéicas (proteína bruta 14%). A composição centesimal e análise química das dietas experimentais são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

O desenvolvimento testicular foi estudado durante o ensaio de digestibilidade, quando os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais durante 21 dias, durante o teste de desempenho, e ainda mais 77 dias, alojados em baias.

Tabela 1: Composição dos ingredientes das dietas experimentais

Ingredientes	Quantidade na dieta (% de matéria prima)			
	Soja	Uréia	Leucena	Torta de algodão
Milho moído	86,40	95,66	75,65	79,70
Farelo de soja	11,20	0,00	0,00	5,40
Uréia	0,00	1,79	0,00	0,00
Feno de leucena	0,00	0,00	22,03	0,00
Torta de algodão	0,00	0,00	0,00	12,48
Calcário calcítico	0,20	0,12	0,00	0,19
Fosfato bicálcico	0,20	0,44	0,46	0,37
Premix mineral ¹	2,00	1,99	1,86	1,86

¹Composição: fosfato, 65 g; cálcio, 160 g, enxofre, 15 g, magnésio, 6,5 g, sódio, 150 g, cobalto, 0,125 g; de zinco, 4,5 g; ferro, 1,7 g, 4,5 g de manganês, iodo, 0,06 g, selênio, 0,03 g; flúor, 0,95 g; veículo, 1,000 g.

Tabela 2. Composição química da forragem e concentrados experimental (% MS)

Rações	MS	MM	PB	EE	FDN	FDA	NDT
Soja₁₀₀	87,91	3,86	14,39	3,82	31,89	4,12	80,74
Ureia₁₀₀	86,64	3,75	14,29	3,27	31,76	3,00	80,18
Leucaena₁₀₀	88,063	5,15	12,67	4,00	40,48	7,62	74,12
Torta de algodão_{51,8}	88,43	4,96	14,11	3,31	42,37	8,97	72,94
Pennisetum purpureum	85,51	12,94	5,89	2,49	85,52	50,29	41,73

MS, matéria seca; MM, matéria mineral; PB, proteína bruta, EE, extrato etéreo (gordura); FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; TND, Nutrientes digestíveis totais.

Procedimento experimental

Os parâmetros de peso corporal, circunferência escrotal (CE), largura testicular (LT), espessura (ET) e comprimento (CT) foram determinadas a cada duas semanas em todos os animais. As medidas foram tomadas com uma fita de plástico (Walmur Instrumentos Veterinários, RS, Brasil) na maior circunferência do escroto e diâmetro testicular e o comprimento foi determinado com um paquímetro, conforme descrito por (Souza et al., 2010).

Coleta e análise do sêmen

Após 21 dias de tratamento, amostras de sêmen foram obtidas por eletroejaculação (Souza et al. 2010). O volume de ejaculação (VOL) foi medido diretamente em um tubo graduado e um aliquota de 10 µl foi diluído (1:400) em solução salina para a determinação da concentração espermática (CONC), por contagem em câmara de hemocitômetro (Evans e Maxwell, 1987). O número total de espermatozoides por ejaculado foi estimado pela multiplicação do volume do ejaculado pela concentração espermática. A motilidade foi avaliada através de uma gota de sêmen sobre uma lâmina sob um microscópio com contraste de fase, considerando uma escala de 0 a 5 (CBRA, 1998).

O sêmen foi mantido a 37 ° C, imediatamente após a coleta e avaliado para motilidade progressiva, de acordo Corteel (1981) com escore 0-5, onde 0 corresponde à ausência de espermatozoides móveis e 5 motilidade progressiva máxima. A porcentagem de espermatozoides móveis foi avaliada de acordo com o descrito em publicações anteriores (Souza et al., 2010, Moura et al., 2011). O percentual de

alterações morfológicas foi determinada após a análise com o azul de bromofenol (Medeiros et al., 2006), de acordo com a classificação de Blom (1973). Os defeitos morfológicos foram classificados como maiores, menores e total.

Eletroforese bidimensional em gel do plasma seminal e análise dos mapas protéicos.

As amostras de sêmen foram congeladas em gelo seco e levadas para laboratório, onde foram centrifugadas a 700 g por 10 minutos a 4°C para uma pré-separação. Em seguida estas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 g por uma hora a 4° C, conforme descrito previamente (Moura et al., 2006; Souza et al., 2010). Após a última centrifugação, o plasma seminal foi aliquotado e armazenado a -80° C. Para a preparação dos géis, um volume contendo 400µg de proteínas foi misturado a um volume tampão de re-hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, Ditiotreitol (DTT) 65mM, anfólitos livres 0,5% (IPG buffer, 4-7), CHAPS 0,5% e azul de bromofenol (traços) suficiente para 250µl (Souza et al., 2010). A solução acima foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de 13 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 4 – 7(IPGs; GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA) por, aproximadamente, 15 a 20 horas. A focalização isoelétrica foi conduzida em um equipamento ETTANTM IPGphor 3 (GE Lifesciences, USA), com a seguinte programação: 200V (200 Vh), 500V (1000 Vh), 5000V (10000 Vh), 10000V (22000 Vh) totalizando 33200 Vh. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio I (6M uréia, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT) e re-equilibradas por 15 minutos adicionais no tampão de equilíbrio II (similar ao tampão de equilíbrio I, mas contendo 2,5% de iodoacetamina no lugar do DTT). Após a etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida (SDS -PAGE;

15%T/0,8%C, 250V, 30 mA por gel), com base em sua massa molecular(Hoefer SE 600, GE Lifesciences, Piscattaway, NJ, USA) (O' Farrel, 1975, Souza et al., 2010). Após a separação, as proteínas foram visualizadas utilizando-se o método do Coomassie coloidal (Candiano et al., 2004), com modificações. Para tanto, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos, nas soluções 1 e 2, sequencialmente (200 mL/gel): Solução 1:Ácido fosfórico 2% e etanol 30%, em água. Solução 2 : Ácido fosfórico 2%, em água. Após a última lavagem com a solução 2, os géis permaneceram em contato com uma solução contendo ácido fosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 15% em água, por 20 minutos(200 mL/gel). Em seguida, adicionou-se à esta solução 4 mL/gel de Coomassie Blue G-250(solução aquosa a 2%). O corante permaneceu em contato com os géis por cerca de 72 horas. Após este período, a solução contendo o corante foi desprezada, e os géis lavados com água destilada.

Digitalização e análise dos géis

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando o ImageScanner II(GE Lifesciences, USA) na resolução de 300 dpi modo transparente e filtro verde . As imagens foram salvas como arquivos TIFF (tif) e analisadas utilizando o aplicativo PDQuest versão 7.3.0 (Bio-Rad Laboratories, USA). Um gel representativo foi criado com base nos géis de todos os indivíduos. Spots presentes consistentemente nos mapas também foram adicionados ao gel sintético, conforme descrito (Moura et al., 2006; Souza et al., 2010). Proteínas presentes em diferentes regiões dos géis foram utilizadas como marcos de localização de forma a permitir o alinhamento correto de cada spot nos diferentes géis. A quantificação dos spots foi dada em partes por milhão (ppm) da

densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo (Moura et al., 2006).

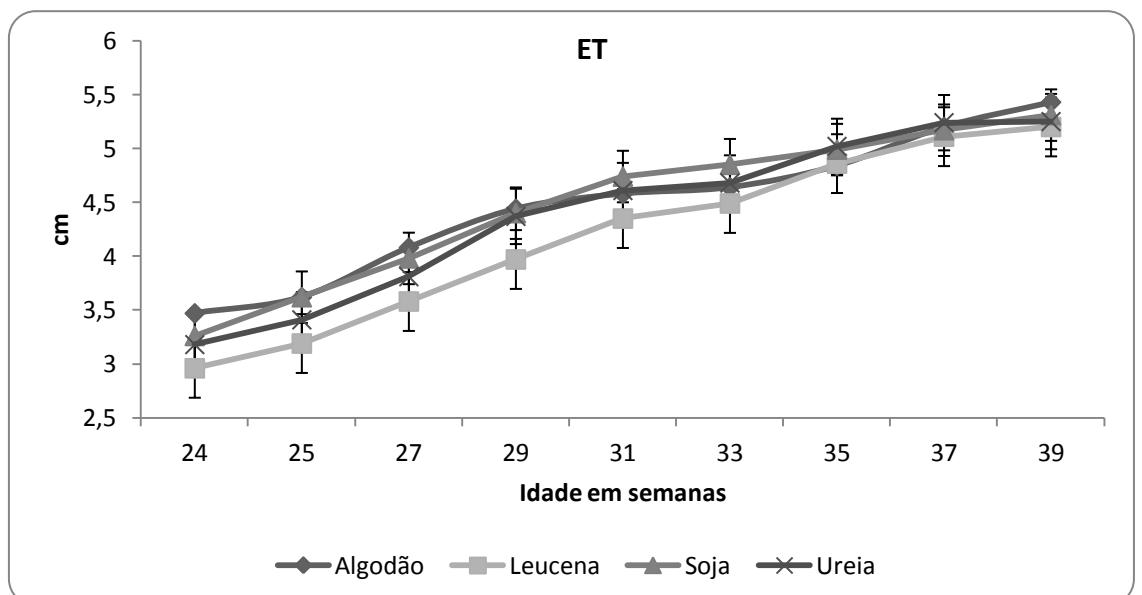
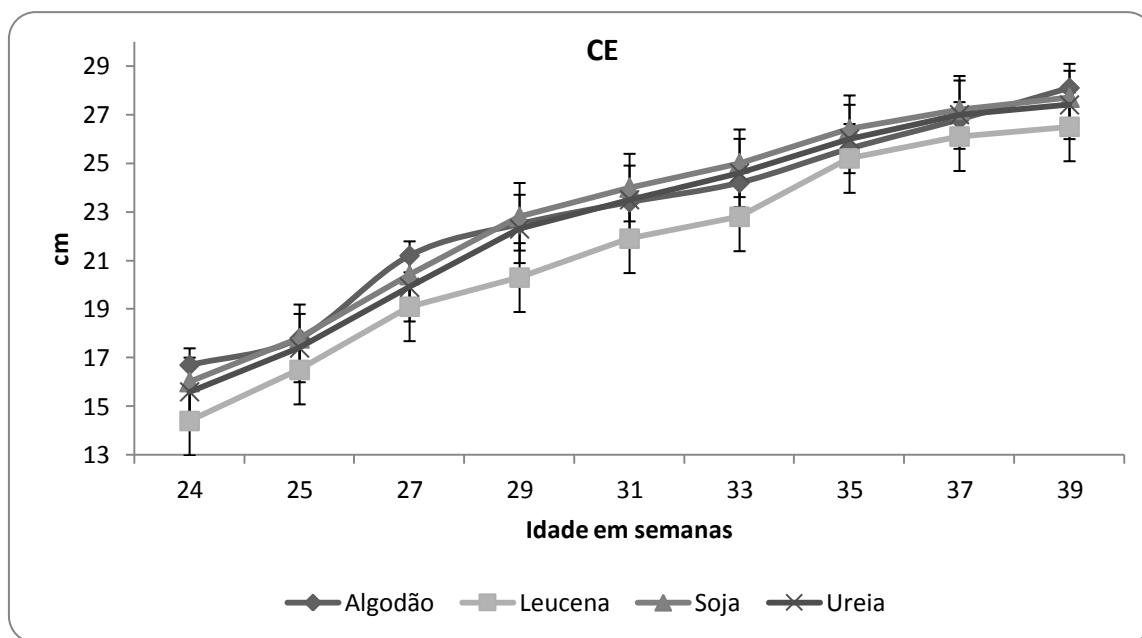
Análise Estatística

Variáveis foram testadas quanto à normalidade de Shapiro-Wilk e de assimetria Kurtosis por meio de procedimento de análise univariada (SAS, 2003). Concentração espermática e espermatozoides totais por ejaculado foram transformados ($\log(x + 1)$), enquanto o percentual de defeitos espermáticos maiores, submetidos à transformação angular (arco seno ($\sqrt{x/100}$)) para o teste de distribuição normal. As variáveis com avaliação subjetiva, motilidade, vigor espermático e turbulência foram consideradas variáveis não-paramétricas (Sampaio, 2002). A avaliação dos parâmetros testicular foi analisada de forma aleatória (ensaios/idade/data). Diferenças entre os tratamentos nas várias amostras foram estimadas utilizando o teste F. As variáveis paramétricas foram avaliadas pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste t de Student e SNK, de acordo com seu coeficiente de variação (Sampaio, 2002). As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (Sampaio, 2002), através de um procedimento NPAR1WAY do SAS.

