

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE
CARNEIROS SANTA INÊS ADULTOS

João Paulo Arcelino do Rêgo
Zootecnista

FORTALEZA-CE
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE
CARNEIROS SANTA INÊS ADULTOS

AUTOR: *JOÃO PAULO ARCELINO DO RÊGO*

ORIENTADOR: Prof^o ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE N. MOURA, PhD.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Reprodução Animal.

FORTALEZA-CE

Março de 2010

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, 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.

JOÃO PAULO ARCELINO DO RÊGO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM _____/_____/2010

Prof. Dr. ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE N. MOURA
ORIENTADOR

Prof. Dr. JOSÉ TADEU ABREU DE OLIVEIRA
CONSELHEIRO (UFC)

Prof. Dr. GILBERTO BARBOSA DOMONT
CONSELHEIRO (UFRJ)

Prof. Dr. AIRTON ALENCAR DE ARAÚJO
CONSELHEIRO (UECE/UFC)

Dr. CARLOS EDUARDO AZEVEDO SOUZA
CONSELHEIRO (UFC)

EPÍGRAFE

**“A mente que se abre a uma
idéia nova, jamais volta ao
seu tamanho original.”**

Albert Einstein

Às minhas avós Benedita Carlos (Dona Dita) e Joana Izabel (Joana Báia) *in memoriam*, pelos exemplos de perseverança, honestidade, justiça e humildade sempre presentes em seus ensinamentos, sendo eles essenciais para minha formação como Ser Humano.

OFEREÇO

Aos meus pais Gessé e Francisca símbolos de honestidade, superação presentes em toda minha caminhada e pelo apoio para superar e transpor as dificuldades que ocorreram durante mais uma conquista.

Vocês fizeram parte dessa história!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração e força principalmente na superação dos momentos mais difíceis.

Aos meus Pais (Francisca e Gessé) e irmã (Ana Jussara), por estarem sempre presentes durante toda a minha trajetória profissional, pela compreensão e carinho nos momentos de ausência e muitas vezes de impaciência.

À minha namorada, amiga e companheira Viviane, pelo apoio e compreensão nos momentos em que eu estava distante.

À minha prima-irmã e amiga Cirlânia, por ter me acolhido em sua casa dando todas as condições para que eu desenvolvesse meus estudos durante todo esse tempo, e a sua irmã e minha prima Derlânia, pelos almoços de domingo sempre cheios de requinte.

Ao meu orientador Prof. Arlindo Alencar Araripe Moura, pelos ensinamentos profissionais e de vida que me foram passados.

À EMBRAPA Caprinos e Ovinos, em especial ao Dr. Diônes Oliveira Santos, por ter disponibilizado os animais, a infra-estrutura do Laboratório de Tecnologia de Sêmen, por seus conselhos de amigo, irmão e muitas vezes até de pai. Diônes, todas as vezes em que eu for indagado sobre minha formação, seus ensinamentos estarão contidos em minhas palavras.

Ao prof. Dr. José Tadeu de Oliveira e toda equipe do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa pela execução do experimento e pelo repasse de informações valiosas que foram imprescindíveis para o cumprimento das atividades e geração dos dados.

Ao prof. Dr. Gilberto Domont por ter disponibilizado toda a infra-estrutura do Instituto de Química da UFRJ e da FIOCRUZ para a realização das análises; por

todos os conselhos e sugestões valiosas durante a condução dos trabalhos; por todo o carinho e atenção disponibilizados durante a nossa estadia no Rio de Janeiro; e ao Fábio que sempre esteve disponível na condução das análises, fato indispensável para a concretização do estudo.

Ao Dr. Carlos Eduardo, amigo, conselheiro e muitas vezes irmão, que não mediu esforços para ajudar na execução dos trabalhos. Sempre paciente em suas colocações, ensinou muito mais que regras e condutas diante de uma bancada, acima de tudo, ensinou-me os postulados do respeito, da ética e da amizade.

À toda equipe da Reprodução Animal (Zootecnia), em especial aos amigos Alethéia, Érica, Rodrigo, Fabiane, Cláudia, Michele, Emanuel e a todos com que eu sempre pude contar.

À todos os amigos do Lab. 1085 (Bioquímica) da UFC, Hélio Filho, Darcy, Fredy, Vladimir, Johnatan, Alexandra, Janaína, por todos os momentos de estudo e descontração vividos.

Àos amigos do Departamento de Zootecnia da UFC, Leonília (*in memoriam*), Marcílio, Ítalo, Breno, Diêgo, Francisca (Secretária), Rômulo (Apicultura), Rômulo (Computadores), Josiane, Priscila, por todos os momentos compartilhados e pelo companheirismo presente durante todo esse tempo.

Aos professores do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Prof. Ciro Torres, Prof^a. Elenice, Prof. Pedro Veiga, Prof. Juquinha e aos amigos Tião, Maura, Armed, Renata, Daniel, Emílio, que tanto contribuíram com o meu aprendizado durante a estadia nas Minas Gerais.

À banca examinadora pela atenção dispensada na correção deste trabalho.

A todas as pessoas que estiveram comigo em mais uma conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFC pela formação durante esse curso.

Aos animais:

Que são nosso alimento, nossas cobaias, nossos amigos. Eles repartem conosco os problemas e conflitos deste mundo que nós, seres racionais tivemos a pretensão de construir, alterar e modificar muitas vezes sem pensar que, de nossas decisões, dependiam a sobrevivência e o conforto de vocês. Poluímos o seu mundo para com nossas tecnologias desumanas, e vocês, corajosamente fugiram delas, mais, figuram calados. Com a nossa inteligência, domesticamos sua selvageria, conquistamos sua amizade. Mas, infelizmente, não soubemos retribuí-la como vocês mereciam. Acredito que ainda há tempo de nós, seres racionais, aprendermos as lições que vocês podem nos ensinar.

A todos vocês, o meu sincero obrigado!

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos identificados por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associado à espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF).....	99

LISTA DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1A.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos. Representa o gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado na combinação dos *spots* de todos os membros utilizados no estudo. 43
- FIGURA 1B.** Mapa bidimensional utilizado como referência (carneiro #3) o qual o gel sintético foi primeiramente gerado..... 44
- FIGURA 1C.** Mapa bidimensional utilizado como referência com as principais seqüências de *spots* identificados. 46
- FIGURA 2A.** Representação gráfica dos peptídeos referente à proteína Bdh-1 e Bdh-2 através do aplicativo Caititu. 53
- FIGURA 2B.** Representação gráfica dos peptídeos referente à proteína RSVPs 14 e 22 através do software Caititu. 58

LISTA DE ABREVIações

μg - micrograma

μl - microlitro

ACE – enzima conversora da angiotensina

BSP – proteína ligante do espermatozóide

C – concentração espermática

g – gravidade

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

RESUMO

O Nordeste brasileiro é detentor de um expressivo rebanho ovino, e, dentre as raças deslanadas existentes na região, a Santa Inês se destaca por apresentar bom desenvolvimento corporal, ganho de peso e adaptabilidade às condições tropicais. Recentemente, demonstrou-se que o perfil protéico do plasma seminal de carneiros Santa Inês passa por alterações significativas durante o desenvolvimento reprodutivo, simultaneamente a mudanças nos parâmetros de motilidade e concentração espermática. Contudo, ainda não se conhece a identidade de todas essas proteínas. Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de identificar as proteínas do plasma seminal de carneiros Santa Inês maduros, utilizando as técnicas de eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa. Amostras de sêmen foram coletadas de oito carneiros adultos e o plasma seminal obtido através de centrifugação e submetido à eletroforese bidimensional. Os géis foram corados com Coomassie coloidal, digitalizados e analisados no aplicativo PDQuest. Os *spots* foram cortados individualmente dos géis, digeridos com tripsina, e submetidos a identificação por espectrometria de massa (MALDI-ToF/ToF). A sequência peptídica das proteínas mais abundantes e a distribuição dos domínios foram representadas graficamente utilizando o aplicativo Caititu. Foram detectados, em média, 302 *spots* por gel. Destes, 143 estavam presentes em todos os géis. Trinta e nove *spots* foram identificados, correspondendo a 26 diferentes proteínas. As proteínas mais abundantes foram as RSVPs 14 e 22 kDa, pertencentes à família das *binder of sperm proteins*, e as Bodesinas-1 e 2, pertencentes à família das espermedesinas. Outras proteínas foram identificadas no estudo, incluindo albumina, clusterina, peroxiredoxina, lactotransferrina, metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2), beta galactosidase e *heat shock* proteins. Dessa forma, a identidade dessas proteínas

sugere que o plasma seminal de carneiros Santa Inês contém componentes que participam de diversos processos fisiológicos, incluindo proteção do espermatozóide, modulação da motilidade e capacitação espermática, modificação da membrana do espermatozóide e interação entre gametas. O conhecimento dessas proteínas contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação do plasma seminal sobre a função espermática em ovinos.