RESULTADOS

Peso corporal e desenvolvimento testicular

Os parâmetros de desenvolvimento testicular {circunferência escrotal(CE); espessura testicular(ET); largura testicular (LT) e comprimento testicular (CT) } foram inalterados entre os diferentes tratamentos ao final do período experimental. (Figura 1)



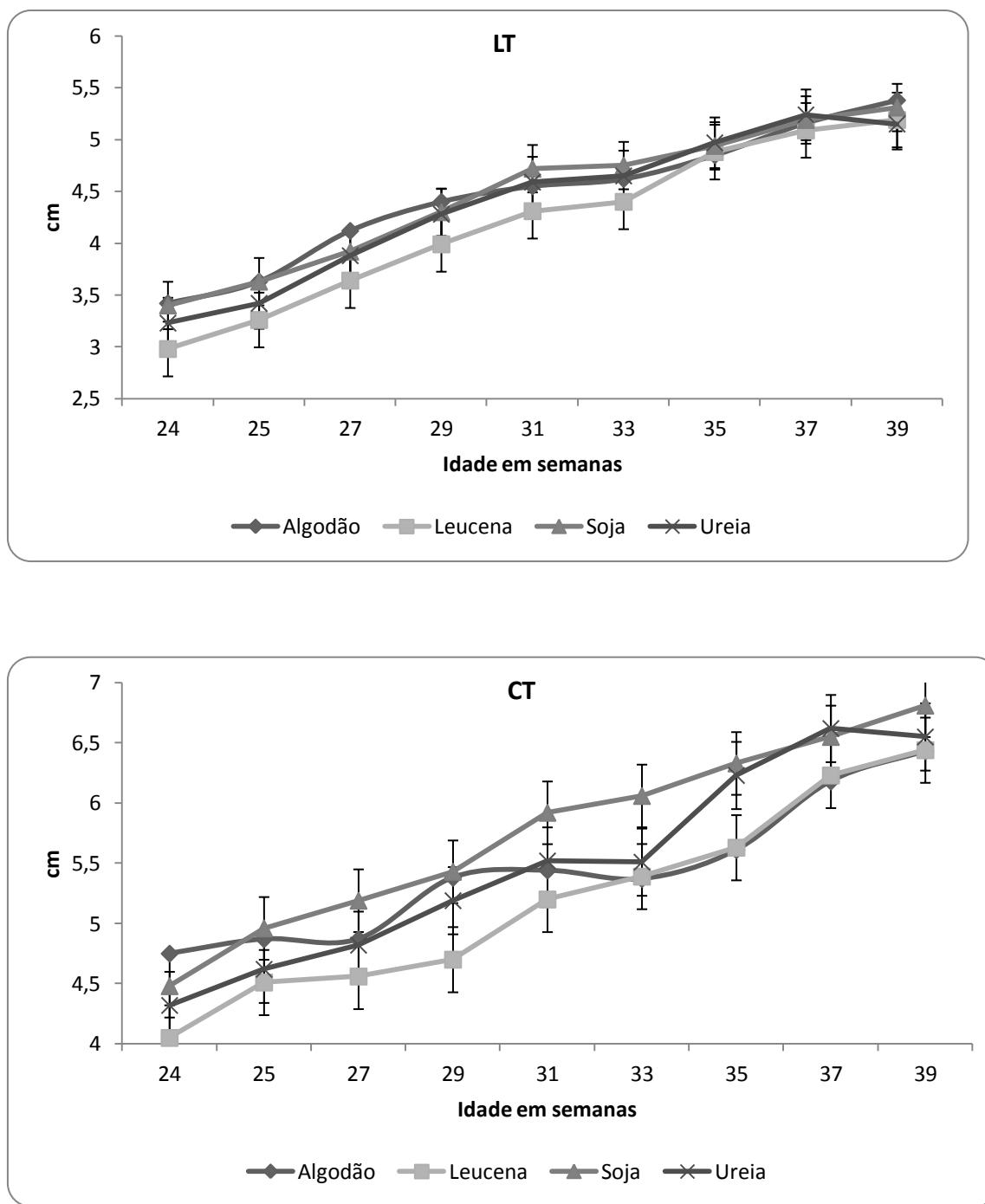


Figura 1. Parâmetros de desenvolvimento testicular em cordeiros Morada Nova alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína.

Animais alimentados com torta de algodão tiveram um aumento significativo do peso corporal, quando comparado com a alimentação do grupo com feno de leucena (p

<0,05) No mesmo período, o peso corporal dos animais alimentados com feno de leucena, soja e uréia foi semelhante (Tabela 3).

Tabela 3 Peso corporal (kg), em cordeiros Morada Nova alimentados com dieta contendo diferentes fontes protéicas

Idade (semanas)	Semanas	Tratamento			
		Soja	Leucena	Torta de algodão	Uréia
24	24	14,6 ± 0,6	14,8 ± 0,3	15,2 ± 0,3	14,8 ± 0,4
	25	16,5 ± 0,6	16,0 ± 0,3	16,8 ± 0,4	15,6 ± 0,7
	27	17,9 ± 0,6	17,4 ± 0,3	18,5 ± 0,3	17,7 ± 0,6
	29	20,3 ± 0,6	18,8 ± 0,3	20,0 ± 0,9	19,8 ± 0,8
	31	21,5 ± 0,5	20,5 ± 0,2	21,8 ± 0,4	20,8 ± 0,8
	33	23,2 ± 0,5 ^{ab}	21,6 ± 0,3 ^b	24,3 ± 0,7 ^a	22,7 ± 1,1 ^{ab}
	35	25,0 ± 0,6 ^{ab}	23,7 ± 0,4 ^b	26,4 ± 0,8 ^a	24,4 ± 1,0 ^{ab}
	37	26,4 ± 0,7 ^{ab}	25,0 ± 0,3 ^b	28,9 ± 0,7 ^a	25,5 ± 0,9 ^b
	39	28,8 ± 0,8 ^{ab}	26,8 ± 0,5 ^b	31,4 ± 1,1 ^a	26,7 ± 1,1 ^b

Médias seguidas de letras diferentes sobrescritas são diferentes ($p <0,05$) quando comparados com a avaliação na semana 24.

Parâmetros seminais

Diferenças entre os tratamentos ($p <0,05$) foram observadas apenas para motilidade progressiva individual e defeitos totais (Tabela 4). O sêmen dos animais alimentados com dietas contendo feno de leucena apresentou baixa motilidade progressiva ($p <0,05$) quando comparados aqueles alimentados com dietas contendo farelo de soja. No entanto, animais alimentados com dietas contendo torta de algodão e uréia tinham valores semelhantes para a motilidade progressiva. Quando os defeitos totais foram analisados, houve uma diferença significativa entre os grupos de feno de leucena e uréia. (Tabela 4)

Tabela 4. Parâmetros seminais de cordeiros Morada Nova alimentados com dieta contendo diferentes fontes protéicas

Parâmetros	Tratamento				
	Seminais	Soja	Leucena	Torta de algodão	Uréia
VE (ml)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	
CONC (10^6 /ml)	270,0 ± 151,7	540,0 ± 172,5	542,0 ± 209,6	280,0 ± 44,4	
TEE (n)	184,0 ± 87,4	427,0 ± 174,0	489,2 ± 217,2	296,4 ± 66,2	
TURB (0-5)	1,5 ± 0,8	2,0 ± 0,5	2,7 ± 0,7	2,9 ± 0,4	
MPI (0-5)	3,2 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,6 ^b	2,3 ± 0,2 ^{ab}	3,0 ± 0,2 ^{ab}	
PEM (%)	64,0 ± 8,1	55,0 ± 14,1	55,0 ± 13,2	74,0 ± 4,0	
DMAI (%)	2,8 ± 1,2	1,5 ± 0,6	1,9 ± 0,6	3,2 ± 0,9	
DMEN (%)	6,2 ± 1,5	3,8 ± 0,9	6,2 ± 1,9	7,7 ± 1,1	
DT (%)	9,0 ± 2,5 ^{ab}	5,3 ± 1,2 ^b	8,1 ± 1,4 ^{ab}	10,9 ± 1,5 ^a	

VE: volume do ejaculado; CONC: concentração espermática; TEE: total de espermatozóides por ejaculado; TURB: turbilhonamento; MPI: motilidade progressiva individual; PEM: porcentagem de espermatozóides móveis; DMAI: defeitos maiores; DMEN: defeitos menores; DT: defeitos totais.

Valores representam a média ± desvio padrão da media. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as dietas experimentais.

Proteínas do plasmal seminal

Nós detectamos uma quantidade de 246,6 ± 13,9, 236,0 ± 12,4, 261,2 ± 20,2 e 243,8 ± 20,5 spots por gel nos grupos de farelo de soja, feno de folhas de leucena, torta de algodão e uréia, respectivamente. Não houve diferença significativa no número de spots por gel, entre os grupos. No entanto, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nas intensidades de doze spots dos mapas protéicos (Figuras 2 e 3).

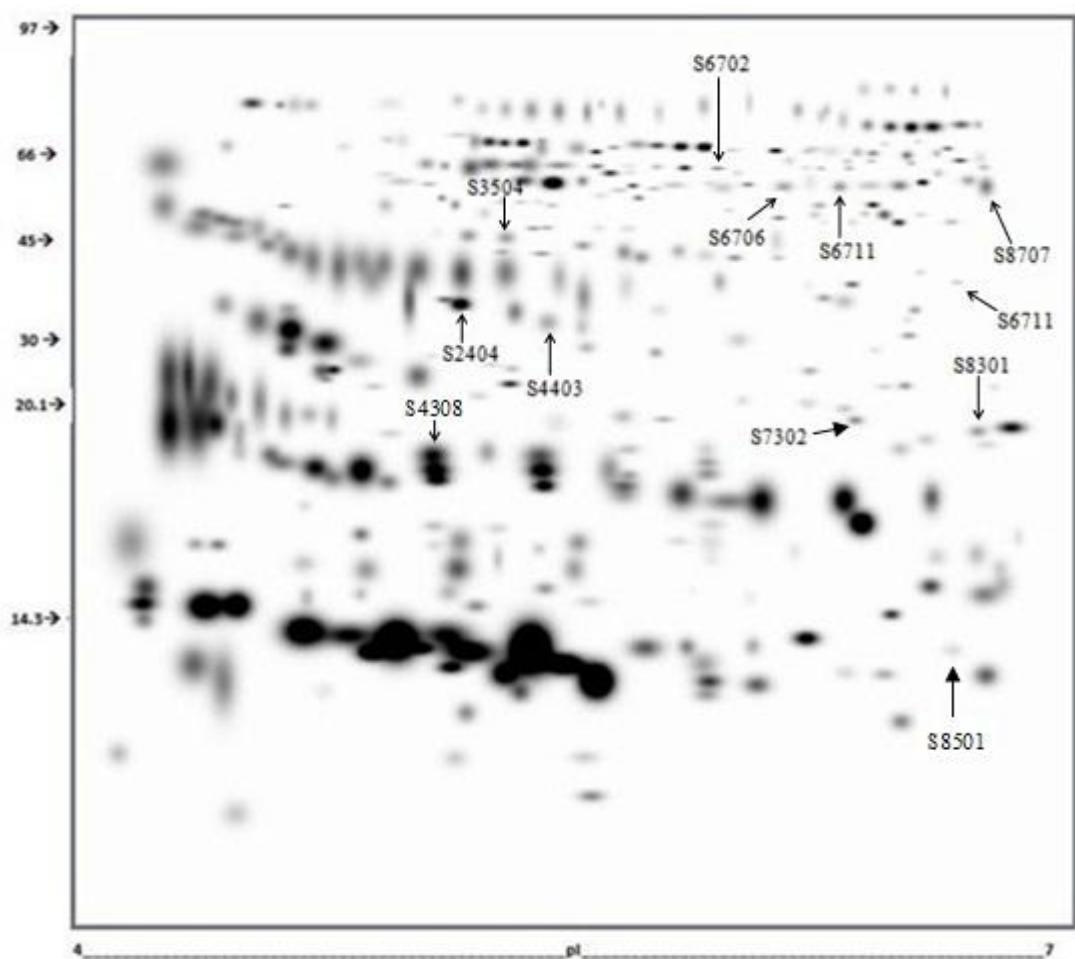
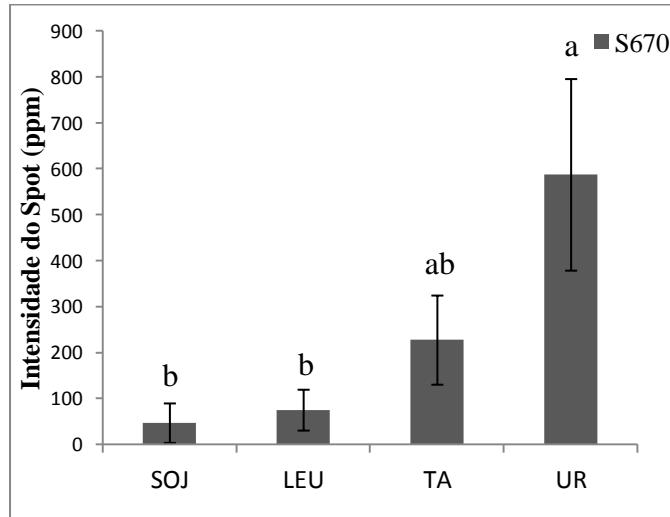
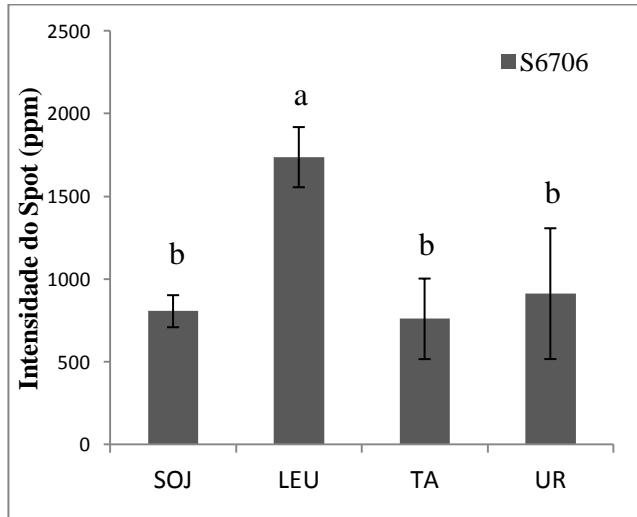
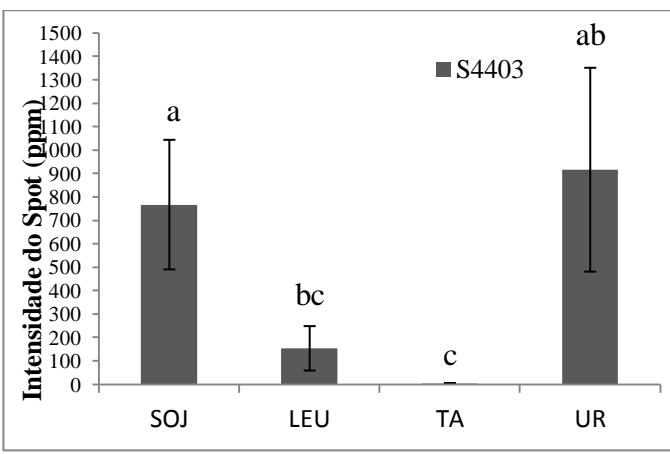
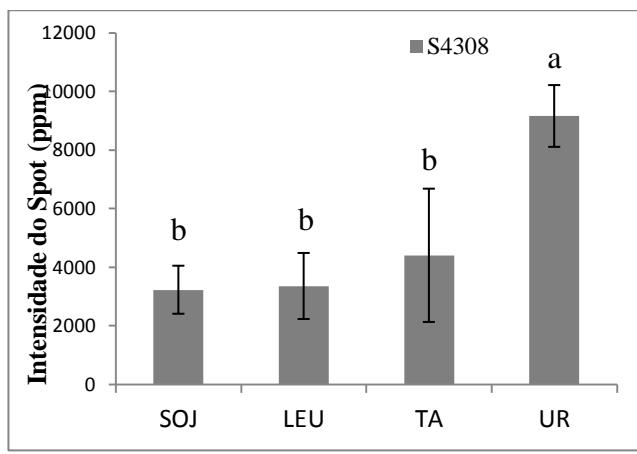
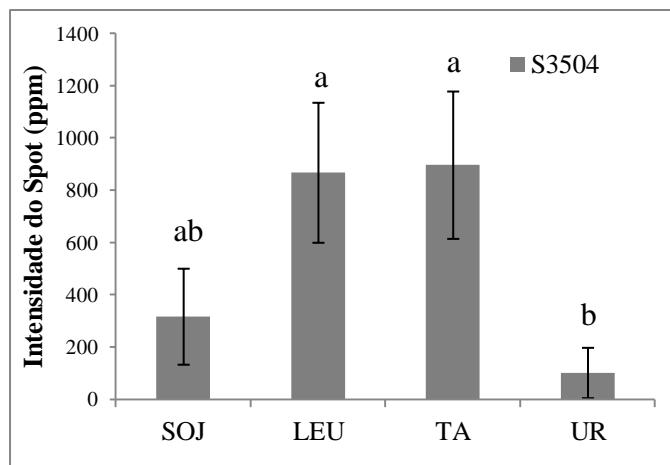
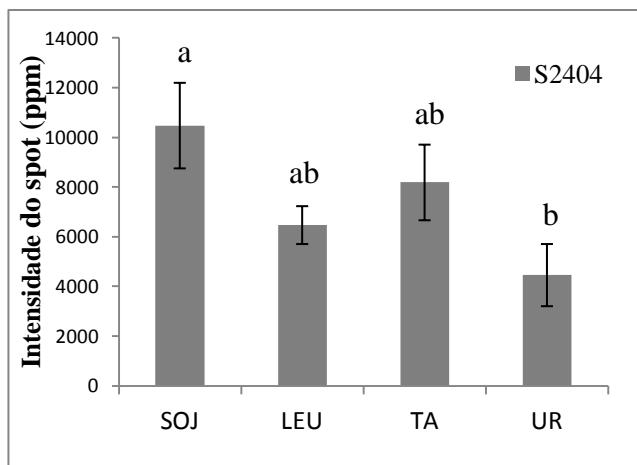


Figura 2. Mapa bidimensional de proteínas do plasma seminal de cordeiros Morada Nova. A figura representa o gel master gerado pelo PDQuest (Bio Rad, EUA) e é baseada na correspondência de todos os géis utilizados no estudo. Proteínas foram coradas com Comassie blue. Setas identificam os pontos cujas intensidades foram diferentes ($p < 0,05$) entre grupos de animais alimentados com dietas com farelo de soja, feno de folhas de leucena, torta de semente de algodão e uréia.



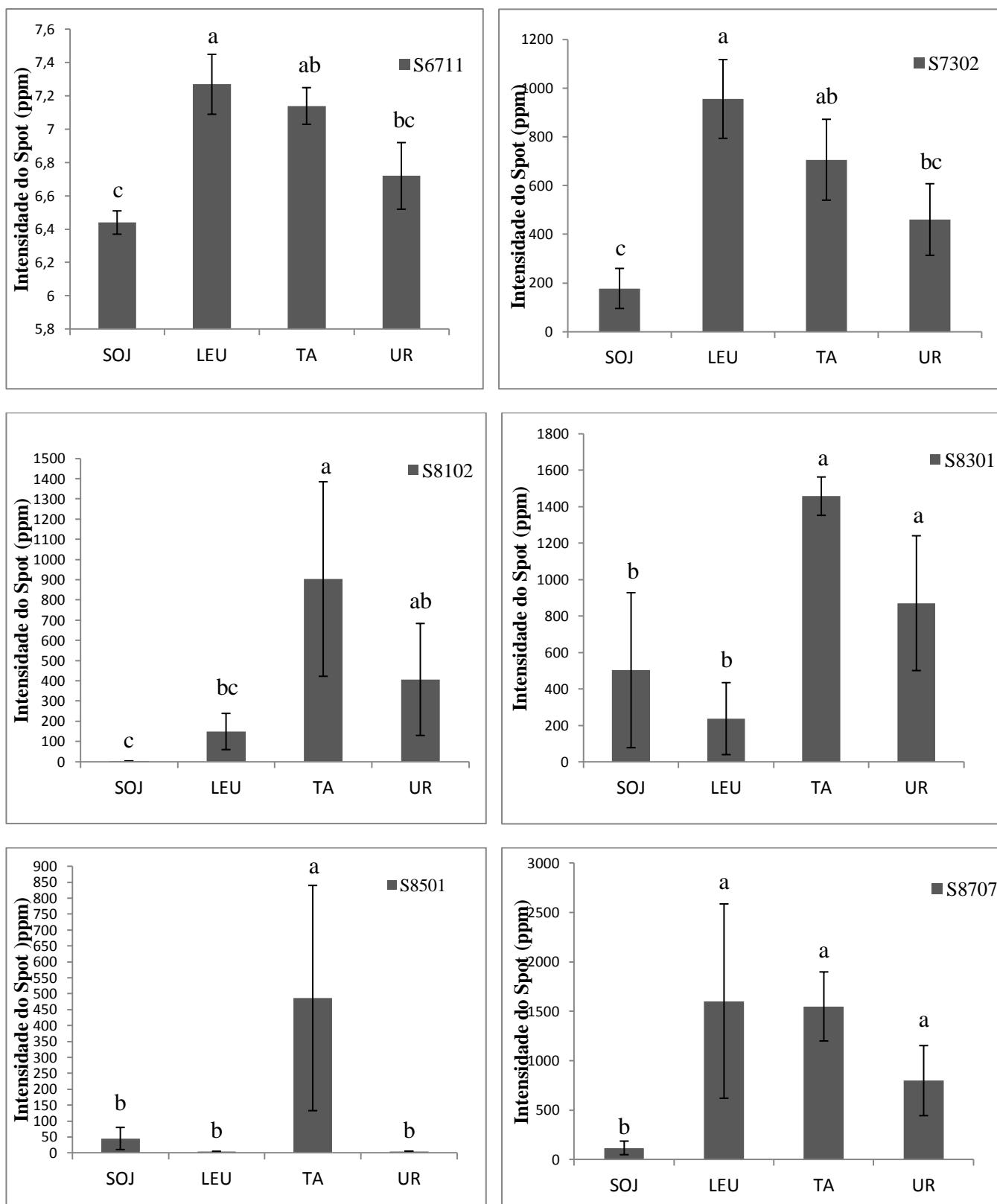


Figura 3. Intensidade dos spots expressos diferentemente ($p < 0,05$) em grupos de animais que receberam dietas com farelo de soja, feno de leucena, torta de algodão e uréia. Os números dos spots referem-se àqueles do mapa 2-D do plasma seminal, mostrado na Figura 2.

DISCUSSÃO

Considerando os resultados obtidos neste estudo, podemos confirmar que o desenvolvimento testicular não foi influenciado quando os animais foram alimentados com diferentes fontes de proteína (farelo de soja, feno de folhas de Leucena, uréia e torta de algodão) em condições de alimentação isoenergéticas e até mesmo com pequenas variações no teor de proteína de feno de folhas de leucena. Embora tenha sido observado em outros estudos que o testículo é influenciado pela ingestão de proteína não degradável no rúmen – PNDR (0,97, 1,72 e 3,08 g de PNDR / kg^{0,75}) e nível de proteína na dieta (12,5% e 16% PB) (Fernández et al. 2004, Fourie et al., 2004), nossos resultados demonstram que em condições normais de exigências nutricionais de proteínas, o desenvolvimento testicular em carneiros Morada Nova não foi afetado. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que a função reprodutiva não é prioridade para o desenvolvimento dos animais (Short e Adams, 1988; Van Soest, 1994). No entanto, mais estudos devem ser conduzidos a fim de verificar se as diferentes fontes de proteína poderiam afetar o desenvolvimento testicular.

O desenvolvimento das dimensões testiculares segue um crescimento gradual e linear até 35 semanas de idade. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Souza et al. (2010) em carneiros Santa Inês, no entanto, esses autores relataram que o desenvolvimento do tamanho dos testículos foi constante até 36 semanas. Assim, esses resultados indicam que, embora estes cordeiros deslanados tenham tamanhos diferentes, eles apresentam um padrão similar de desenvolvimento de tamanho testicular.

Animais alimentados com com torta de algodão tiveram maior peso corporal ao final do experimento, quando comparados àqueles alimentados com dietas contendo leucena e uréia. Este resultado é provavelmente devido às características físico-químicas dos ingredientes, o que resulta em uma relação satisfatória entre proteína dietética

degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). A substituição da dieta por PDR por PNDR não garante melhora no desempenho animal e pode causar uma deficiência da PDR, além de ser prejudicial para os microrganismos do rúmen, diminuindo a degradação da porção fibrosa da dieta. Assim, a avaliação do valor biológico da fonte de proteína é essencial para escolher o ingrediente (Santos et al., 1998). Além disso, a ração com torta de algodão é caracterizada por ser uma fonte adequada de PDR, enquanto o farelo de soja tem uma elevada concentração de proteínas solúveis, o que torna hidrolizável o ambiente ruminal (Felisberto, 2007), mostrando um aumento de 72,5% (Moreira et al. 2003) para 78,5% PDR (Branco, et al., 2006). Portanto, a dieta contendo torta de algodão associada com farelo de soja, forneceu uma fonte mais eficiente de nitrogênio para as bactérias do rúmen, permitindo maior síntese de proteína microbiana, bem como um maior fluxo de proteína verdadeira para o duodeno, suprindo a demanda de aminoácidos para estes animais em crescimento. Tem-se observado que os cordeiros em crescimento têm uma grande necessidade de aminoácidos não fornecido apenas pela quantidade de proteína microbiana produzida no rúmen desses animais (Soto-Navarro et al., 2006).

No presente estudo, embora a diferença significativa no peso corporal entre os animais alimentados com dietas contendo torta de algodão, folhas de feno de leucena e uréia a partir do 33 e 37 semanas de idade, estas alterações não foram suficientes para afetar o desenvolvimento testicular (Figura 1); apesar de vários estudos relatarem uma relação direta entre o desenvolvimento testicular e peso corporal (Salhab et al. 2001, Souza et al., 2010). Alguns estudos têm mostrado que ovinos são sensíveis a mudanças na disponibilidade de proteínas e fatores nutricionais (Oldham et al 1978; Thwaites, 1994), assim, presume-se que as mudanças no peso corporal adequado do ovino não afeta o tamanho testicular. Estas observações foram semelhantes aos relatados por

Elmaz et al. (2007) que verificaram que cordeiros com 195 dias de idade apresentaram alterações no tamanho testicular (largura e volume), sem alterações no peso corporal, quando alimentados com dois níveis de proteína (12% e 18%).