ABSTRACT

Northeastern Brazil has a significant population of sheep and, among the native hairy breeds, Santa Inês is known for its good performance and adaptability to tropical environments. Recently, it has been shown that the protein profile of the seminal plasma of Santa Inês rams changes during sexual development, in concert with changes in semen parameters, such as sperm motility, morphology and concentration. However, the identity of seminal plasma proteins from these hairy rams is still unknown. Therefore, we pursued the identification of seminal plasma proteins from Santa Inês rams using a proteomic approach. Semen samples were collected from eight mature rams, and seminal plasma saved after centrifugation. Seminal plasma protein maps, obtained by two-dimensional electrophoresis, were stained with colloidal Coomassie. The gels were scanned and analyzed using PDQuest software. Protein *spots* were individually cut, in-gel digested with trypsin and identified after tandem mass spectrometry and database search. On average, we detected 302 *spots* per gel, from which 143 were present on every member of the match set generated by PDQuest. Thirty-nine *spots* were positively identified by mass spectrometry, corresponding to 26 different proteins. The major proteins present in the maps were the BSP-like RSVP14 and RSVP22 and the spermadhesins bodhesin 1 and 2. Other proteins detected in the maps included albumin, clusterin, peroxiredoxin, lactoferrin, transferrin, matrix metalloproteinase 2, beta galactosidase and heat shock proteins. The Identity of these proteins suggest their participation on several physiological events, such as sperm protection, regulation of sperm motility and capacitation, modification of sperm membrane and fertilization. The knowledge of the proteome of the ovine seminal plasma is a necessary step towards the

understanding of the mechanisms underlying the regulation of sperm function by seminal plasma components in rams.

SUMÁRIO

	Página
1 - INTRODUÇÃO	19
2 - REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Proteínas do plasma seminal	22
2.1.1. <i>Proteínas envolvidas com a proteção espermática</i>	23
2.1.2. <i>Proteínas associadas com a motilidade espermática</i>	26
2.1.3. <i>Proteínas que participam da capacitação espermática</i>	28
2.1.4. <i>Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação entre gametas</i>	31
3 - MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Delineamento experimental	36
3.2. Coleta e processamento do sêmen	36
3.3. Quantificação da concentração de proteína total no plasma seminal	37
3.4. Eletroforese bidimensional	38
3.5. Digitalização e análise dos géis	39
3.6. Digestão das proteínas	40
3.7. Espectrometria de massa - MALDI-ToF (Matrix-Associated Laser Desorption Ionization-Time of Flight)/ToF	40
3.8. Pesquisa em banco de dados	41
3.9. Análise estatística	41
4 – RESULTADOS	42
5 - DISCUSSÃO	44
5.1. Proteínas envolvidas na proteção espermática	47
5.2. Proteínas associadas com a motilidade espermática	50

<i>5.3. Proteínas envolvidas no processo de capacitação</i>	55
<i>5.4. Enzimas glicolíticas</i>	58
<i>5.5. Proteases e inibidores</i>	61
<i>5.6. Outras proteínas</i>	63
6 - CONCLUSÕES	64
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro concentra 57,18% dos ovinos do País, estimado em cerca de 9,3 milhões de cabeças e composto por animais predominantemente deslanados, utilizados para a produção de carne e pele (IBGE, 2007). Dentre as raças ovinas deslanadas existentes na região, a Santa Inês se destaca por apresentar alta adaptabilidade às condições tropicais, possui um bom desenvolvimento corporal, carcaça e pele de ótima qualidade (OLIVEIRA; LIMA, 1994). Esses importantes atributos fazem com que a raça Santa Inês seja utilizada com sucesso em cruzamentos com raças européias, australianas e sul africanas. Apesar da importância da raça Santa Inês para os sistemas de produção de ovinos no Brasil, ainda são escassas as informações básicas sobre a fisiologia reprodutiva dos reprodutores.

A eficiência reprodutiva constitui um dos principais objetivos de seleção utilizado nos atuais sistemas de produção animal por ser um dos fatores essenciais para a lucratividade (MATOS et al., 1992). Diversos critérios têm sido utilizados para buscar indicadores confiáveis do potencial reprodutivo dos animais, incluindo medições da biometria testicular, avaliação da motilidade e defeitos morfológicos, análise computadorizada do sêmen e testes avançados de função espermática, como a integridade acrossômica ou da cromatina (ROGERS et al. 1983; HOLT et al. 1997; SOUZA et al., 2001; GADEA, 2005). No entanto, apesar destas avaliações definirem critérios mínimos para a seleção e utilização de reprodutores, as mesmas não apresentam relação significativa com a fertilidade dos animais (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993; POPWELL; FLOWERS, 2004). A limitação destes testes para se prever a fertilidade de um determinado animal pode estar relacionada ao fato de que estes exames não levam em consideração a habilidade dos espermatozoides de sofrer alterações funcionais importantes para o processo de fertilização (AMMAN;

HAMMERSTEDT, 1993). Recentemente, estudos demonstraram uma relação entre a expressão de proteínas no fluido do trato reprodutivo e a fertilidade dos reprodutores (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001; MOURA et al., 2006a, 2007). O plasma seminal é uma secreção fisiológica complexa, composta por fluídos oriundos dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (ampolas, glândulas vesiculares e bulbo-uretrais), servindo como meio de transporte para os espermatozóides durante a ejaculação e sobrevivência no trato reprodutivo feminino (EVANS; MAXWELL, 1987). Durante o trânsito epididimário e na ejaculação, os espermatozóides adquirem inúmeras proteínas que podem influenciar sua fertilidade (YANAGIMACHI, 1994; KILLIAN et al., 1993; MILLER et al., 1990). Estas proteínas foram associadas a características como motilidade (AMANN et al., 1987; DIAMANDIS et al., 1999), morfologia (DE KRETZER; KERR, 1994) e capacidade de produção espermática (GILMONT et al., 1990; MÉTAYER et al., 2001), ou a habilidade de espermatozóides fertilizarem oócitos *in vitro* (HENAULT et al., 1995; HENAULT; KILLIAN, 1996; MOURA et al., 2007b). O plasma seminal pode ainda prevenir a capacitação espermática prematura (YANAGIMACHI, 1994) e proteger as células espermáticas contra danos oxidativos (SCHÖNECH et al., 1996).

Na espécie ovina, estudos têm relatado a expressão de proteínas no plasma seminal que exercem efeito positivo sobre a capacitação espermática e proteção dos espermatozóides de carneiros adultos de raças européias (PÉREZ -PÉ et al., 2001; BARRIOS et al., 2005; FERNÁNDEZ-JUAN et al., 2006; CARDOZO et al., 2007). É evidente que os estudos sobre este tema na espécie ovina ainda são bastante incipientes em comparação com os avanços descritos para os animais bovinos (*Bos taurus*). Neste contexto, estudo conduzido recentemente mostrou que vários *spots* protéicos presentes no plasma seminal apresentam alterações significativas durante o desenvolvimento reprodutivo de carneiros deslanados, o que, obviamente, sugere que

a expressão de tais componentes é regulada em sintonia com o crescimento das gônadas e evolução da produção espermática (SOUZA et al., 2010). Assim, a identificação das proteínas contidas no plasma seminal é essencial para alcançar um melhor entendimento sobre a função espermática.

Nesse contexto, o conhecimento do perfil protéico do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos poderá alicerçar os estudos sobre a fisiologia reprodutiva básica desses animais, o que possibilita a utilização de proteínas do plasma seminal como marcadores moleculares para fertilidade, podendo auxiliar futuramente na seleção de reprodutores mais férteis na raça Santa Inês. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar as proteínas do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos, utilizando uma abordagem proteômica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas do plasma seminal

A intensificação dos sistemas de criação, motivada pelo aumento na procura de produtos de origem animal, suscita hoje o interesse da investigação na busca por melhores índices reprodutivos dos rebanhos. Nos atuais sistemas de produção a eficiência reprodutiva, especialmente dos machos, é um fator essencial a ser considerado para que haja retorno econômico satisfatório da atividade. A disponibilidade de reprodutores testados, com elevado potencial reprodutivo é essencial para garantir a eficiência reprodutiva e a produção de crias. Dessa forma, a busca por indicadores da fertilidade masculina tem sido alvo de diversos estudos conduzidos nas últimas décadas. Inúmeros parâmetros têm sido utilizados para a busca de indicadores confiáveis do potencial reprodutivo dos animais, incluindo medições da biometria testicular (OTT; MEMON, 1980; YARNEY et al., 1990; SOUZA et al., 2001), avaliação de características de espermatozóides ejaculados, como motilidade e defeitos morfológicos (GODFREY et al., 1990; CORREIA et al., 1997) ou mesmo análise computadorizada do sêmen e testes avançados de função espermática, como a integridade acrossômica ou da cromatina (BUDWORTH et al., 1988; JANKAUSKAS et al., 1999). Porém, apesar destes parâmetros viabilizarem a definição de critérios mínimos para a seleção e utilização de reprodutores, eles não apresentam relação significativa com a fertilidade dos animais (RODRIGUEZ-MARTINEZ; LARSSON, 1998; LARSON; MILLER, 2000). A maioria dos atuais procedimentos de análise seminal não consegue prever a fertilidade potencial dos reprodutores, provavelmente porque eles não levam em consideração importantes etapas no processo de fertilização, como a capacitação espermática e a reação acrossômica (AMMAN; HAMMERSTEDT, 1993).

A busca por possíveis indicadores de fertilidade, fez com que o tema proteínas do plasma seminal se tornasse objeto de recentes pesquisas que visam elucidar as interações entre esses compostos e os espermatozoides desde a ejaculação até a fertilização. O plasma seminal dos mamíferos é uma complexa secreção composta pelos fluidos das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos possuindo uma composição molecular capaz de afetar a função espermática desde iniciação da motilidade durante o trânsito epididimário até a fertilização no trato reprodutivo feminino (YANAGIMACHI, 1994; KRAUS et al., 2005). As proteínas secretadas nos fluidos do trato reprodutivo masculino, em especial no plasma seminal, estão associadas a inúmeros aspectos da função reprodutiva em ruminantes (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998; SPROTT et al., 2000; MOURA et al., 2006a). Em ovinos da raça santa Inês, o perfil protéico do plasma seminal passa por alterações significativas ao longo do desenvolvimento reprodutivo, refletindo associações com a função espermática e outros aspectos da maturidade sexual desses animais (SOUZA et al., 2010). O estudo dessas proteínas pode contribuir para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos ligados à fertilidade. O estudo deste tema torna-se imprescindível para o setor de biotecnologia aplicada a reprodução animal, principalmente no que concerne o desenvolvimento de estratégias para a identificação de componentes do plasma seminal de carneiros deslanados associado com parâmetros seminais, precocidade sexual e fertilidade.

2.1.1. Proteínas envolvidas com a proteção espermática

O plasma seminal contém proteínas que intervêm de forma direta ou indireta na proteção dos espermatozoides, uma vez que essa complexa secreção é formada por fluidos dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (KRAUS et al., 2005). Durante o trânsito epididimário, que em ruminantes dura aproximadamente 15

a 18 dias (AMANN, 1981) e posterior armazenamento na cauda deste órgão, os espermatozóides podem sofrer sérios danos relacionados ao estresse oxidativo (HINTON et al., 1995), causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (HALLIWELL, 1991), devido a um desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação por sistemas antioxidantes (SIKKA et al., 1995). As espécies reativas de oxigênio 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; NICHI et al., 2006). Para combater a ação de ROS sobre os espermatozóides, o epidídimo dispõe diversas enzimas antioxidantes, presentes em diferentes quantidades, de acordo com a região do epidídimo, 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 et 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 sequestrar ferro iônico, prevenindo a formação de peróxidos lipídicos, danosos à membrana espermática (WAKABAYASHI et al., 1999).

A clusterina é uma glicoproteína presente em inúmeros tecidos e fluidos fisiológicos, como o leite e o sêmen (WATTS et al., 1990; KOUNNAS et al., 1995), tendo sido isolada, pela primeira vez, do fluido da *rete testis* de carneiros. Algumas de suas funções incluem interações intercelulares (FRITZ et al., 1983), maturação espermática, regulação da ativação do sistema complemento (JENNE; 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 epidídimo (SENSIBAR et al., 1993; BAILEY; GRISWOLD, 1999; BRAUNDMEIER; MILLER, 2001). A clusterina pode inibir também a precipitação protéica induzida pelo estresse. Este achado apóia a hipótese de que a clusterina expressa durante o estresse celular age como *chaperone*, ou seja, liga-se a proteínas parcialmente desestruturadas, solubilizando-as e protegendo as células dos efeitos citotóxicos da precipitação protéica. 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-teciduals. Isto pode ser importante para a proteção dos espermatozóides no

trato reprodutivo feminino (ROSENBORG; SILKENSEN, 1995; MERI; JARVA, 2001). O fluido das glândulas sexuais acessórias contém proteínas que influenciam direta ou indiretamente em mecanismos envolvidos na prevenção da membrana espermática contra danos causados pelo estresse oxidativo e ataque imunológico (MOURA et al., 2007a). A albumina possui a capacidade de absorver peróxidos de lipídeos contribuindo com este efeito protetor tanto na membrana quanto na motilidade espermática (ALVAREZ; STOREY, 1995). A proteína conhecida como *acidic seminal fluid protein* (aSFP) pertencente a família das espermadesinas também possui um importante papel no controle do estresse oxidativo (SCHONECK et al., 1996).

2.1.2. Proteínas associadas com a motilidade espermática

As mudanças bioquímicas ocorridas nos gametas masculinos desde o trânsito epididimário até ejaculação conferem ao espermatozóide maturidade para que ele se torne apto a fertilização. A motilidade progressiva dos espermatozóides é adquirida durante o trânsito epididimário, como parte da maturação espermática (ORGEBIN-CRIST, 1967; AMANN; HAMMERSTEDT, 1993), sendo que o transporte do espermatozóide até o local onde ocorre a fertilização se dá pela capacidade do espermatozóide se mover progressivamente associado com contrações do trato reprodutivo feminino.

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 azoospermicos. 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.

Algumas proteínas presentes no fluído das glândulas sexuais acessórias também possuem potencial influência na motilidade espermática (MOURA et al., 2007a), incluindo a Binder of Sperm Protein 1 (BSP-1) (SANCHEZ-LUENGO et al., 2004; MANJUNATH et al., 2009), aSFP (SCHONECK et al., 1996) e fosfolipase A2

(BAO et al., 2004). Segundo ARAÚJO (2000) a lactoferrina possui efeitos benéficos sobre a motilidade espermática, percentual de espermatozóides móveis e frequência de batimento flagelar *in vitro* em carneiros. Este efeito é dose dependente e menos pronunciado na percentagem de espermatozóides móveis. A presença desta proteína no diluidor seminal permite uma melhor manutenção dos parâmetros citados acima. Possivelmente, este efeito esteja relacionado à habilidade da lactoferrina em se ligar ao ferro, evitando a produção de radicais livres que levam a peroxidação e danos à membrana espermática, funcionando, desta forma, como um antioxidante (WAKABAYASHI et al., 1999).

2.1.3. Proteínas que participam da capacitação espermática

A capacitação é um processo complexo que ocorre após o espermatozóide estar presente no trato genital feminino (MARTINEZ; 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 fosfolípídeos, 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., 1994; VILLEMURE et al., 2003; BERGERON et al., 2005; LUSIGNAN et al., 2007). 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 do tipo II, semelhantes aos da fibronectina (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). Uma série de estudos tem mostrado que as BSPs ligam-se aos espermatozóides no momento da ejaculação, interagindo com fosfolipídeos contendo colina, abundantes em sua membrana plasmática (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; MANJUNATH et al., 1993; MOREAU et al., 1998), promovendo a remoção de fosfolipídeos (THÉRIEN et al., 1999) e colesterol (THÉRIEN et al., 1998; MOREAU; MANJUNATH, 1999, 2000), o que resulta numa redução considerável na proporção entre colesterol:fosfolipídeos, um dos passos iniciais da capacitação espermática. Além disso, essas proteínas permanecem ligadas à membrana espermática durante seu trajeto no trato reprodutivo feminino. Posteriormente, ao atingirem o oviduto, essas proteínas auxiliam na interação entre os espermatozóides e o epitélio do oviduto (GWATHMEY et al., 2003, 2006), bem como formam sítios de ligação para a heparina e HDL na membrana espermática (THÉRIEN et al., 1995, 1997), os quais, de forma independente, completariam o processo de capacitação espermática. A ligação das BSPs à membrana espermática aumenta o número de sítios de ligação para a heparina e outros galactosaminoglicanos (THÉRIEN et al., 2005) os quais passam a reagir com os espermatozóides (MILLER et al., 1990). Concomitantemente, os espermatozóides também interagem com a lipoproteína de alta densidade (HDL), estimulando uma segunda remoção de colesterol, reduzindo ainda mais a relação colesterol:fosfolipídeos, o que desestabiliza a membrana espermática e inicia vias de transdução de sinais que regulam a expressão de receptores para glicoproteínas da zona pelúcida, entre outros, tornando os espermatozóides aptos a sofrer a reação acrossômica (BENOFF et al., 1993; THÉRIEN et al., 1998). Os processos mediados pelas BSPs que resultam na capacitação espermática sugerem que diferenças

detectadas em suas concentrações nos fluidos reprodutivos podem influenciar a fertilidade.

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 acrossômica (UPRETI et al., 1994), convertendo fosfolipídios em lisolipídios, como a lisolecitina. Os espermatozóides tratados com lisolecitina apresentam fusão das membranas plasmática e acrossômica durante a reação acrossômica (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 epidídimo 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).

2.1.4. Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação entre gametas

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 zona pelúcida dos oócitos é formada por uma matriz glicoprotéica (FLORMAN; WASSARMAN, 1985), cujos carboidratos, incluindo a galactose, N-acetilglicosamina, fucose e manose parecem estar envolvidos na interação entre gametas (MIRANDA et al., 1997).

O epidídimo possui uma série de glicosidases que atuam na maturação epididimal (DACHEUX; VOGLMAYR, 1983). Por um lado, estas atuam modificando glicoproteínas presentes na membrana espermática (SRIVASTAVA & 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 uma das proteínas associadas à fertilidade presentes no plasma seminal de touros (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997; MOURA et al., 2006a, 2008). 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., 1995; 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 cito-esqueleto e modulação imunológica (DENHARDT et al., 1995, 2001; MAZZALI et al., 2002; DENHARDT, 2004). É uma proteína acídica, rica em ácidos aspártico e glutâmico (SORENSEN; PETERSEN, 1994), isolada inicialmente de tecido ósseo bovino (FRANZEN & HEINEGARD, 1985). No trato reprodutivo masculino, essa proteína é expressa nas células epiteliais das ampolas e glândulas vesiculares, em espermátides alongadas nos testículos, além do epidídimo e em espermatozóides epididimários (SIITERI et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 2000). Foi demonstrado, que a OPN também se liga à membrana de espermatozóides bovinos ejaculados (ERIKSON; KILLIAN, 2004). 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). Estruturalmente, a OPN apresenta uma seqüência RGD (arginina-glicina-aspartato) conservada, a qual apresenta capacidade de ligação a integrinas (BUTLER, 1995; GONÇALVES et al., 2007). Dado que integrinas já foram detectadas na membrana

espermática (REDDY et al., 2003), elas constituem o sítio de ligação para a OPN nos espermatozóides (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 ligue 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 (GABLER et al., 2003) e é possível que moléculas de OPN presentes nesse fluido também se liguem à membrana espermática. Contudo, a osteopontina também se liga ao receptor CD44, através de um domínio distinto da seqüência RGD, também envolvido na interação intercelular (WEBER et al., 1996). Este receptor está presente tanto na membrana espermática (BAINS et al., 2002) quanto na oocitária (SCHOENFELDER; EINSPANIER, 2003), e também está envolvida na adesão celular (CICHY; PURÉ, 2003). Trabalhos recentes com fertilização *in vitro* em bovinos trazem evidências que apóiam 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). A incubação de oócitos bovinos em fluido do oviduto/folicular adicionado de anticorpos contra a isoforma de 36 kDa da OPN isolada do leite reduz significativamente a capacidade dos espermatozóides de se ligarem à zona pelúcida, em comparação com o meio sem os anticorpos (GONÇALVES et al., 2003, 2008). É provável que, além de atuar no processo de interação de gametas durante a fertilização, a OPN desencadeia cascatas de sinalização intracelulares que favorecem o desenvolvimento embrionário, explicando, pelo menos em parte, sua associação com os índices de fertilidade dos reprodutores.