Neste estudo, apenas os parâmetros de motilidade progressiva e total de defeitos foram influenciados pelas fontes de proteína estudadas. A motilidade individual progressiva foi menor nos animais que receberam feno de folhas de Leucaena, o que equivale a um consumo médio de 79,44 g / MW, em comparação com aqueles dieta contendo farelo de soja (fonte de proteína convencional). A leucena contém mimosina, um aminoácido não-protéico (β -(N-(hidroxi-4-oxypyridyl))-ácido alfa aminopropionico), responsável pelos efeitos tóxicos, como o aborto e infertilidade (Hamilton et al., 1971), a inibição da replicação do DNA (Gilbert et al., 1994), deficiência na diferenciação das espermátides (Woldemeskel et al., 2001) e a inibição da mitose (Holmes et al., 1981). Portanto, o efeito prejudicial da mimosina ou seu produto de degradação no rúmen, o dihidroxi-piridina(3,4-DHP), que pode afetar a qualidade do movimento do espermatozóide observada no presente estudo. A 3,4-DHP é um metabólito da degradação da mimosina por bactérias do rúmen. A 3,4-DHP circulante interfere no metabolismo do iodo, impedindo que a tiroxina seja sintetizada, o que leva a redução dos níveis sérico desta e consequentemente levando ao bocio, podendo ser esse um dos fatores causadores dos distúrbios metabólicos que levam a esses efeitos negativos reprodutivos. No entanto, esses resultados diferem daqueles descritos anteriormente (Dana et al., 2000) que observaram uma melhora na qualidade do sêmen, quando rebanhos ovinos etíopes foram suplementados com folhas de feno de leucena. Foi sugerido também que há diferenças no metabolismo da mimosina de rebanhos (Megarity e Jones, 1983), dependendo do ambiente. Além disso, vale ressaltar que leucena tem um baixo teor de aminoácidos que contém enxofre na sua composição

(Garcia et al., 1996) e este composto poderia ser associada com redução nos valores do MPI.

Além disso, foi observado um aumento da expressão do spot S8707 (62,8 kDa, pI 6,9 - Identidade dos spots com base no mapa final de Souza et al, 2010 -. N-acetil- β -glucosaminidase) em animais alimentados com feno de folhas de leucena, quando comparados àqueles alimentados com farelo de soja, bem como correlação negativa com o MPI. Estas observações indicam que fatores presentes no feno de folhas de leucena promovem um aumento na expressão da proteína (S8707), o que provavelmente provoca alterações deletérias no mecanismo que controla a motilidade progressiva da célula espermática, já que neste grupo observou-se valores mais baixos para MPI.

A uréia é considerada uma eficiente fonte de nitrogênio não protéico, altamente degradável no rúmen, bem como utilizado pelos microrganismos ruminais para o seu desenvolvimento (síntese de proteína microbiana). No entanto, o excesso de uréia no rúmen resulta em maior produção de amônia e este aumento está associado com reduções na qualidade do sêmen, quando ovinos são suplementados com uréia (Al-Haboby et al., 1999). No entanto, quando ovinos consumiram diferentes níveis de proteína não degradável no rúmen, os autores não encontraram efeitos adversos sobre características do sêmen (Fernández et al., 2004). Em conjunto, estes resultados indicam que os níveis de uréia utilizados no presente estudo não comprometeu a qualidade do sêmen. Embora o percentual de defeitos totais fosse maior no grupo alimentado com dieta contendo uréia, quando comparado com o grupo alimentado com leucena, estes valores são aceitáveis para a reprodução de ovinos de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Efeitos negativos de fatores antinutricionais do feno de leucena não afetaram a morfologia espermática neste estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por

Dana et al. (2000) que demonstraram redução na quantidade de espermatozóides anormais no ejaculado de machos alimentados com dieta contendo feno com a suplementação de folhas de feno de leucena.

As características seminais dos animais alimentados com torta de algodão não foram afetados, indicando que os animais não eram suscetíveis ao efeito prejudicial do gossipol sobre a reprodução. Estas observações concordam com a afirmação de que entre as espécies de ruminantes, há diferenças na suscetibilidade a plantas tóxicas e ovinos são mais resistentes a alcalóides do que os bovinos (Nsahlai et al, 2000).

3. CONCLUSÕES

A alimentação animal representa um enorme percentual nos custos de produção animal, sendo que várias fontes alternativas são usadas dentro do processo produtivo zootécnico. A proteína representa uma fonte nobre de nutriente para todas as espécies animais e sua inclusão nas dietas afeta diretamente o desempenho econômico de qualquer atividade produtiva. O uso de fontes alternativas de alimentos, principalmente de proteínas é um fator que gera bastante polêmica, pois a característica buscada seria de uma fonte de ótima ou boa qualidade biológica, que consiga baixar o custo produtivo, mas mantenha a qualidade de produção dos animais quer seja no ganho de peso ou nos parâmetros reprodutivos. Em nosso trabalho concluímos que pequenas alterações nos parâmetros estudados aconteceram entre os animais e os tratamentos usados, quer seja quando se avaliou o desenvolvimento do peso dos animais ao longo do período experimental ou mesmo a qualidade espermática e o desenvolvimento testicular dos animais experimentais.

A expressão de proteínas no plasma seminal dos cordeiros não apresentou diferença significativa em termos quantitativos, mas algumas proteínas foram expressas diferentemente entre os tratamentos, o que pode indicar o efeito que determinada dieta pode causar sobre o metabolismo reprodutivo. Apenas uma proteína teve relação direta com um dos tratamentos testados, o que pode limitar o seu uso na alimentação animal. A identificação da identidade das outras proteínas aqui destacadas pode nos revelar processos que possam melhor descrever a relação existente entre fontes diversas de proteínas nutricionais e a fisiologia reprodutiva em machos ovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HABOBY, A.H.; SALMAN, A.D.; ABDUL KAREEM, T.A. Influence of protein supplementation on reproductive traits of Awassi sheep grazing cereal stubble. **Small Ruminant Research**, v. 34 p. 33–40, 1999.
- BARTON, B.A.; ROSARIO, H.A.; ANDERSON, G.W. et al. Effects of dietary crude protein, breed, parity, and health status on the fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.2225-2236, 1996.
- BLOM, E. The ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinarer Medicin**, v.53, p.83-391, 1973.
- BRANCO, A.F.; CONEGLIAN, S.M.; MAIA, F.J. Guimarães, K.C. Digestibilidade intestinal verdadeira da proteína de alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1788-1795, 2006.
- BROWN, B.W. A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. **Reproduction Nutrition Development**, v.34, p.89-114, 1994.
- BUTLER, W.R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.81, (9): 2533-2539, 1998.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p.1327–1333, 2004.
- CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2^a ed. Belo Horizonte/MG, v.118, p.6-49, 1998.

- CHEN, H., CHEUNG, M.P.L., CHOW, P.H., CHEUNG, A.L.M., LIU, W., O, W.S. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v. 124, p. 491–499, 2002.
- CORTEEL, J.M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. **Nouzilly – France: INRA**, 28p. 1981.
- DANA, N.; TEGEGNE, A., SHENKORU, T. Feed intake, sperm output and seminal characteristics of Ethiopian highland sheep supplemented with different levels of leucaena (*Leucaena leucocephala*) leaf hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, p. 239-249, 2000.
- ELMAZ, Ö.; CIRIT, Ü.; KESER, O.; GÜRBULAK, K.; KAZÝM, G.; KUTAY, C. Effect of two dietary protein levels on testosterone, testicular parameters and semen quality in ram lambs during pubertal development. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 63, p.1177-1180, 2007.
- ELZANATY, S., RICHTHOFF, J., MALM, J., GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2904–2911, 2002.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.A. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep of Goats**. Butterworths, Sydney, pp. 194–206, 1987.
- FELISBERTO, NIVEA R. O. (2007). Digestibilidade total e parcial e fluxo de nutrientes em cabras leiteiras alimentadas com diferentes fontes protéicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- FERGUSON, J.D.; CHALUPA, W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.747-766, 1989.

FERNÁNDEZ, M.; GIRÁLDEZ, F.J.; FRUTOS, P. LAVÍN, P.; MANTECÓN, A.R.

Effect of undegradable protein supply on testicular size, spermogram parameters and sexual behavior of mature Assaf rams. **Theriogenology**, v.62, p. 299–310, 2004.

FOURIE, P.J.; SCHWALBACH, L.M.; NESER, F.W.C.; VAN DER WESTHUIZEN, C. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 54 p. 53–59, 2004.

GARCIA, G.W.; FERGUSON, T.U.; NECKLES, F.A.; ARCHIBAL, K.A.E. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. **Animal Feed Science Technology**, v. 60, p. 29-41, 1996.

GILBERT, D.M., NELSON, A., MIGAZAWAN, H., DE PAMPHILIS, M.L., BURCHANSE, W.C. Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270 p. 507–606, 1994.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 69, n.3, p.809-15, 2003.

HAMILTON, R.T., DONALDSON, L.E., LAMBOURNE, L.J. *Leucaena leucocephala* as a feed for dairy cows: direct effect on reproduction and residual effect on the calf and lactation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 22, p. 681-692, 1971.

HAMMOND, A.C. Leucaena toxicosis and its control in ruminants. **Journal of Animal Science**. v. 73, p. 1487–1492, 1995.

- HOLMES, J.H.G., HUMPHREY, J.D., WALTON, E.A., O'SHEA, J.D. Cataracts, goitre and infertility in cattle grazed on an exclusive diet of *Leucaena leucocephala*. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 257–260, 1981.
- HÖTZEL, M.J.; MARKE, C.M.; WALKDEN-BROWN, S.W.; BLACKBERRY, M. A.; MARTIN, G. B. Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 217-230, 1998.
- JONES, R. J.; MEGARITY, R. G. (1983). Comparative responses of goats fed on *Leucaena leucephala* in Australia and Hawaii. **Australian Journal of Agriculture Research** 34, 781-790.
- JONES, R.J.; MEGARRITY, R.G. Comparative toxicity responses of goats fed on *Leucaena leucocephala* in Australia and Hawaii. **Australian Journal of Agricultural Research** v. 34, p. 781-790, 1983.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1216-1231, 1998.
- MANJUNATH, P., THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109–119, 2002.
- MARTIN, G.B.; BLACHE, D.; MILLER, D.W.; VERCOE, P.E. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. **Animal**, v.4, p.1214-1226, 2010.
- MARTIN, G.B.; TJONDRENGORO, S.; BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin

- in plasma of mature male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.121-128, 1994.
- MEDEIROS, A.A.; ARAUJO, A.A.; MOURA, A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEIREDO, E.L.; RODRIGUES, L.F.S. Utilização do Azul de Bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como método coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 46, p. 287-297, 2006.
- MOREIRA, J.F.C.; RODRIGUEZ, N.M.; FERNANDES, P.C.C. Concentrados protéicos para bovinos. Digestibilidade in situ da matéria seca e da proteína bruta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p. 324 – 333, 2003.
- MOURA, A. A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 214-222, 2007.
- MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 201–211, 2006.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, P.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, suppl. 4, p.18-31, 2008.
- NSAHLAI, I.V.; BYEBWA, B.K.; BONSI, M.L.K. Reproductive indices of Merino rams fed sun-cured *Leucaena leucocephala* forage. **South African Journal of Animal Science**, v. 30 (Suplement), p. 111-112, 2000.

- OLDHAM, C.M.; ADAMS, N.R.; GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D. R.; MACKINTOSH, J.B. The Influence of Level of Feed Intake on Sperm-producing Capacity of Testicular Tissue in the Ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, p. 173-179, 1978.
- PORAT, O. Effects of gossypol on the motility of mammalian sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 400-408, 1990.
- RIFFO, M., PÁRRAGA, M. Role of phospholipaseA2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. **Journal of Experimental Zoology**, v.79, p.81-88, 1997.
- ROBINSSON, J.J., C.J. ASHWORTH, J.A. ROOKE, L.M. MITCHELL, T. G. MCEVOY. Nutrition and fertility in ruminat livestock. **Animal Feed and Technology**. 126 (2006) 259-276.
- ROCHA, S.L.G.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; TRUGILHO, M.R.O.; CHAPEAUROUGE, A.; LEÓN, I. R.; VALENTE, R.H.; DOMONT, G.B. PERALES, J. 2009. Crotalid Snake Venom Subproteomes Unraveled by the Antiphidic Protein DM43. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 2351–2360 2351.
- SALHAB, SA.; ZARKAWI, M.; WARDEH, MF.; AL-MASRI MR.; KASSEM R. Development of testicular dimensions and size, and their relationship to age, body weight and parental size in growing Awassi ram lambs. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 187–191, 2001.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2^a ed. Belo Horizonte/MG, Minas Gerais: FEP MVZ Editora, 2002.

- SANTOS, F.A.P., SANTOS, J.E.P., THEURER, C.B., Huber, J.T. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature Review. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p.3182-3213, 1998.
- SANTOS, J.E.; AMSTALDEN, M. Effects of Nutrition on Bovine Reproduction. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.26, n.1, 1998 (Supl.).
- SAS (2002).
- SHORT, R. E.; ADAMS, D. C. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 68, p. 29-39, 1988.
- SOTO-NAVARRO S.A.; GOETSCH A.L., SAHLU T.; PUCHALA R.; DAWSON L.J. Effects of ruminally degraded nitrogen source and level in a high concentrate diet on site of digestion in yearling Boer x Spanish wether goats. **Small Ruminant Research**, v.50, p.117-128, 2006.
- SOUZA, C.E.A.; ARAÚJO, A.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; LIMA SOUZA, A.C.; NEIVA J.N.M.; MOURA, A.A. Reproductive development of santa inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644-653, 2010.
- TAITZOGLOU, I.A.; TSANTARLIOTOU, M.; ZERVOS, I.; KOURETAS, D.; KOKOLIS, N.A. Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid in vitro. **Reproduction**, v. 121, p. 131-137, 2001.
- THWAITES, C.J. The effects of feeding supplements containing different amounts and sources of nitrogen on live weight and the testes of rams during and after mating. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 177-184, 1994.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 1994, 476p.

- WOLDEMESKEL, M.; TEGEGNE, A.; UMUNNA, N.N.; KAITHO, R.J.; TAMMINGA, S. Effects of *Leucaena pallida* and *Sesbania sesban* supplementation on testicular histology of tropical sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 253–265, 2001.
- YUAN, Y.Y., CHEN, W.C., SHI, Q.X., MAO, L.M., YU, Q., FANG, X., ROLDAN, E.R.S. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.68, p.904–913, 2003.

ANEXOS

a. Submissão do Artigo I Referente ao capítulo 1

Periódico: Small Ruminant Research

Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams

M.A.M. Rodrigues^{a¶}, C.E.A. Souza^{a¶}, J.A.M. Martins^a, J.P.A. Rego^a, J.T.A. Oliveira^b, G. Domont^c, F.C.S. Nogueira^c, A.A. Moura^{a*}

^a*Department of Animal Science, ^bDepartment of Biochemistry, Federal University of Ceará, 60021-970, Fortaleza, Brazil*

^c*Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-909, Rio de Janeiro, Brazil*

* *corresponding author: Department of Animal Science, Federal University of Ceará, Av. Mister Hull S/N, Campus Pici, Fortaleza – CE – Brazil – 60021-970; amoura@ufc.br (55-85-3366-9701)*

¶ The two first authors equally contributed to this work.

MAM Rodrigues: marcoromabr@yahoo.com.br; CEA Souza: ceasouza@gmail.com;

JAM Martins: jammvet@gmail.com; JPA Rego: joaopaulo.rego@gmail.com; JTA

Oliveira: jtaolive@ufc.br; G Domont: gilberto@iq.ufrj.br; FCS Nogueira: fabiocsn@gmail.com; AA Moura: amoura@ufc.br

Abstract

Recently, comprehensive studies were conducted regarding the reproductive development, age at puberty, spermatogenesis and the protein profile in seminal plasma of Santa Ines rams. Despite the abundant information obtained by these studies regarding the tropically-adapted rams of Brazil, it is still unclear how sperm parameters relate to the expression of molecular components in the reproductive tract. In this regard, the present study was conducted to determine if sperm parameters were empirically related with the seminal plasma proteins described in two-dimensional electrophoresis maps. Seminal plasma proteins were separated by two-dimensional electrophoresis and the respective maps electronically analyzed. Proteins spots associated with higher or lower motility were then identified by tandem mass spectrometry. Based on the sperm motility, the ejaculates were divided in two groups: those containing up to 80% of motile cells (G1), and those with more than 80% motile sperm (G2). Mean ejaculated parameters between the two groups differed only regarding the percentage of motile cells and wave motion. On average, 236 spots per gel were detected. Eleven spots produced significantly higher intensity in gels from G2 - associated with ejaculates characterized by higher semen motility scores. The intensity of three spots was higher in gels from G1. All spots differentially expressed for G1 and G2 were present in at least 90% of the gels. From the thirteen differentially expressed between G1 and G2, four were identified by tandem mass spectrometry. Two, associated with G1, were identified as Ram Seminal Vesicles Protein 22 kDa (RSVP-

22) and Bodhesin-2. On the other hand, spots more intense in ejaculates displaying higher sperm motility scores (G2) were identified as Arylsulfatase A and Zinc-alpha-2-glycoprotein. Knowledge of their identities represents a crucial step towards the comprehension of how these proteins are related to sperm motility.

Keywords: ram, seminal plasma, sperm motility, proteomics

1. Introduction

The Northeast of Brazil houses 40% of the Brazilian sheep herd, estimated at almost 20 million animals. Despite of the numbers in the Brazilian herds, fertility indexes of the hairy sheep still need to significantly increase, so that the production systems meet the appropriate profitability and competitiveness of the world market. The fertility problems in sheep flocks are due, in large part, to aspects relating to the physiology and reproductive management of the females. However, the males tend to influence this situation given that, based on studies carried out with cattle, there is still a high percentage of temporarily infertile and subfertile sires on farms used in natural mating (Peddinti et al., 2008). Therefore this fact must have significant effect on the number of offspring born per year in a flock, given the large number of females submitted to natural mating systems (Lima, 1996).

Factors related to the male contribute a large proportion of infertility in several species, and the nature of male sub-fertility is as complex as that of the female (Saacke et al., 2000). Several studies have pointed to the actions of diverse proteins found in the semen, related to the acquisition of fertilizing capacity of the spermatozoa in mammals (Carballada and Esponda, 1998). Such proteins affect a wide range of sperm-related phenomena, including sperm capacitation and acrosome reaction (Thérien et al., 1995; Thérien and Manjunath, 2003), formation of the oviduct reservoir (Gwathmey et al.,

2006), fertilization and embryo development (Gonçalves et al., 2008a; Gonçalves et al., 2008b). There are also reports that seminal plasma proteins affect sperm motility (Yoshida et al., 2008). These proteins could either display negative (Iwamoto et al., 1995; Schoneck et al., 1996; La Falci et al., 2002) or positive effects on motility (Somlev et al., 1996; Qu et al., 2007).

Recently, comprehensive studies were conducted regarding the reproductive development, age at puberty (Souza et al., 2010a) and protein profiles of the seminal plasma of Santa Ines rams (Souza et al., 2010b). Despite the information obtained by those studies regarding the tropically-adapted rams of Brazil, it is still unclear how sperm parameters relate to the expression of the molecular components of the reproductive tract. In this regard, the present study was conducted to determine if sperm motility was empirically related to seminal plasma proteins described in two-dimensional electrophoresis maps.

2. Material and Methods

All rams were managed in accordance to guidelines for research involving animals (Moura et al., 2010). Semen samples were collected by artificial vagina from 21 adult Santa Ines rams (2 year-old) of normal reproductive status. Rams were maintained in individual pens, and fed with hay (*Cynodon* sp.), commercial concentrate containing 18% of crude protein, and free access to water and mineral supplement. Immediately after semen collection, the seminal plasma was separated from sperm by centrifugation and then subjected to 2-D electrophoresis. All gels were stained with colloidal

Coomassie blue and the resulting images scanned and analyzed with PDQuest (Bio-Rad, Rockville, MD, USA).

2.1. Semen collection and two-dimensional electrophoresis of seminal plasma proteins

Two semen samples were obtained from each animal and analyzed, as previously reported (Souza et al., 2010a). Briefly, semen was harvested using an artificial vagina, immediately placed in a water bath (37°C) and aliquots taken for assessment of the percent motile sperm. The sperm concentration was determined with the aid of a haemocytometer and the total number of ejaculated sperm was estimated by multiplying sperm concentration with the ejaculated volume. The percentage of abnormal sperm was determined by counting 200 cells/ejaculate in semen smears stained with eosin and nigrosin (Colas, 1980). All semen parameters were evaluated by a single trained technician during the entire course of the study.

The remaining semen was immediately centrifuged at 700 x g for 10 minutes at 4°C to separate the seminal plasma from the sperm. Seminal plasma was then transferred to a clean tube and centrifuged at 10,000 x g for 60 minutes, at 4°C, as previously described (Moura et al., 2006a; Souza et al., 2010a). Following the last centrifugation, the seminal plasma was aliquoted and stored at -80°C. Seminal plasma (100 µL) from each sample was used to determine the total protein concentration (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as the standards. All assays were ran in triplicates. Electrophoresis of seminal plasma proteins was carried out on immobilized pH gradient (IPG) strips, as previously described (Souza et al., 2010a). In summary, samples of seminal plasma containing 400 µg total protein were mixed with a buffer (7M urea, 2M thiourea, 65 mM DTT (dithiothreitol), 0.5% free ampholytes (IPG buffer, 4-7), 0.5% CHAPS (3-[(3-

cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) and traces of bromophenol blue) sufficient for 250 μ L. Then, the samples were incubated with 13 cm IPG strips (pH 4 to 7, linear; GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA), and allowed to rehydrate for 20h. Isoelectric focusing was done in ETTANTM IPGphor 3TM (GE Lifesciences, USA) at 20°C, according to the following program: 200V (200Vh), 500V (1000 Vh), 5000V (10,000 Vh), 10,000V (22,000 Vh), with a total of 33,200 Vh. After focusing, the strips containing seminal plasma proteins were incubated in equilibration buffer I (6M urea, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, 1% DTT) and re-equilibrated for an additional 15 minutes in buffer II (similar to equilibration buffer I, but containing 2.5% iodoacetamide, instead of DTT). Following equilibration, strips were fixed with agarose (5% in SDS-PAGE running buffer) on homogeneous SDS-polyacrylamide gels (15%) and run at 250V, with 30 mA per gel (Hoefer SE 600; GE Lifesciences, USA). The Gels were then stained in colloidal Coomassie blue (Candiano et al., 2004), with modifications. Briefly, the gels were washed three times (20 minutes) in a solution containing phosphoric acid (2%) and ethanol (30%). Another three washes in 2% phosphoric acid followed, and then the gels were placed in a solution with phosphoric acid (2%), ethanol (18%), ammonium sulfate (15%), added with 2 mL of a Coomassie Blue G-250 solution (2%) for 72h. The reagents used for electrophoresis were purchased from Acros Organics (Belgium), GE Lifesciences (USA) and/or Sigma-Aldrich (USA).

Two-dimensional gels were scanned at 300 dpi (ImageScanner II; GE Lifesciences, USA), saved as tagged image file format (.tiff) files and analyzed using PDQuest software, 7.3.0 version (Bio-Rad, USA). According to a strategy previously reported (Moura et al., 2006a, 2007; Souza et al., 2010a), all 2-D maps were evaluated in a single match set and a master gel generated, based on a representative gel. In

addition, spots consistently present in the remaining gels were added to the master, so that they could be matched to all the samples. Proteins in key regions of the master gel were used as landmarks and the matching of spots was achieved after several rounds of extensive comparison. Also, final spot matches were organized by checking each spot in each gel with the respective pattern in the master. Protein quantities were reported as parts per million of the total integrated optical density of spots in the gels, according to PDQuest.

Seminal plasma proteins of interest were separated by 2-D electrophoresis and marked as spots in the gels, destained and subjected to in-gel trypsin digestion (Rocha et al., 2009). Each spot was excised individually, cut into 1-mm³ pieces and transferred to clean tubes. Dye and SDS were moved from the spots after three washes in 400µL of a solution containing acetonitrile (50%) and ammonium bicarbonate (50%; 25mM at pH 8.0). The gel pieces were then dehydrated with 200µL absolute acetonitrile for 5 min and dried at room temperature. The resulting material was then incubated for 20h (37°C) with trypsin (166ng/spot; Promega cat. # V5111, Madison, WI, USA). Peptides were extracted from the gel pieces by washing with 5% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile, in ammonium bicarbonate (50mM) for 30 min, in three washes. Supernatants were transferred to microtubes and vacuum concentrated (Savant, Holbrook, NY, USA) to a final volume of 10µL. A piece of blank gel, without spots, and a piece of albumin from the molecular mass markers were submitted to same procedure and used as negative and positive controls, respectively.

2.2 Protein identification by MALDI-ToF/ToF mass spectrometry

MALDI-ToF/ToF-MS acquisition was performed using an ABI 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, USA) with 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid as

matrix. The MS spectra were acquired in positive ion reflector mode with 1600 laser shots per spot, processed with default calibration and the 6 most intense ions submitted to fragmentation. The PSD spectra were induced with 2400 laser shots and 1 KeV collision energy with CID (collision-induced dissociation) turned off (1×10^{-8} Torr). The resulting tandem mass spectra were searched against the non-redundant protein sequence database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the Mascot MS/MS ion search tool (version 2.1; www.matrixscience.com). The search parameters used included no restrictions on the protein molecular mass, one tryptic missed cleavage, and non-fixed modifications of methionine (oxidation) and cysteine (carbamidomethylation). Peptide mass tolerance in the searches was 1.0 Da for MS spectra and 0.6 Da for MS/MS spectra. The Peptides were considered to be identified when the scoring value exceeded the identity or extensive homology threshold value calculated by Mascot, based on the MOWSE score. In cases of protein identification based on a single peptide, the minimum threshold of the probability based Mascot score was 40. The rate of false positives was determined by running searches using the same parameters against a decoy database.

Statistical Analysis

The experiment followed a completely randomized design, where each animal was considered as a random factor. Semen parameters and spot intensities in the protein maps were tested for normality, using Shapiro-Wilk's test, and for asymmetry and kurtosis, using the UNIVARIATE procedure with NORMAL and PLOT options of Statistical Analysis System. Variables without a normal distribution (Shapiro-Wilk's $P < 0.05$) were log ($\log(x+1)$) or angularly ($\arcsin \sqrt{\frac{x}{100}}$). Normally distributed variables, irrespective of transformation, were compared between groups using the

Student's t test after analysis of variance using the GLM procedure ($P<0.05$). Non-parametric data were analyzed by the Mann-Whitney test (Sas, 2003).

Logistic models were built using selected spot intensities to estimate the probability of a given ejaculate to display high sperm motility using the LOGISTIC

procedure (Sas, 2003), with the following equation: $y = \frac{e^{(a+bx)}}{1+e^{(a+bx)}}$, where:

y = probability of the ejaculate display high sperm motility;

e = base of the natural logarithm;

a = intercept of the model;

b = slope of the model;

x = spot intensity.