Uma das proteínas associadas à fertilidade identificadas inicialmente por KILLIAN et al. (1993) foi posteriormente identificada por *western blotting* e sequenciamento N-terminal como sendo a prostaglandina D sintetase (GERENA et al., 1998). Reprodutores pertencentes a centrais de inseminação artificial, geralmente, são animais que apresentam parâmetros seminais de ótima qualidade. No entanto, apesar destes animais apresentarem parâmetros seminais similares, os índices de fertilidade após a I.A apresentavam-se distintos entre esses indivíduos. A prostaglandina D sintetase (PGDS) identificada no plasma seminal de touro foi detectada em maior quantidade no sêmen de animais de alta fertilidade comparados com aqueles de média e baixa fertilidade, utilizados em centrais de inseminação artificial (IA) (KILLIAN et al., 1993). 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 glutatona, e a outra independente desta (URADE et al., 1987). Recentemente, 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). No trato reprodutivo masculino, a PGDS está presente nas células de Sertoli e Leydig, células epiteliais do epidídimo e ampola de vários mamíferos, incluindo carneiro, touro e cavalo (FOUCHÉCOURT et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000a; URADE; HAYAISHI, 2000b). 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 acrossômica (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.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Amostras de sêmen de oito carneiros adultos da raça Santa Inês foram coletadas e o plasma seminal submetido à eletroforese bidimensional. Em seguida, os géis foram revelados, digitalizados e analisados (PDQuest, Bio-Rad Laboratories, Rockville, NY, USA). Os *spots* foram, então, removidos dos géis, digeridos com tripsina e submetidos à 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 NCBI nr e SWISSPROT. Todos os reagentes utilizados foram das marcas Sigma, GE Lifesciences ou Bio-rad, a não ser quando especificados.

3.2. Coleta e processamento do sêmen

Foram utilizados oito carneiros adultos da raça Santa Inês com peso e circunferência escrotal de $58 \pm 1,8$ kg, $34,3 \pm 1,8$ cm, respectivamente, sob condições uniformes de manejo e nutrição, pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sediado na Cidade de Sobral – Ceará. Todos os carneiros eram registrados pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Foram realizadas três coletas de sêmen intercaladas com um dia de repouso utilizando vagina artificial e, após as coletas, as amostras foram imediatamente acondicionadas em banho-maria a (37°C). Uma alíquota de cada amostra foi retirada para análise dos parâmetros seminais (Souza et al., 2010) incluindo vigor, porcentagem de espermatozóides móveis e motilidade progressiva (MAXWELL et al., 1997). A concentração espermática foi determinada usando espectrofotometria, diluindo a amostra de sêmen (1:400) em

solução de formol salina e o número total de espermatozóides ejaculados foi determinado multiplicando a concentração espermática pelo volume ejaculado.

As amostras de sêmen foram centrifugadas a 700g, 4° C, por 10 minutos para separação do plasma e espermatozóides. Dado que os três ejaculados do mesmo animal tiveram parâmetros seminais de motilidade e vigor idênticos, as amostras de plasma seminal do mesmo animal foram agrupadas (*pool*) e acondicionadas em micro-tubos, identificadas, e mantidas a -80°C. No momento da preparação dos mapas, as amostras de plasma seminal foram descongeladas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), e submetidas a uma nova centrifugação a 10.000g, a 4°C, por 60 minutos para a retirada de debris e possíveis espermatozóides ainda existentes. As amostras foram aliqüotadas em volumes de 100 µL, acondicionadas em micro-tubos de 0,6 mL e mantidas a -80°C.

3.3. Quantificação 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, encerrando 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg de albumina sérica bovina (BSA) mL⁻¹. A cada 100 µL padrão, 2,5 mL do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) foram adicionadas, e as leituras de absorvância feitas a 595 nm (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA), após 10 minutos de incubação. A curva de calibração foi, então, estabelecida pelas médias das triplicatas das absorvâncias obtidas, gerando uma equação linear de absorvância versus concentração ($R^2 = 0,9761$) 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 1:80 (v/v), em água milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) 100 µL 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.

3.4. Eletroforese bidimensional

Um volume de plasma seminal (variando de 7,2 a 24,6 μ L, conforme a amostra) contendo 400 μ g de proteínas foi adicionado a uma quantidade de solução de re-hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, Ditioneitol (DTT) 65 mM, anfólitos livres 0,5% (IPG buffer, 3-10), CHAPS 0,5% e azul de bromofenol (traços)) suficiente para 250 μ l (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, USA) por, aproximadamente, 20 horas. A focalização isoelétrica foi conduzida em um equipamento ETTAN™ IPGphorII™ (GE Lifesciences), com a seguinte programação: 200V (200Vh), 500V (1000 Vh), 5000V (10.000 Vh), 10.000V (22.000 VhT), totalizando 33.200 Vh. Após a focalização, as tiras foram incubadas no tampão de equilíbrio, contendo Tris (pH 8,8, 1,5 M) 50 mM, Glicerol 87%, Uréia 6 M, SDS 2%, Azul de Bromofenol (Traços), Água Milli-Q (q.s.p. 50 mL). Numa primeira etapa, as tiras foram mantidas, sob leve agitação, em solução de equilíbrio (3 mL/tira) adicionada de 57,8 mg de DTT, por 15 minutos, sendo, em seguida, incubadas por mais 15 minutos com a solução de equilíbrio contendo 69,3 mg de iodoacetamida. 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), adicionados de marcadores moleculares variando de 14,3 a 97 kDa, 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.

3.5. 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 8.0.1 (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., 2006a; 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., 2006a).

3.6. Digestão das proteínas

As proteínas separadas por eletroforese 2D e marcadas como *spots* no gel master foram submetidas à digestão com tripsina conforme descrito por (MOURA et al., 2006a; ROCHA et al., 2009). Os *spots* selecionados 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.

3.7. 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

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 1×10^{-6} torr em presença de gás atmosférico (ROCHA et al., 2009).

3.8. 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 NCBIInr 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>).

3.9. Análise Estatística

A distribuição da expressão das proteínas do plasma seminal foi descrita (médias e medidas de dispersão) utilizando o programa estatístico Statview (versão 5.0, SAS Institute Inc.2000).

4. RESULTADOS

Os carneiros apresentaram, em média, concentração espermática de $5,7 \pm 0,3 \times 10^9$ espermatozóides/mL e $3,6 \pm 0,4 \times 10^9$ espermatozóides/ejaculado com um volume de $0,625 \pm 0,05$ mL, bem como valores médios de vigor de $4 \pm 0,05$; com $90 \pm 0,2$ % de células móveis e valores de $75 \pm 0,3$ % de motilidade espermática progressiva. Em média, foram detectados $302 \pm 15,9$ spots por gel, de acordo com o pareamento gerado pelo aplicativo PDQuest[®] com base no gel master (Figura 1A), o qual representa uma combinação da todos os spots presentes no gel de referência (Figura 1B), além dos spots adicionados dos outros géis, os quais foram pareados.

Figura 1A

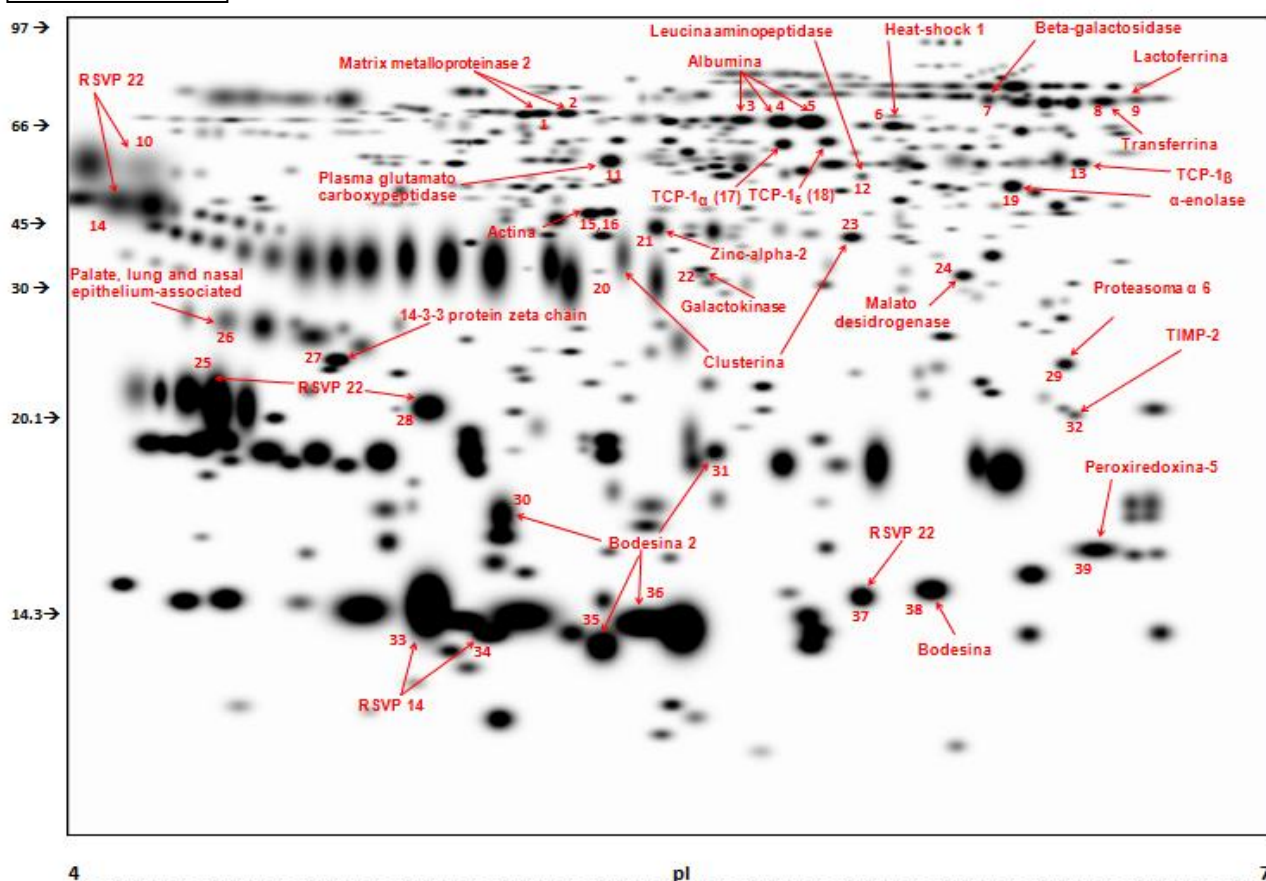


Figura 1B

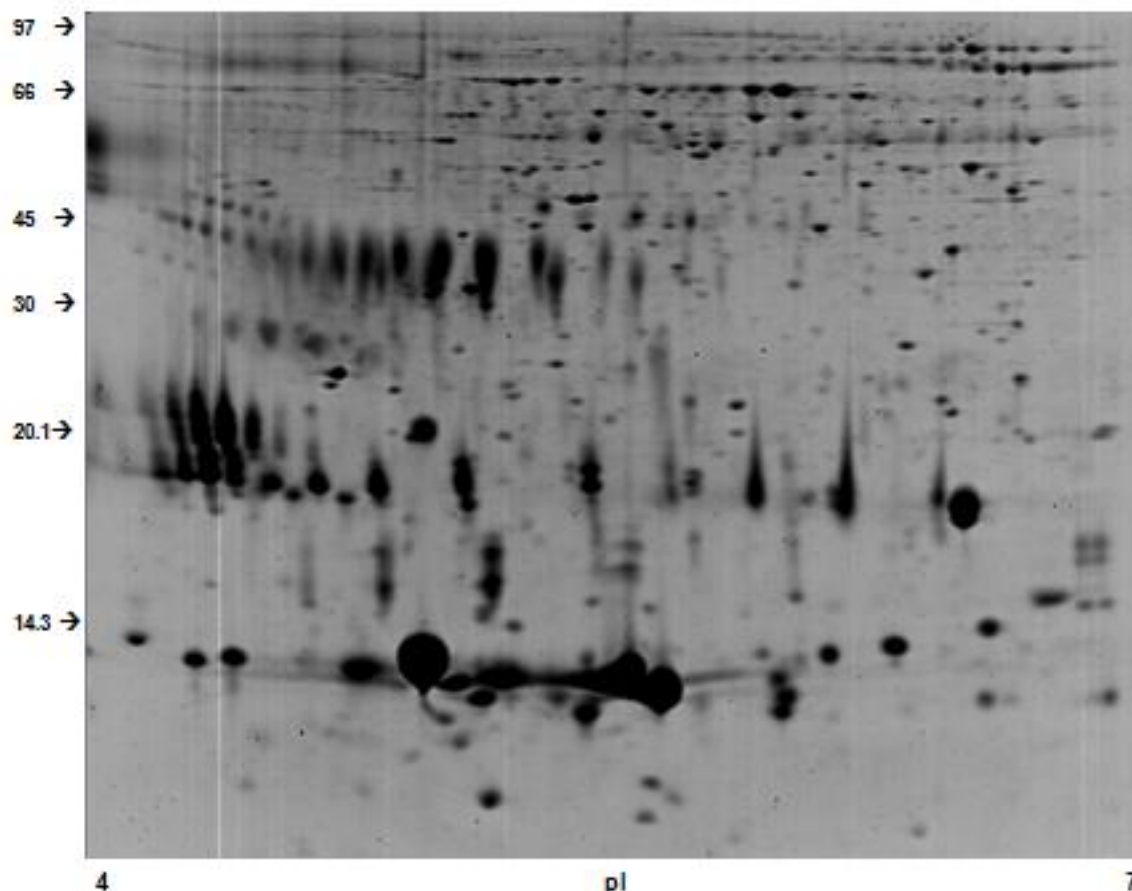


Figura 1. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês adultos. A figura 1A representa o gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado na combinação dos *spots* de todos os membros utilizados no estudo, e a figura 1B, o mapa referência (carneiro #3), do qual o gel sintético foi primeiramente gerado. As proteínas foram coradas com Coomassie blue coloidal e identificadas por MALDI-ToF/ToF.

Um total de 143 *spots* foi detectado de forma consistente em todos os géis pareados pelo aplicativo PDQuest[®]. A intensidade desses *spots* correspondeu a $65,5 \pm 1,5\%$ da intensidade de todos os *spots* descritos no gel principal do plasma seminal dos ovinos. Cento e sete *spots* foram submetidos à espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF), destes, trinta e nove foram identificados e corresponderam a 26 diferentes proteínas (Tabela 1). Em conjunto, estes *spots* representaram $28,7 \pm 0,9\%$ da intensidade de todos os *spots* detectados nos mapas bidimensionais.

As proteínas mais abundantes detectadas nos géis dos carneiros Santa Inês foram as espermadesinas e as *Binder of Sperm Proteins* (BSPs). Dois *spots* (#33 and #34) foram identificados como sendo *Ram Seminal Vesicles Protein* 14 kDa (RSVP 14), que possui ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 5,0 e massa molecular de 15,3 e 16,0 kDa, respectivamente. Outros cinco *spots* (#10, #14, #25, #38 and #37) foram identificados como sendo *Ram Seminal Vesicles Protein* 22 kDa (RSVP 22), com pI variando entre 4,2 a 6,1 e massa molecular entre 16,6 e 61,3 kDa, respectivamente. A intensidade dos *spots* identificados como RSVP 14 e RSVP 22 kDa corresponderam a 11,6 % da intensidade total de todos os *spots* detectados no géis. Outros cinco *spots* mostraram identidade às isoformas da bodesina, os quais incluíram o *spot* #38 (pI 6,3 e 16,3 kDa), identificado como Bodesina – 1 (Bdh-1), e *spots* #30, #31, #35 e #36, identificados como Bodesina – 2 (Bdh-2), com pI e massa molecular variando entre 5,2 e 5,7, 14,7 e 24,4 kDa, respectivamente. A intensidade dos *spots* identificados como espermadesinas representaram 11,1% da intensidade total dos *spots* válidos presentes nos géis do plasma seminal dos carneiros.

Outras proteínas contendo múltiplas isoformas foram detectadas nos mapas 2-D (Figura 1C), entre as quais a *matrix metalloproteinase 2* - MMP-2 (sequência 1), albumina (sequência 2), lactotransferrina (sequência 3), TCP 1_α e TCP 1_ε (sequência 4), RSVP14 (sequência 5) totalizando onze *spots*.

O coeficiente médio de variação (CV) das proteínas identificados por MALDI-ToF/ToF foi de $49,59 \pm 4,7\%$. As proteínas que apresentaram menores CVs foram MMP-2 (19,39%), Bodesina-1 (27,24%), TCP-1 subunidade alfa (27,33%). Os maiores CVs foram associadas à leucina aminopeptidase (64,94 %), galactoquinase (99,97%), *palate, lung and nasal epithelium-associated* – PLUNC (118,66%).