Results

Rams used in this experiment ejaculated, on average, 1.7 ± 0.4 mL of semen, with a mean score of 4.1 ± 0.7 for wave motion (out of 5), $81.7 \pm 8.9\%$ motile sperm, and containing $3.3 \pm 0.4 \times 10^9$ sperm cells per mL of semen, with $3.8 \pm 5.7\%$ of abnormal cells. Based on sperm motility, the ejaculates were divided in two groups: those containing up to 80% motile cells (G1), and those with more than 80% motile sperm (G2). The average ejaculated parameters between the two groups differed only for the percentage of sperm motile cells (%M) and wave motion (WM) ($P<0.01$), as shown in Table 1.

On average, 236 ± 7 spots per gel of seminal plasma (Figure 1) were recorded. From these, 63 spots were consistently present on all the gels. The combined intensity of those spots accounted for 41.5% of the intensity of all valid spots in the match set. Spot numbers 3304 (pI 5.2; 31.1 kDa), 3601 (pI 5.2; 58.8 kDa), 4607 (pI 5.3; 57.7 kDa),

4701 (pI 5.3; 68.0 kDa), 5501 (pI 5.5; 50.9 kDa), 8001 (pI 6.5; 13.8 kDa), 9002 (pI 6.8; 14.9 kDa), 4401 (pI 5.3; 49.3 kDa), 4604 (pI 5.4; 58.9 kDa) and 5303 (pI 5.5; 64.1 kDa), had a significantly higher intensity in gels from G2 - associated with ejaculates characterized by higher motility scores, while the intensities of spots 5403 (pI 5.7; 45.3 kDa), 301 (pI 4.2; 33.0 kDa) and 5001 (pI 5.5; 14.4 kDa) were higher in gels from G1 (Figure 2). All spots differentially expressed between G1 and G2 were present in at least 90% of the gels. The four spots displaying the highest difference between groups (3601, 3304, 5501 and 8001) were selected and a logistic model was built to calculate the probability that the ejaculates display higher motility scores, based on values of the spot intensities (Figure 3).

From the 13 differentially expressed between G1 and G2, 4 were identified by tandem mass spectrometry (Table 2). Spots 301 and 5001 (more abundant in G1), were identified as RSVP-22 and Bodhesin-2, respectively. On the other hand, spots 4701 and 5501, more intense in ejaculates displaying higher sperm motility scores (G2), were identified as arylsulfatase A (4701) and zinc alpha 2 glycoprotein (5501).

Discussion

The present study reports on relationships between the spot intensity of Santa Ines rams seminal plasma maps and sperm motility parameters. These rams are typical of the tropical regions from the Brazilian northeast, but in the last years have been disseminated throughout the country. Seminal plasma proteins come mostly from the mix of cauda epididymal fluid (Moura et al., 2010) and accessory sex gland fluid proteins (Moura et al., 2007), but may also be shed from the sperm membrane (Thimon et al., 2005). Seminal plasma proteins have been associated with several aspects of

sperm function, such as sperm capacitation (Manjunath and Thérien, 2002), formation of the oviduct reservoir (Gwathmey et al., 2006) and gamete interaction (Clark, 2011). Also, protein fractions separated from seminal plasma have been associated with the ability for the sperm membrane to recover after cryoinjury (Barrios et al., 2000; Pérez-Pé et al., 2001).

In the current work, there were spots more abundant in ejaculates with a higher sperm motility (such as 3304, 3601, 5501 and 8001), while others, such as 301 and 5001 were more intense in gels from semen displaying lower motility scores. Spot 5001 was identified as bodhesin 2, a member of the spermadhesin superfamily (Teixeira et al., 2006). Spermadhesins are generally low molecular weight proteins, abundant in the seminal plasma of ungulates (Tedeschi et al., 2000; Teixeira et al., 2006; Rodriguez-Martinez et al., 2011), that originate in the accessory sex glands (Moura et al., 2007; Souza et al., 2011) and epididymis (Moura et al., 2010). These proteins are mainly involved in the formation of the oviduct reservoir (Talevi and Gualtieri, 2010) and gamete interaction (Topfer-Petersen et al., 2008), although there are reports that some of these proteins work as decapacitating factors in the boar (Vadnais and Roberts, 2010). In the bull, the intensity of isoforms of spermadhesin Z13 in the accessory sex gland fluid has been negatively associated with dairy bull fertility (Moura et al., 2006b). Although the precise mechanism is still unknown, it is possible that this relationship results from the decapacitating properties of spermadhesins. On the other hand, as found in this work, spermadhesins may be associated with lower sperm motility (Iwamoto et al., 1995; Caballero et al., 2008).

Another spot more abundant in the group of lower sperm motility was spot 301. This spot has been identified as Ram Seminal Vesicles 22 kDa (RSVP22), which belongs to the Binder of Sperm Protein family (BSP's) (Manjunath et al., 2009). They

bind to sperm during ejaculation, and remain bound until sperm reach the oviduct, where they modulate the formation of the sperm reservoir as well (Gwathmey et al., 2006). In the ram, as is the case for its bovine counterpart (BSP5) (Manjunath et al., 1994), are produced by the seminal vesicles (Souza et al., 2011), and are not present in the epididymal sperm or cauda epididymal fluid. In many species, such as the bovine (Thérien et al., 1995), goats (Villemure et al., 2003) and bison (Boisvert et al., 2004), these proteins regulate sperm capacitation by selectively removing cholesterol and phospholipids from the sperm membrane. However, if they remain in contact with sperm for longer times, there is a continuous removal of phospholipids and cholesterol that can harm the membrane structure and cause deleterious effects to sperm motility.

Arylsulfatase A (AS-A) has been reported to be a component of the cauda epididymal fluid in bulls (Moura et al., 2010), and it is acquired by sperm during epididymal transit, where it attaches to the surface of the sperm head (Weerachatyanukul et al., 2003). It has been shown that AS-A is able to disperse the cumulus-oocyte complex (Wu et al., 2007), helping sperm to reach the oocyte, where it mediates sperm-zona pellucida binding (Tantibhedhyangkul et al., 2002). In this work, one of the spots associated with highly motile sperm (spot 4701) was identified as AS-A. It has a molecular weight similar to those found in the mouse and pig seminal plasma (Tantibhedhyangkul et al., 2002). So far, this is the first report associating the presence of AS-A in the seminal plasma with sperm motility, but the mechanism by which AS-A would affect motility is still unknown.

Another spot associated with samples displaying higher sperm motility, spot 5501, was identified as zinc-alpha-2 glycoprotein (ZAG-2). This protein is usually associated with the modulation of lipolysis from adipocytes (Bing et al., 2004), via the cyclic AMP and protein kinase A signaling pathway. Recent work reported ZAG-2 to

be present in human seminal plasma, and being able to regulate the initiation of forward motility in epididymal spermatozoa (Ding et al., 2007). The protein binds to the sperm membrane in the pre-equatorial region and midpiece, and the mechanism involved in the regulation of sperm motility by ZAG-2 involves the same cAMP/PKA pathway (Qu et al., 2007). Since the prostate seems to be the source of seminal ZAG-2 (Ahlgren et al., 1995), it is likely that this protein binds sperm after ejaculation and up-regulates signaling pathways leading to an increase in sperm motility. Also, minor increases in the spot intensity corresponding to ZAG-2 significantly increase the probability of the ejaculate to display high sperm motility, based on the logistic model. Thus, these findings suggest that in the ram, as in humans, ZAG-2 plays an important role in the regulation of sperm motility. Other spots associated with sperm motility are still in process of identification.

In conclusion, associations between the intensity of selected spots in the seminal plasma of Santa Ines rams and the motility of ejaculated sperm are reported. Knowledge of their identities is a crucial step towards the understanding of how these proteins are related to sperm motility. Currently, research on the isolation and purification of these proteins from the ram seminal plasma is being done, in order to gain insights into the mechanisms underlying their association with sperm function.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by the Brazilian Research Councils (CNPq, CAPES and FUNCAP).

References

- AHLGREN, G., RANNEVIK, G., LILJA, H., 1995. Impaired secretory function of the prostate in men with oligo-asthenozoospermia. *J. Androl.* 16, 491-498.
- BARRIOS, B., PÉREZ-PÉ, R., GALLEGOS, M., TATO, A., OSADA, J., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63, 1531-1537.
- BING, C., BAO, Y., JENKINS, J., SANDERS, P., MANIERI, M., CINTI, S., TISDALE, M.J., TRAYHURN, P., 2004. Zinc- α 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2500-2505.
- BOISVERT, M., BERGERON, A., LAZURE, C., MANJUNATH, P., 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol. Reprod.* 70, 656-661.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., GARCÍA, E.M., PARRILLA, I., ROCA, J., CALVETE, J.J., SANZ, L., MARTÍNEZ, E.A., 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* 70, 1352-1355.
- CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERI, G.M., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA, P., ZARDI, L., RIGHETTI, P.G., 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- CARBALLADA, R., ESPONDA, P., 1998. Binding of seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa in vivo and in vitro. *Int. J. Androl.* 21, 19-28.

- CLARK, G.F., 2011. Molecular models for mouse sperm-oocyte binding. *Glycobiol.* 21, 3-5.
- COLAS, G., 1980. Seasonal variations of the quality of sperm in the Ile-de-France ram. I. study of the cellular morphology and massal motility. *Reprod., Nutr., Dev.* 20, 1789-1799.
- DING, Z., QU, F., GUO, W., YING, X., WU, M., ZHANG, Y., 2007. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1124-1131.
- GONÇALVES, R.F., BARNABE, V.H., KILLIAN, G.J., 2008a. Pre-treatment of cattle sperm and/or oocyte with antibody to lipocalin type prostaglandin D synthase inhibits *in vitro* fertilization and increases sperm-oocyte binding. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 188-193.
- GONÇALVES, R.F., CHAPMAN, D.A., BERTOLLA, R.P., EDER, I., KILLIAN, G.J., 2008b. Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects *in vitro* fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 375-383.
- GWATHMEY, T.M., IGNOTZ, G.G., MUELLER, J.L., MANJUNATH, P., SUAREZ, S.S., 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol. Reprod.* 75, 501-507.
- IWAMOTO, T., HIROAKI, H., FURUICHI, Y., WADA, K., SATOH, M., SATOH, M., OSADA, T., GAGNON, C., 1995. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett.* 368, 420-424.
- LA FALCI, V.S.N., TORTORELLA, H., RODRIGUES, J.L., BRANDELLI, A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57, 1035-1048.

- LIMA, M.J., 1996. Investir na inseminação artificial é investir na eficiência. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 20, 77.
- MANJUNATH, P., CHANDONNET, L., LEBLOND, E., DESNOYERS, L., 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.* 49, 27-37.
- MANJUNATH, P., LEFEBVRE, J., JOIS, P.S., FAN, J., WRIGHT, M.W., 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol. Reprod.* 80, 394-397.
- MANJUNATH, P., THÉRIEN, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53, 109-119.
- MOURA, A.A., CHAPMAN, D.A., KOC, H., KILLIAN, G.J., 2006a. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J. Androl.* 27, 534-541.
- MOURA, A.A., CHAPMAN, D.A., KOC, H., KILLIAN, G.J., 2007. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 98, 169-188.
- MOURA, A.A., KOC, H., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J., 2006b. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl.* 27, 201-211.
- MOURA, A.A., SOUZA, C.E.A., STANLEY, B.A., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J., 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J. Proteomics.*
- PEDDINTI, D., NANDURI, B., KAYA, A., FEUGANG, J.M., BURGESS, S.C., MEMILI, E., 2008. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.* 2, 19-31.

- PÉREZ-PÉ, R., BARRIOS, B., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., 2001. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 760, 113-121.
- QU, F., YING, X., GUO, W., GUO, Q., CHEN, G., LIU, Y., DING, Z., 2007. The role of Zn-alpha2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. *Reproduction* 134, 569-576.
- ROCHA, S.L.G., NEVES-FERREIRA, A.G.C., TRUGILHO, M.R.O., CHAPEAUROUGE, A., LEÓN, I.R., VALENTE, R.H., DOMONT, G.B., PERALES, J., 2009. Crotalid snake venom subproteomes unraveled by the antiophidic protein DM43. *J. Proteome Res.* 8, 2351-2360.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., KVIST, U., ERNERUDH, J., SANZ, L., CALVETE, J.J., 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 11-22.
- SAACKE, R.G., DALTON, J.C., NADIR, S., NEBEL, R.L., BAME, J.H., 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 663-677.
- SAS, I.I., 2003. *SAS/STAT® 6.2 User's guide*, SAS Publishing, Cary.
- SCHONECK, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R., 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology* 45, 633-642.
- SOMLEV, B., HELILI, K., KARCHEVA, V., 1996. Tissue kallikrein activity in seminal plasma of bovine ejaculates with different quality. *Theriogenology* 45, 471-475.
- SOUZA, C.E.A., ARAÚJO, A.A., OLIVEIRA, J.T.A., LIMA-SOUZA, A.C.B., NEIVA, J.N.M., MOURA, A.A., 2010a. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm

parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 644-653.