Figura 1C

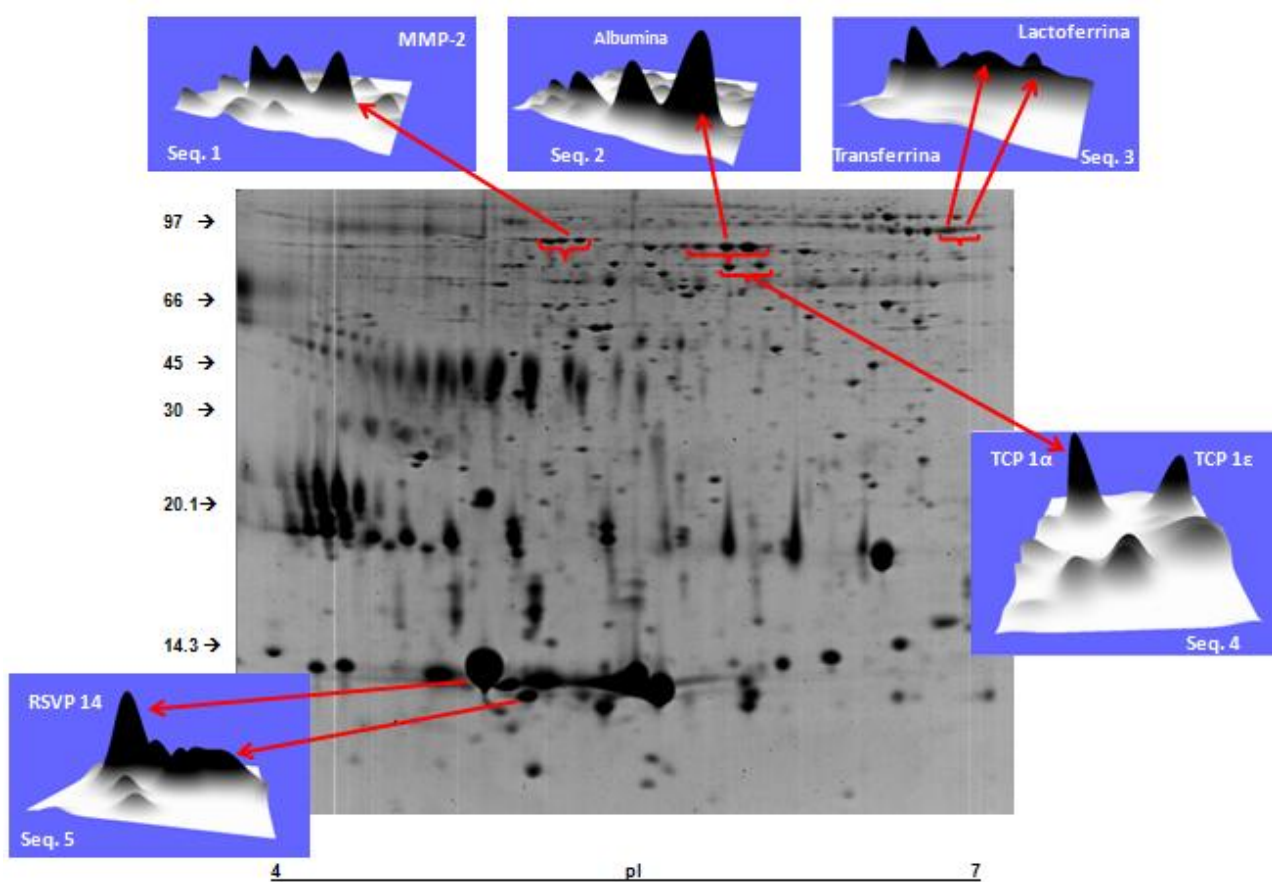


Figura 1C. Mapa bidimensional utilizado como gel referência (carneiro #3) com as principais seqüências de *spots* identificados. As proteínas foram coradas com Coomassie blue e identificadas por MALDI-ToF/ToF.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, grande parte dos ovinos são deslanados, sendo o Santa Inês um dos mais importantes genótipos, por apresentar bom desenvolvimento corporal e ganho de peso e serem adaptados as condições tropicais. Análises de amostras de sêmen demonstram claramente que os animais utilizados neste estudo apresentaram capacidade reprodutiva normal, baseada no número de espermatozóides ejaculados e motilidade espermática, além de possuírem fertilidade comprovada em sistemas de monta controlada. Foram descritos no presente estudo a distribuição e o perfil das proteínas seminais em géis bidimensionais e a identificação de diversas proteínas detectadas nos mapas.

Foram detectados, em media, $302 \pm 15,9$ *spots* nos mapas eletroforéticos do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos. Esse número de *spots* foi similar ao detectado em ovinos Rasa Aragonesa (por volta de 252 *spots*; CARDOZO et al., 2006) e consideravelmente alto comparado aos 21 *spots* reportados por JOBIM et al. (2005), estudando carneiros da raça Hampshire Down e seus mestiços. A razão para tal diferença está provavelmente relacionada com a técnica empregada. Jobim et al. (2005) utilizaram NEPHGE, Coomassie R-250 e 100 μ g de proteína para a preparação dos géis, enquanto que Cardozo et al. (2006), apesar de utilizarem revelação por fluorescência (Sypro Ruby), trabalharam com tiras mais curtas (7 cm) e faixa de pH mais ampla (3-10; 1 unidade de pH/cm), em comparação com a técnica utilizada neste trabalho (13 cm; pI 4-7; 0,2 unidades de pH/cm). Provavelmente, a combinação de tiras mais longas (13 cm) associadas à faixa de pH mais curto (4-7) resultou em uma melhor separação das proteínas, o que favoreceu uma detecção mais eficiente dos *spots*.

Foram detectados consistentemente em todos os géis, 143 *spots*. Estes representam 65 % da intensidade total dos *spots* válidos. Trinta e nove *spots* foram identificados por MALDI-ToF/ToF, correspondendo a 26 diferentes proteínas. Dessa forma, uma discussão sobre as relações entre a função das proteínas do plasma seminal e a fisiologia espermática será dividida por grupo funcional.

5.1. Proteínas envolvidas na proteção espermática

O plasma seminal contém proteínas que intervêm de forma direta ou indireta na proteção dos espermatozóides, uma vez que essa complexa secreção é formada por fluidos dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias. As proteínas transferrina, lactoferrina, albumina e peroxirredoxina 5, identificadas no plasma seminal dos carneiros, estão associadas com a proteção da função e integridade espermática.

A lactoferrina e a transferrina possuem a propriedade de se ligarem ao ferro, e participam como agentes antimicrobianos e na regulação da expressão gênica (GATTI et al., 2004; DACHEUX et al., 2005). Estas proteínas estão associadas com a proteção contra o estresse oxidativo, que é uma fonte potencial de danos aos espermatozóides (HINTON et al., 1995). 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). Por outro lado, a albumina liga-se aos peróxidos de lipídeos reduzindo os efeitos danosos destes compostos na membrana espermática; ALVAREZ; STOREY, 1995).

A peroxirredoxina pertence a uma moderna família de peroxidases. Essa proteína foi isolada da região apical de espermatozóides suínos sendo identificada

como uma proteína que se liga a zona pelúcida nessa espécie (GESTEL et al., 2007). A função biológica dessa proteína ainda não está totalmente clara. No entanto, acredita-se que algumas isoformas, como a detectada no presente estudo, estão envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo, principalmente no que se refere ao controle da concentração de H_2O_2 (RHEE et al., 2001; WOOD et al., 2003).

Um grupo de proteínas classificadas como chaperoninas foram detectadas nos mapas 2D do plasma seminal dos carneiros Santa Inês, correspondendo a heat-shock protein, TCP1 β , TCP1 α e TCP1 ϵ . As chaperoninas contendo o complexo T, são constituídas por oito diferentes subunidades (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ) (ROMMELAERE et al. 1993) e a expressão dessas subunidades é co-regulada, para manter uma constante proporção entre elas (KUBOTA et al. 1999). As subunidades da TCP 1 (α , β e ϵ) fazem parte do grupo II das chaperoninas citosólicas, chamado de CCT - *Chaperonin-Containing* TCP-1 (SARAH et al., 2009). Apesar de ser uma proteína intracelular, a CCT1 ϵ tem sido relatada como componente de espermatozóides ejaculados em humanos e touros (DE MATEO et al., 2007, D'AMOURS et al., 2010). As chaperoninas estão envolvidas no dobramento de proteínas, sem alterar sua conformação final, tendo, dentre outros, como principais substratos a actina e a tubulina (STERNLICHT et al., 1993). Acredita-se que a CCT pode ser produto descartado do processo de espermição. Além disso, altos níveis de subunidade da CCT em amostras de sêmen de touros de baixa fertilidade podem refletir processos incompletos que envolvem essas proteínas durante a espermatogênese (D'AMOURS et al., 2010).

As *Heat Shock Proteins* (HSPs), ou proteínas do choque térmico, são expressas frente ao estresse, principalmente pelo calor. As HSPs constituem uma família de proteínas altamente conservada, sendo um indício de seu grande valor evolutivo (PEETERMANS, 1995). As HSP podem ser agrupadas em HSP-27, HSP-

47, HSP-60, HSP-70, HSP-90 e HSP-110 (JÄÄTTELÄ; WISSING, 1992), de acordo com suas seqüências de aminoácidos e massas moleculares. Um *spot* protéico identificado no plasma seminal dos carneiros, de aproximadamente 70 kDa, apresentou identidade com a HSP-70 de *Bos taurus*. Algumas isoformas da HSP-70 estão envolvidas nos processos espermatogênicos (HUSZAR et al., 2000, BOHRING et al., 2001) e na maturação espermática, influenciando na fertilidade do macho (DIX et al., 1996). A identificação da HSP-70 no plasma seminal de carneiros deslanados ainda não havia sido relatado na literatura, sendo assim, o presente estudo permite a utilização de novas abordagens para o estudo da expressão de proteínas no plasma seminal de ovinos deslanados e suas conseqüências na fisiologia reprodutiva destes animais quando submetidos ao estresse térmico.

Foram identificados dois *spots* referentes à proteína clusterina. Essas isoformas da clusterina podem ser geradas principalmente através de glicosilações (SYLVESTER et al., 1991). A clusterina pode ser expressa constitutivamente nos testículos, epidídimos e próstata (SYLVESTER et al., 1991; SENSIBAR et al, 1993). A expressão da clusterina, nos testículos e epidídimos, é um indicativo de que ocorreu uma completa diferenciação das células germinativas (GRIMA et al, 1992; HERMO et al, 1992), sugerindo que essa proteína possa estar envolvida com o processo de maturação espermática (HERMO et al, 1991), proteção dos espermatozóides (MERI et al., 2001), reabsorção de espermatozóides defeituosos na cauda do epidídimo e modulação da lise celular (AKERLOF et al., 1989, MATSUOKA et al., 2006). A clusterina age como uma chaperona, protegendo os gametas masculinos dos efeitos tóxicos da precipitação de proteínas (WILSON; EASTERBROOK-SMITH, 2000). Essa proteína é um constituinte multifuncional do plasma seminal de bovinos, podendo atuar na prevenção contra danos causados por processos oxidativos no espermatozóide (REYES-MORENO et al., 2002), se liga e

aglutina espermatozóides defeituosos (IBRAHIM et al., 1999), além de possuir a capacidade de inibir a indução da lise por complemento no espermatozóide (IBRAHIM et al., 1999).