SOUZA, C.E.A., RÉGO, J.P., FIORAMONTE, M., GOZZO, F.C., OLIVEIRA, J.T.A., MOURA, A.A., 2011. Proteomic identification of the cauda epididymal and vesicular gland fluids of brazilian hairy rams. 36th Annual Meeting of the American Society of Andrology. American Society of Andrology, Montréal, QC, pp. 78-79.

SOUZA, C.E.A., RÉGO, J.P., NOGUEIRA, F.C., OLIVEIRA, J.T.A., DOMONT, G.B., SANTOS, D.O., MOURA, A.A., 2010b. Identification of the major proteins of ram seminal plasma using a proteomic approach. 35th Annual Meeting of the American Society of Andrology. American Society of Andrology, Houston, TX, p. 63.

TALEVI, R., GUALTIERI, R., 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* 73, 796-801.

TANTIBHEDHYANGKUL, J., WEERACHATYANUKUL, W., CARMONA, E., XU, H., ANUPRIWAN, A., MICHAUD, D., TANPHAICHITR, N., 2002. Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* 67, 212-219.

TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, A., MAFFEO, G., RONCHI, S., 2000. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.* 267, 6175-6179.

TEIXEIRA, D.I.A., MELO, L.M., GADELHA, C.A.A., CUNHA, R.M.S., BLOCH JR, C., RÁDIS-BAPTISTA, G., CAVADA, B.S., FREITAS, V.J.F., 2006. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gen. Mol. Res.* 5, 79-87.

- THÉRIEN, I., BLEAU, G., MANJUNATH, P., 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52, 1372-1379.
- THÉRIEN, I., MANJUNATH, P., 2003. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 69, 1408-1415.
- THIMON, V., MÉTAYER, S., BELGHAZI, M., DACHEUX, F., DACHEUX, J.L., GATTI, J.L., 2005. Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. *Biol. Reprod.* 73, 881-890.
- TOPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., TSOLOVA, M., 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 717-736.
- VADNAIS, M.L., ROBERTS, K.P., 2010. Seminal plasma proteins inhibit *in vitro*- and cooling-induced capacitation in boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 893-900.
- VILLEMURE, M., LAZURE, C., MANJUNATH, P., 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 39-48.
- WEERACHATYANUKUL, W., XU, H., ANUPRIWAN, A., CARMONA, E., WADE, M., HERMO, L., SILVA, S.M., RIPPSTEIN, P., SOBHON, P., SRETARUGSA, P., TANPHAICHITR, N., 2003. Acquisition of arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 69, 1183-1192.
- WU, A., ANUPRIWAN, A., IAMSAARD, S., CHAKRABANDHU, K., SANTOS, D.C., RUPAR, T., TSANG, B.K., CARMONA, E., TANPHAICHITR, N., 2007. Sperm surface arylsulfatase A can disperse the cumulus matrix of cumulus oocyte complexes. *J. Cell Physiol.* 213, 201-211.

YOSHIDA, M., KAWANO, N., YOSHIDA, K., 2008. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3446-3457.

Figure 1. Two-dimensional map of seminal plasma proteins of adult rams. (1A) Represents the master gel generated by PDQuest software (Bio-Rad, USA), based on a match set with all gels used in the study. (1B) Corresponds to the reference map (from ram SI 517) from which the master was mostly generated.

Figure 2. Ram seminal plasma protein spots differentially expressed in groups of rams with higher (G2) and lower sperm motility (G1). (2A and 2B) Master gel and respective spot intensities of seminal plasma proteins from Santa Ines rams differentially expressed in G2 and G1, respectively.

Figure 3: Probabilities of having more than 80% motile sperm estimated by logistic regression ($y = \frac{e^{a+bx}}{1+e^{a+bx}}$) of spots that differed ($P<0.01$) between high and low motility groups.

Table 1: Mean (\pm SD) of evaluated seminal traits of Santa Ines rams.

Table 2: Seminal plasma proteins of adult rams differentially expressed in ejaculates displaying higher or lower sperm motility.

b. Submissão do Artigo II Referente ao capítulo 1

Periódico: Theriogenology

Protein profile of membrane proteins from ejaculated and epididymal spermatozoa in Santa Ines rams

M van Tilburg^a, CEA Souza^a, MAM Rodrigues^a, AA Moura^{a*}

^aDepartment of Animal Science, Federal University of Ceará, 60021-970, Fortaleza, Brazil

** corresponding author: Department of Animal Science, Federal University of Ceará, Av. Mister Hull S/N, Campus Pici, Fortaleza – CE – Brazil – 60021-970; amoura@ufc.br (55-85-3366-9701)*

M van Tilburg: mauricio_van_tilburg@yahoo.com.br; MAM Rodrigues: marcoromabr@yahoo.com.br; CEA Souza: ceasouza@gmail.com; AA Moura: amoura@ufc.br

Abstract

Recently, our research team has conducted several studies about the reproductive development and the protein profile of the seminal plasma, cauda epididymal fluid and vesicular gland secretion from Santa Ines rams. Despite the unique information reported in these studies, it remains to be shown the protein profile of sperm membrane, and how it is changed after ejaculation. In this regard, we conducted the present study to describe the protein maps of epididymal and ejaculated spermatozoa using two-dimensional electrophoresis. Samples from both membrane origins containing 400 µg of protein were separated by two-dimensional electrophoresis and respective maps analyzed using PDQuest. Membrane proteins were also separated by SDS-PAGE and incubated with

antibodies against Binder of Sperm Protein 1 (BSP1) and Bodhesin 2 (Bdh2), which are a known component of vesicular gland secretion, to investigate if these proteins bind to sperm membrane during ejaculation. On average, we detected 162 spots per gel of ejaculated sperm membrane proteins. From these 92 were consistently present in every gel of the matchset. Knowledge of their identities is a crucial step towards the comprehension of how these proteins are related to sperm function.

Keywords: ram, seminal plasma, sperm motility, proteomics

Introduction

The Northeast of Brazil has 40% of the Brazilian sheep herd, estimated at almost 20 million animals. In spite of the absolute numbers of the Brazilian herd, fertility indexes of the hairy sheep still need significant increases so that the production systems meet appropriate profitability and competitiveness on the world market. The fertility problems in sheep flocks are due, in large part, to aspects of the physiology and reproductive management of females. However, the males tend to influence this situation given that, based on studies carried out with cattle, there is a high percentage of temporarily infertile and subfertile sires in farms that use natural mating services (Peddinti et. al, 2008). Therefore this fact must have significant influence on the number of offspring born per year in the herd, given the large number of females submitted to the natural mating system (Lima, 1996).

Factors related to the male contribute to a large proportion of infertility in several species and the nature of male sub-fertility is as complex as that of the female (Saacke et al., 2000). Several studies have pointed to the actions of diverse proteins found in the semen, as related to the acquisition of fertilizing capacity of the spermatozoa in mammals (Carballada and Esponda, 1998). Recently, our research team

has conducted comprehensive studies about the reproductive development, age at puberty (Souza et al., 2010), spermatogenesis (Souza, 2003) and protein profiles of the seminal plasma from Santa Ines rams (Souza et al., 2010).

Despite the large amount of information obtained by those studies about the tropically-adapted rams of Brazil, we still need to understand how sperm parameters relate to the expression of molecular components of the reproductive tract. In this regard, we conducted the present study to determine how sperm membrane protein profile changes after ejaculation, compared to that of epididymal sperm.

Material and Methods

General procedure

The rams were managed in accordance to international guidelines for research involving animals. Semen samples were collected from 5 adult Santa Ines rams with normal reproductive status, and the seminal plasma was immediately separated from sperm by centrifugation. Cauda epididymal sperm were obtained by backflushing the epididymides with warm PBS from 5 different rams. Sperm membrane protein samples were isolated and then subjected to 2-D electrophoresis. All gels were stained with colloidal Coomassie blue and the resulting images, scanned and analyzed with PDQuest (Bio-Rad, Rockville, MD, USA).

Semen collection and obtainment of membrane proteins

Semen samples were collected one time from each animal and analyzed as previously reported (Souza et al., 2010). Briefly, semen was harvested using an artificial vagina, immediately placed in a water bath (37°C) and aliquots taken for assessment of the percentage of motile sperm. Sperm concentration was determined with the aid of a

haemocytometer. The remaining semen was immediately centrifuged at 700 x g for 15 minutes at 4°C to separate the seminal plasma from the sperm. Seminal plasma was discarded, and spermatozoa were washed three times in cold PBS, aliquoted and frozen until used (-20°C).

Cauda epididymal sperm was obtained from five different rams, according to a method previously described (Souza et al., 2011). In a few words, immediately after slaughter, epididymides were dissected from the testes, and warm PBS was flushed back with a small syringe through vas deferens. A small incision was made at the cauda epididymis and the milieu containing cauda epididymal fluid and sperm was recovered. Epididymal sperm were washed and processed as described for ejaculated sperm.

Sperm cells were thawed at room temperature, and washed another three times as described above. After the final wash, the sperm pellet was re-suspended in 1.5 mL of PBS containing 1% (v/v) of a protease inhibitor cocktail containing AEBSF (104 mM), aprotinin (80 µM), bestatin (4 mM), E-64 (1.4 mM), leupeptin (2 mM) and pepstatin A (1.5 mM). Membrane proteins were isolated as described before (Bohring and Krause, 1999), with modifications. Five hundred million spermatozoa from each sample were homogenized ten times (4 seconds each) using a crusher-type device and washed another three times to remove intracellular proteins. The pellet containing membrane proteins was suspended in 2 mL of PBS containing 1% (v/v) triton X-100 and incubated for 2 hours at 4°C under mild agitation. Samples were then, sonicated for 30 minutes on iced water (4°C), and centrifuged thereafter (5,000 g, 30 min., 4°C). The supernatant was saved and the proteins, precipitated with acetone by mixing 1 part of sample to 9 volumes of cold acetone (-20°C) for 2 hours. Precipitated proteins were centrifuged (5,000 g, 60 min., 4°C) and the pellet was air-dried overnight, and re-suspended in sample buffer (7M urea, 2M thiourea, 40 mM DTT (dithiothreitol), 2%

free ampholytes (IPG buffer, 4-7), 4% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate). Membrane proteins were diluted in water (1:20 to 1:50) and 20 microliters of each sample were used to determine the total protein concentration (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as standards, and all assays were ran in triplicates.

Two-dimensional electrophoresis and computerized analysis of the maps

Electrophoresis of sperm membrane proteins was carried out on immobilized pH gradient (IPG) strips, as described by Souza et al. (2010), with modifications. In summary, samples containing 400 µg of total protein were mixed with buffer (7M urea, 2M thiourea, 2% free ampholytes (IPG buffer, 4-7), 2% CHAPS and traces of bromophenol blue) sufficient to make 250 µL. Then, samples were incubated with 13 cm IPG strips (pH 4 to 7, linear; GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA), and allowed to rehydrate for 20 hours. Isoelectric focusing was carried out in ETTANTM IPGphor 3TM (GE Lifesciences, USA) at 20°C, according to the following program: 250V (750Vh), 500V (500 Vh), 800V (800 Vh), 1,000V (1,000 Vh), 8,000V (1h, gradient) and 8,000V (32,000 Vh), with a total of 39,550 Vh. After focusing, strips containing sperm membrane proteins were incubated in equilibration buffer I (6M urea, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, 1% DTT) and re-equilibrated for additional 15 minutes in buffer II (similar to equilibration buffer I, but containing 2.5% iodoacetamide instead of DTT). After equilibration, strips were fixed with agarose (5% in SDS-PAGE running buffer) on the top of homogeneous SDS-polyacrylamide gels (12.5%) and run at 250V, with 20 mA per gel (Hoefer SE 600; GE Lifesciences, USA). Gels were stained in colloidal Coomassie blue (Candiano et al., 2004), with modifications. Briefly, gels were washed three times (20 minutes each) in a solution

containing phosphoric acid (2%) and ethanol (30%); another three washes in 2% phosphoric acid, and then put in a solution with phosphoric acid (2%), ethanol (18%), ammonium sulfate (15%) added with 2 mL of a Coomassie Blue G-250 solution (2%) for 72 hours. Reagents used for electrophoresis were purchased from Acros Organics (Belgium), GE Lifesciences (USA) and/or Sigma-Aldrich (USA).

Two-dimensional gels were scanned at 300 dpi (ImageScanner II; GE Lifesciences, USA), saved as tagged image file format (.tiff) files and analyzed using PDQuest software, 7.3.0 version (Bio-Rad, USA). According to a strategy previously reported (Moura et al., 2006; 2007; Souza et al., 2010), all 2-D maps were evaluated in a single match set and a master gel generated, based on a representative gel. In addition, spots consistently present in the remaining gels were added to the master, so that they could be matched to all samples. We used proteins in key regions of the master gel as landmarks and achieved the matching of spots after several rounds of extensive comparisons. Also, final spot matches were organized by checking each spot in each gel with the respective pattern in the master. Protein quantities were given as parts per million of the total integrated optical density of spots in the gels, according to PDQuest.