Outra proteína detectada no plasma seminal dos carneiros Santa Inês foi a *palate, lung and nasal epithelium-associated clone* (PLUNC). Esta proteína foi identificada, na cavidade oral e no trato respiratório de ratos (WESTON et al., 1999), sendo expressa, também, em humanos (BINGLE; BINGLE, 2000) e bovinos (WHEELER et al., 2002). A PLUNC exibe uma grande similaridade estrutural com famílias de proteínas importantes na defesa contra infecções bacterianas, denominadas de *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI) e *lipopolysaccharide-binding protein* (LBP) (BINGLE; CRAVEN, 2002,). A similaridade estrutural entre a PLUNC e as BPI/LBP, sugere sua participação na defesa antibacteriana no trato respiratório (WHEELER et al., 2002, DI et al., 2003). Dessa forma, é possível que a isoforma de PLUNC detectada no plasma seminal ovino esteja associada com a proteção do epitélio do trato reprodutivo, uma vez que a sua expressão é induzida pela exposição à patógenos (BINGLE; CRAVEN, 2003).

5.2. Proteínas associadas com a motilidade espermática

Proteínas pertencentes a família das espermadesinas foram detectadas no presente estudo, e fazem parte do grupo de proteínas mais abundantes do plasma seminal dos carneiros Santa Inês. Estas proteínas apresentaram identidade com as espermadesinas descritas recentemente na espécie caprina, Bdh-1 e Bdh-2 (MELO et al., 2008). Inicialmente, apenas uma destas espermadesinas foi caracterizada no plasma seminal caprino e denominada de Proteína do Fluido Seminal de Caprinos (*Buck Seminal Fluid Protein*; BSFP; TEIXEIRA et al., 2002; 2006). Posteriormente,

foram identificados 4 genes codificando espermedesinas no trato reprodutivo de caprinos, denominadas Bdh-1 a Bdh-4, sendo que a BSFP passou a ser identificada como Bdh-2 (MELO et al., 2008). A Bdh-2, apresenta também sequência homóloga a outras espermedesinas expressas em diferentes espécies, como as AQN-1 e AWN em suínos (SANZ et al., 1992) e SSP-7 em eqüinos (REINERT et al., 1997).

As Bdh-1 e Bdh-2 detectadas no presente estudo correspondem, respectivamente, a 1,01 e 10,1% da intensidade total dos *spots* válidos. Portanto, a proteína Bdh-2 constitui-se, isoladamente, na mais abundante proteína do plasma seminal dos carneiros Santa Inês adultos. As Bdhs 1 e 2 apresentaram massa molecular com variação de 14,7 a 24,4 e pI de 5,2 a 6,3, semelhantes aos valores das espermedesinas detectadas no fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2006a) e plasma seminal (TEDESCHI et al., 2000) de touros *Bos taurus* adultos. Nos resultados obtidos através de MALDI – ToF/ToF e Mascot Search, identificou-se fragmentos de peptídeos correspondentes a 9% de cobertura da proteína Bdh-1 (*spot* #38), para a proteína Bdh-2 os peptídeos obtidos cobriram 18% (*spots* #30, #31, #36) e 27% (*spot* #35). Os fragmentos associados a todos estes *spots* corresponderam a regiões do domínio CUB das bodesinas (Figura 2A). Especificamente, fragmentos dos *spots* identificados como Bdh2 incluíram similaridades com sequência do “C-terminal”, as quais são distintivas entre as proteínas dessa família. As espermedesinas do plasma seminal de caprinos (Bdh-1 e Bdh-2) possuem 105 resíduos de aminoácidos, dos quais 100 constituem o domínio CUB C1r, Uegf, Bmp1 (*complement, uEGF and bone morphogene*) (MELO et al., 2008). Este domínio é estabilizado por duas pontes dissulfeto (BORK; BECKMAN, 1993) e confere às espermedesinas a habilidade de reconhecer e ligar-se a diversos carboidratos (SOLÍS et al., 1998), inibidores de proteases, fosfolipídeos (DOSTÀLOVÀ et al., 1995) e glicoproteínas presentes na zona pelúcida (TÖPFER-PETERSEN, 1999) através de

ligantes específicos. Proteínas que possuem domínios do tipo CUB, como as espermedesinas, formam heterodímeros, além de sofrerem várias modificações pós traducionais como glicosilação e fosforilação, fato este que provavelmente pode estar relacionado com a variação de peso molecular e ponto isoelétrico dos *spots* detectados nos géis do plasma seminal dos animais Santa Inês.

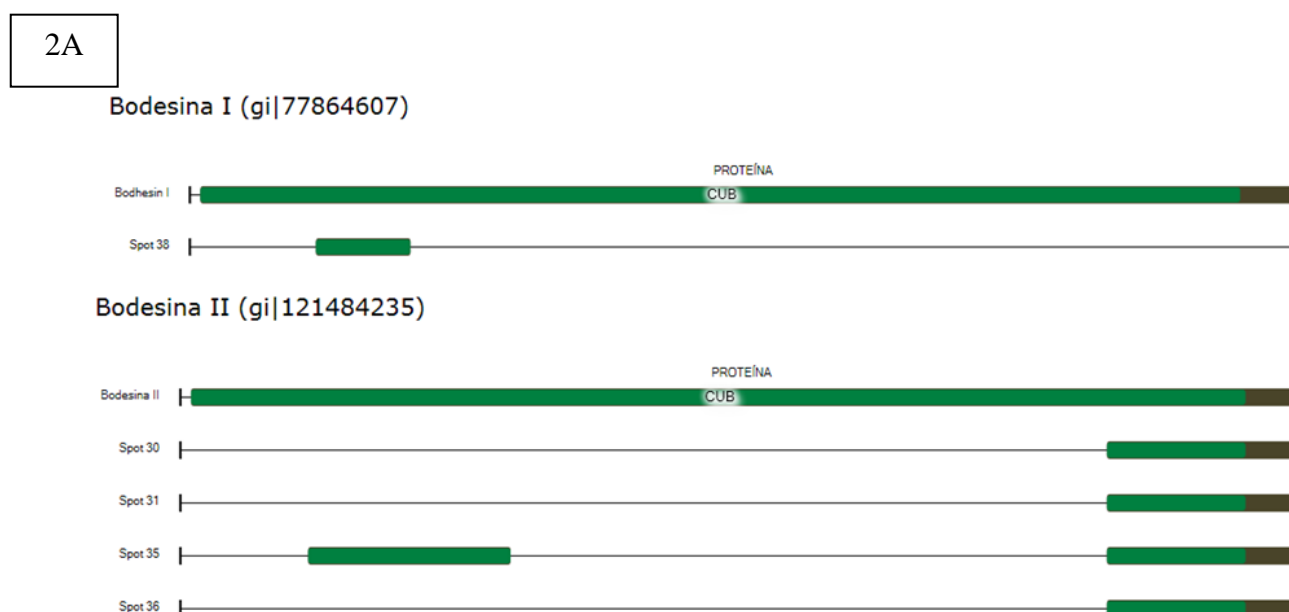


Figura 2A. Representação gráfica da seqüência de peptídeos identificados através da ferramenta *Mascot* (www.matrixscience.com) mostrando a distribuição dos domínios para as proteínas Bdh-I e Bdh-II através do aplicativo Caititu. Os números dos *spots* referem-se àqueles descritos na Figura 1A e na Tabela 1.

Em ovinos Suffolk, os trabalhos conduzidos por Bergeron et al. (2005) mostraram a existência de espermedesina de 15.5 kDa, a *ram seminal protein* (RSP-15.5), com seqüência de aminoácidos homólogos em 70% à espermedesina suína AQN-1. O presente estudo é, portanto, o primeiro a descrever a expressão de espermedesinas no plasma seminal de ovinos deslanados. Nos caprinos, as espermedesinas são expressas de forma mais intensa nas vesículas seminais e com menos expressão em outros órgãos como testículos, epidídimo e glândulas bulbouretrais, com exceção da Bdh-2 não expressa no epidídimo (MELO et al.,

2008). Após a ejaculação, estas proteínas ligam-se a componentes da membrana dos espermatozoides através do domínio CUB (TÖPFER-PETERSEN et al 2005) e, portanto, sugere-se que as espermadesinas são capazes de influenciar diversas funções reprodutivas, incluindo capacitação espermática, estabilização do acrossoma e fusão espermatozóide – oócito durante o processo de fertilização (TÖPFER-PETERSEN et al.,1998).

Estudos conduzidos recentemente em carneiros Santa Inês mostraram que um grupo de *spots* foram expressas no plasma seminal de carneiros Santa Inês já às 15 semanas de idade, ainda na fase pré-púbere, e a intensidade das mesmas apresentou evolução coincidente com as variações dos parâmetros de motilidade espermática (SOUZA et al., 2010). Com base nos valores de massa molecular e pI, sugere-se que tais *spots* possam ser, de fato, os mesmos *spots* identificados no presente estudo como Bdh1 e Bdh2. Baseado nesta informação, sugere-se que as Bdhs 1 e 2 sejam os primeiros componentes a serem secretados no plasma seminal de carneiros Santa Inês pré-púberes.

Outra proteína detectada nos mapas 2D e que pode influenciar a função espermática foi a *zinc-alpha-2-glycoprotein* (ZAG-2). Altas concentrações dessa proteína no sêmen humano foram associadas com a capacidade fertilizante desses indivíduos (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2007). A motilidade espermática é um fator chave que determina a qualidade espermática e capacidade fecundante do espermatozóide (PETRUNKINA et al., 2005). A ZAG atua no metabolismo dos lipídios, influenciando na composição de fosfolípidos e a relação colesterol/fosfolípido durante a maturação espermática no epidídimo (JONES, 1998), além de modular a iniciação da motilidade progressiva a través do sistema adenilato ciclase – AMPc (SCHUH et al., 2006).