Immunodetection of major seminal plasma proteins in sperm membrane extracts

Twenty micrograms of membrane proteins from ejaculated and epididymal sperm were applied to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, GE Lifesciences, USA) and allowed to air-dry. Membranes were blocked overnight at 4°C with PBS-T (10 mL of PBS with 0.5% Tween 20) containing BSA (5% w/v), under mild agitation, followed by incubation with primary antibodies (1:1000 for anti-BSP1 and anti-bodhesin 2) for 2h. Membranes were then washed three times in PBS-T and incubated with donkey anti-

rabbit IgG coupled with alkaline phosphatase (Abcam, Cambridge, MA, USA) for another 2 hours, washed again three times in PBS-T and rinsed twice with Tris-HCl (50 mM). Immunoreaction was visualized by exposing the membranes to a solution containing BCIP® (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 0.15mg/mL), NBT (nitro blue tetrazolium 0.30 mg/mL), Tris (100 mM) and MgCl₂ (5 mM), pH 9.5. Reaction was stopped by washing the membranes several times with milli-Q water. Positive controls consisted of application of the primary and secondary antibodies directly to the membrane, while negative control comprised revelation of a similar membrane without exposition to the primary antibody (data not shown).

Antibodies against BSP1 were purified from rabbit antiserum, and kindly provided by Dr. Puttaswamy Manjunath (Department of Medicine, University of Montréal, Canada). Polyclonal antibodies against bodhesin-2 were commercially developed (Rhea Biotech, Campinas, SP, Brazil) against a peptide (SSNQPVSPFDIFYYERPSA), corresponding to the C-terminus sequence of BDh-2.

Results

Rams used in this experiment ejaculated, at least, 1.0 mL of semen with a score of 3.5 for wave motion (out of 5), 80% of motile sperm, and containing 1.5 billion sperm cells per milliliter of semen, with a maximum of 5% of abnormal cells.

On average, we detected 236±7 spots per gel of ejaculated sperm membrane proteins (Figure 1A). From those, 63 spots were consistently present on all gels. The combined intensity of those spots accounted for 41.5% of the intensity of all valid spots in the matchset. The four major spots, 4001 (10.2 kDa, pI 5.3), 4002 (10.6 kDa, pI 5.3), 1101 (11.4 kDa, pI 5.0) and 2001(10.3 kDa, pI 5.7) had low molecular weights, and,

combined, represented 31.4% of all spots in the gels. Epididymal sperm membrane gels had an average of 225 ± 14 spots (Figure 1B). Thirty eight spots were present on every member of the matchset, representing 32.6% of the combined intensity of all spots. Major spots represented those of high molecular weight (around 60 kDa).

The major band in the gel reacted against anti-BSP1, around 14 kDa. Anti-Bdh, on the other hand, reacted against two bands, one of 12 kDa and other around 60 kDa of ejaculated sperm. For epididymal sperm, however, no signal was observed using anti-BSP, while the same bands reacted against anti-Bdh, with slightly higher intensity compared to ejaculated sperm.

Discussion

The present study reports sperm membrane protein profiles of ejaculated and epididymal sperm in Morada Nova rams. These rams are typical of tropical regions from Brazilian northeast, but in the last years have been disseminated throughout the country. Seminal plasma proteins come mostly from the mix of cauda epididymal fluid (Moura et al., 2010) and accessory sex gland fluid proteins (Moura et al., 2007), but might also shed from sperm membrane (Thimon et al., 2005). Some of these proteins are able to bind the sperm membrane and many of them have been associated with several aspects of sperm function, such as sperm capacitation (Manjunath and Thérien, 2002), formation of the oviduct reservoir (Gwathmey et al., 2006) and gamete interaction (Clark, 2011). Also, protein fractions separated from seminal plasma have been associated with the ability to recover sperm membrane after cryoinjury (Barrios et al., 2000; Pérez-Pé et al., 2001).

Low molecular weight spots were the most abundant in both ejaculated and epididymal membrane samples. Spot 4250 reacted against anti-bodhesin 2, a member of the spermadhesin superfamily (Teixeira et al., 2006). Spermadhesins are low molecular weight proteins, abundant in the seminal plasma of ungulates (Tedeschi et al., 2000; Teixeira et al., 2006; Rodriguez-Martinez et al., 2011), that originate in the accessory sex glands (Moura et al., 2007) and epididymis (Moura et al., 2010). These proteins are mainly involved in the formation of the oviduct reservoir (Talevi and Gualtieri, 2010) and gamete interaction (Topfer-Petersen et al., 2008), although there are reports that some of them work as decapacitating factors in the boar (Vadnais and Roberts, 2010). In the bull, the intensity of isoforms of spermadhesin Z13 in the accessory sex gland fluid has been negatively associated with dairy bull fertility (Moura et al., 2007). Although the precise mechanism is still unknown, it is possible that this relationship results from the decapacitating properties of spermadhesin. On the other hand, as we found in this work, spermadhesins might be associated with lower sperm motility (Iwamoto et al., 1995; Caballero et al., 2008).

Another spot more abundant in the ejaculated membrane sample was immunodetected as Ram Seminal Vesicles 14 kDa (RSVP14), which belongs to the Binder of Sperm Protein family (BSPs). They bind to sperm during ejaculation, and remain bound until sperm reaches the oviduct where they modulate the formation of the sperm reservoir as well (Gwathmey et al., 2006; Souza et al., 2008). In the ram, as is the case for its bovine counterpart (BSPs; Manjunath et al., 1994), are produced by the seminal vesicles (Souza et al., 2011), and have not been found in epididymal sperm or cauda epididymal fluid so far. In many species, such as bovine (Thérien et al., 1995), goats (Villemure et al., 2003) and bison (Boisvert et al., 2004), these proteins regulate sperm capacitation by selectively removing cholesterol and phospholipids from the

sperm membrane. However, if they remain for longer times in contact with sperm, there is a continuous removal of phospholipids and cholesterol that can harm membrane structure and cause deleterious effects to sperm motility.

Sperm membrane protein profiles resemble those of seminal plasma and cauda epididymal fluid, respectively. In ejaculated sperm membrane maps, BSPs are the most abundant proteins, as is the case for the seminal plasma (Souza et al., 2010). Also, high molecular weight spots are also present as trains, very similar to those of ram seminal plasma. However important differences have also been found, with most spots in the membrane fraction being scattered 17 and 38 kDa.

Epididymal sperm protein maps display a set of low molecular weight spots similar to those found in the cauda epididymal fluid (CEF; Souza et al., 2011). Two of these spots react with anti-Bdh. As for the high molecular weight region, some of the trains of spots appear akin those of the CEF, in particular those corresponding to α -2-HS-glycoprotein, α -1-antitrypsin, transferrin and albumin. However, the identity of these spots in the sperm membrane needs to be confirmed. Also, epididymal sperm membrane, for some reason, lacks the major albumin spot found in the CEF.

In conclusion, we report similarities and differences between the protein profiles of membrane proteins before and after ejaculation of hairy rams. Knowledge of their identities is a crucial step towards the comprehension of how these proteins are related to sperm physiology. We are currently working on the identification of these proteins, in order to gain insights on the mechanisms underlying their association with sperm function.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by the Brazilian Research Councils (CNPq, CAPES and FUNCAP).

References

- Ahlgren, G., Rannevik, G., Lilja, H., 1995. Impaired secretory function of the prostate in men with oligo-asthenozoospermia. *J. Androl.* 16, 491-498.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63, 1531-1537.
- Bing, C., Bao, Y., Jenkins, J., Sanders, P., Manieri, M., Cinti, S., Tisdale, M.J., Trayhurn, P., 2004. Zinc-alpha-2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2500-2505.
- Boisvert, M., Bergeron, A., Lazure, C., Manjunath P., 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol. Reprod.* 70, 656-661.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Caballero, I., Vazquez, J.M., García, E.M., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J.J., Sanz, L., Martínez, E.A., 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* 70, 1352-1355.

- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G., 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Carballada, R., Esponda, P., 1998. Binding of seminal vesicle proteins to the plasma membrane of rat spermatozoa in vivo and in vitro. *Int. J. Androl.* 21, 19-28.
- Clark, G.F., 2011. Molecular models for mouse sperm-oocyte binding. *Glycobiology* 21, 3-5.
- Ding, Z., Qu, F., Guo, W., Ying, X., Wu, M., Zhang, Y., 2007. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1124-1131.
- Gwathmey, T.M., Ignatz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P., Suarez, S.S., 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol. Reprod.* 75, 501-507.
- Iwamoto, T., Hiroaki, H., Furuichi, Y., Wada, K., Satoh, M., Satoh, M., Osada, T., Gagnon, C., 1995. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Lett.* 368, 420-424.
- Lima, M.J., 1996. Investir na inseminação artificial é investir na eficiência. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 20, 77.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., Desnoyers, L., 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.* 49, 27-37.

- Manjunath, P., Thérien, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53, 109-119.
- Moura, A.A., Chapman, D.A., Koc, H., Killian, G.J., 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J. Androl.* 27, 534-541.
- Moura, A.A., Chapman, D.A., Koc, H., Killian, G.J., 2007. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 98, 169-188.
- Moura, A.A., Souza, C.E.A., Stanley, B.A., Chapman, D.A., Killian, G.J., 2010. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J. Proteomics* 73, 2006-2020.
- Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J.M., Burgess, S.C., Memili, E., 2008. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.* 2, 19.
- Pérez-Pé, R., Barrios, B., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2001. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 760, 113-121.
- Qu, F., Ying, X., Guo, W., Guo, Q., Chen, G., Liu, Y., Ding, Z., 2007. The role of Zn-alpha2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. *Reproduction* 134, 569-576.
- Rocha, S.L., Neves-Ferreira, A.G., Trugilho, M.R., Chapeaurouge, A., León, I.R., Valente, R.H., Domont, G.B., Perales, J., 2009. Crotalid snake venom subproteomes unraveled by the antiophidic protein DM43. *J. Proteome Res.* 8, 2351-2360.

Rodriguez-Martinez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., Calvete, J.J., 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 11-22.

Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L., Bame, J.H., 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 663-667.

SAS, 2002. SAS User's Guide, fourth ed. SAS Inst., Inc., Cary.

Souza, C.E.A., 2003. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: gonadal development, sperm production, age at puberty and seminal plasma proteins. M.Sc. Thesis, Department of Animal Science, Federal University of Ceará, Brazil (in Portuguese with English Abstract).

Souza, C.E.A., Araújo, A.A., Oliveira, J.T., Lima-Souza, A.C., Neiva, J.N., Moura, A.A., 2010. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 644-653.

Souza, C.E.A., Rego, J.P., Gozzo, F.C., Fioramonte, M., Oliveira, J.T.A., Moura, A.A., 2011. Proteomic identification of the major proteins of cauda epididymal fluid and vesicular gland fluid of brazilian hairy rams. *J. Androl. Suppl 1*, p. 87-88.

Talevi, R., Gualtieri, R., 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* 73, 796-801.

Tantibhedhyangkul, J., Weerachatyanukul, W., Carmona, E., Xu, H., Anupriwan, A., Michaud, D., Tanphaichitr, N., 2002. Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* 67, 212-219.

- Tedeschi, G., Oungre, E., Mortarino, M., Negri, A., Maffeo, G., Ronchi, S., 2000. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.* 267, 6175-6179.
- Teixeira, D.I., Melo, L.M., Gadelha, C.A., Cunha, R.M., Bloch, C. Jr, Rádis-Baptista, G., Cavada, B.S., Freitas, V.J.F., 2006. *Genet. Mol. Res.* 5, 79-87.
- Thérien, I., Bleau, G., Manjunath, P., 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52, 1372-1379.
- Thimon, V., Métayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L., 2005. Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. *Biol. Reprod.* 73, 881-890.
- Topfer-Petersen, E., Ekhlaei-Hundrieser, M., Tsolova, M., 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 717-736.
- Vadnais, M.L., Roberts, K.P., 2010. Seminal plasma proteins inhibit in vitro- and cooling-induced capacitation in boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 893-900.
- Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 39.
- Weerachatyanukul, W., Xu, H., Anupriwan, A., Carmona, E., Wade, M., Hermo, L., da Silva, S.M., Rippstein, P., Sobhon, P., Sretarugsa, P., Tanphaichitr, N., 2003. Acquisition of arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 69, 1183-1192.

Wu, A., Anupriwan, A., Iamsaard, S., Chakrabandhu, K., Santos, D.C., Rupar, T., Tsang, B.K., Carmona, E., Tanphaichitr, N., 2007. Sperm surface arylsulfatase A can disperse the cumulus matrix of cumulus oocyte complexes. *J. Cell Physiol.* 213, 201-211.

Figure 1. Two-dimensional map of ejaculated sperm membrane proteins from adult rams. (A) Represents the master gel generated by PDQuest software (Bio-Rad, USA), based on a match set with all gels used in the study. (B) Corresponds to the reference map (from ram MN 117) from which the master was mostly generated. Proteins were stained with Coomassie blue.

Figure 2. Two-dimensional map of epididymal sperm membrane proteins from adult rams. (A) Represents the master gel generated by PDQuest software (Bio-Rad, USA), based on a match set with all gels used in the study. (B) Corresponds to the reference map (from ram MN 121) from which the master was mostly generated. Proteins were stained with Coomassie blue.

Figure 3: Western blots of ejaculated and epididymal sperm membrane proteins from adult rams. Lanes 1 and 2 probed against anti-bodhesin antibody (1:500). Lane 3 corresponds to molecular weight markers.

Table 1: Sperm membrane proteins of adult rams. The proteins were identified by two-dimensional electrophoresis and tandem mass spectrometry (ESI-Q-ToF). Spot numbers refer to those shown in the gels of Figure 1. False discovery rate represents peptide matches against a decoy database above identity threshold.