A proteína 14-3-3, zeta chain possui uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre espécies (TZIVION; AVRUCH, 2002). É expressa nos testículos (MUSLIN et al., 1996), tendo sido detectada em espermatoócitos em desenvolvimento, e em espermatozóides maduros no epidídimo (CHAPIN et al., 2001). A ação regulatória da proteína 14-3-3 inclui a habilidade induzir alterações no compartimento citoplasmático/nuclear através de mudanças na localização do núcleo celular, além de atuar na inibição ou ativação da atividade catalítica de enzimas através da proteção contra a proteólise ou desfosforilação (TZIVION; AVRUCH, 2002). A 14-3-3 possui um papel fundamental no controle da PP1 γ 2, uma enzima chave para o desenvolvimento da motilidade espermática (SMITH et al., 1999). A alta atividade catalítica dessa enzima espermática inclui o controle da motilidade no espermatozóide imaturo da cabeça do epidídimo, uma vez que inibidores de fosfatases iniciam a motilidade espermática nessa região e estimulam a motilidade espermática na cauda deste órgão (SMITH et al., 1999). Uma possibilidade é que a 14-3-3 atue no espermatozóide como uma ponte ou um adaptador entre a PP1 γ e outras proteínas envolvidas na regulação da maturação e motilidade espermática evitando a degradação ou desfosforilação da enzima PP1 γ 2. A 14-3-3 está localizada na região posterior da cabeça do espermatozóide, atuando na proteção e manutenção da PP1 γ 2 fosforilada (HUANG et al., 2004). Dessa forma, a 14-3-3 mantém em baixos níveis a atividade catalítica desta enzima, passo importante requerido para a maturação e inicialização da motilidade espermática durante o transito epididimário (HUANG et al., 2004).

5.3. Proteínas envolvidas no processo de capacitação espermática

O estudo proteômico do plasma seminal de carneiros adultos da raça Santa Inês mostrou a expressão de duas proteínas, conhecidas como *Ram Seminal Vesicles Protein* (RSVP) 14 e 22 kDa. As RSVPs são proteínas pertencentes à família das BSPs (*Binder of Sperm Proteins*) (BERGERON et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; MANJUNATH et al., 2009). As BSPs e seus homólogos constituem um grupo de proteínas conservadas e estruturalmente similares que possuem dois domínios de fibronectina tipo II (MANJUNATH et al., 2009). Estas proteínas possuem uma estrutura secundária comum composta de um N-terminal variável seguido dos domínios (FN II) de aproximadamente 40 aminoácidos que são separados por uma sequência de sete aminoácidos e por um C-terminal também variável (MANJUNATH et al., 2009). As proteínas que apresentam este domínio ligam-se aos espermatozoides através da interação com a fosforilcolina presente na membrana espermática (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992, 1993). Altas concentrações dessas proteínas induzem a permeabilização da membrana espermática (GASSET et al., 2000), o que estimula o efluxo de colesterol (THERIEN et al., 1998, MOREAU; MANJUNATH 1999).

As RSVPs estão entre as proteínas mais abundantes no plasma seminal dos carneiros representando, respectivamente, 6,6 e 5,0% da intensidade total dos *spots* detectados. A sequência peptídica coberta pela espectrometria de massas apresentou-se inserida nos domínios de Fibronectina II (RSVP14) ou pelo menos em um dos domínios (RSVP22) (Figura 2B). A RSVP 14 é secretada exclusivamente pelas vesículas seminais do carneiro (FERNANDEZ-JUAN et al., 2006) e foi inicialmente descrita no plasma seminal de carneiros Rasa Aragonesa por Cardozo et al. (2006). Esta proteína tem valor de pI, massa molecular e sequência de aminoácidos quase idêntica a uma proteína de 15-kDa descrita por Bergeron et al. (2005) no plasma

seminal de carneiros da raça Suffolk. Sabendo que a proteína RSVP 14 é fosforilada (BARRIOS et al., 2005), diferenças no ponto isoelétrico dos *spots* #33 e #34 podem ser causados por diferentes níveis de fosforilação. Estudo prévio realizado com o plasma seminal de carneiros Santa Inês mostrou que um grupo de “*spots*” de aproximadamente de 14 kDa e pI variando entre 5 a 6 já era expresso às 15 semanas de idade, 13 semanas antes dos animais atingirem a puberdade e quando o número de espermatozóides móveis ainda mínimo no ejaculado (SOUZA et al., 2010). Assim, acredita-se que a RSVP 14 faça parte dos primeiros componentes secretados no plasma seminal de carneiros Santa Inês pré-púberes.

A RSVP-22, outro membro da superfamília das BSPs, é também secretada pelas vesículas seminais (CARDOZO, J.A., resultados não publicados; NCBI gi|219521812; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/219521812>), foi identificada em cinco *spots* no mapa 2-D do plasma seminal dos carneiros. *Spots* correspondentes à RSVP 22 apresentaram uma distribuição heterogênea no mapa protéico do plasma seminal dos carneiros, com massa molecular de 16,6 e 61,3 kDa e pIs de 4,2 a 6,1. Esta distribuição heterogênea pode estar relacionada com modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação (BARRIOS et al., 2005) ou glicosilação (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). No entanto, variações amplas de massa molecular provavelmente estão mais associadas a clivagem proteolítica ou interação com outras proteínas (SEO; LEE, 2004), embora não haja estudos sobre tais processos em proteínas BSP secretadas no plasma seminal de ruminantes. Em caprinos, homólogos às BSPs também tem sido identificados, com variações expressivas com relação à distribuição nos mapas eletroforéticos. La Falci et al. (2002) relataram proteínas com afinidade a heparina de 73 a 104 kDa e de 119 a 178 kDa. Portanto, o fato do presente estudo relatar proteínas do tipo RSVP 22 com massas variando entre 61,3 a

16,6 kDa está de acordo com estudos prévios realizados com o plasma seminal de caprinos adultos.

2B

RSVP14 (gi|219521810)



RSVP22 (gi|219521812)

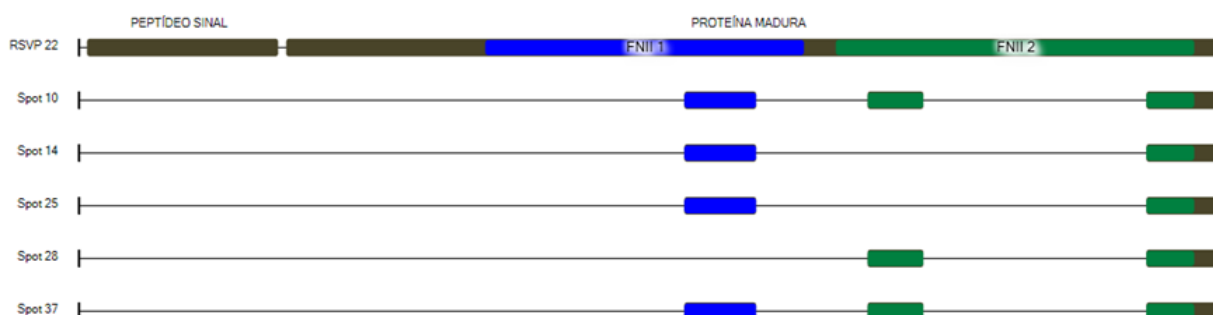


Figura 2B. Representação gráfica da seqüência de peptídeos identificados através da ferramenta *Mascot* (www.matrixscience.com) mostrando a distribuição dos domínios para as proteínas RSVP 14 e 22 através do aplicativo Caititu. Os números dos *spots* referem-se àqueles descritos na Figura 1A e na Tabela 1

As RSVPs atuam na função de proteção dos espermatozoides, prevenindo (PÉREZ-PÉ et al., 2001) e reparando (BARRIOS et al., 2000) danos na membrana espermática sofridos durante a criopreservação. Homólogos destas proteínas (MANJUNATH et al., 2009) tem sido identificados nos fluidos do trato reprodutivo de touros (MANJUNATH et al., 1987; MOURA et al., 2007a), eqüinos, suínos (CALVETE et al., 1997) e caprinos (VILLEMURE et al., 2003). As BSPs influenciam a capacitação espermática por se ligarem aos espermatozoides no momento da ejaculação, interagindo com fosfolipídios contendo resíduos de colina, abundantes na membrana espermática (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992), promovendo a remoção de fosfolipídios (THÉRIEN et al., 1999) e colesterol

(MOREAU; MANJUNATH, 2000), o que resulta numa redução na proporção entre colesterol/fosfolipídeos, compreendendo um dos passos iniciais da capacitação espermática. Em função da similaridade estrutural e funcional existente com as BSPs das espécies descritas acima, as RSVPs podem também ter papel importante durante o processo de capacitação. De fato, há evidências de que a topografia da ligação destas proteínas com os espermatozoides modifica-se conforme alterações funcionais pós-ejaculação e estado de capacitação, sugerindo tal função (CARDOZO et al., 2006). No entanto, estudos mais detalhados são necessários para confirmar que as RSVPs promovem capacitação espermática em carneiros e em outras espécies.

Outra proteína detectada no plasma seminal dos carneiros Santa Inês foi a actina, uma proteína predominantemente intracitoplasmática. A presença de dois *spots* protéicos no plasma seminal dos carneiros com homologia à actina não era esperada, Porém é possível que a actina presente no plasma seminal tenha sido resultado do extravasamento citoplasmático de células espermáticas defeituosas (apoptose). No entanto, a actina está envolvida com a iniciação da motilidade espermática (HOWES et al., 2001; BREITBART et al.,2005), mudanças na topografia espermática durante o transito epididimário no processo de maturação (BREITBART et al., 2005), capacitação e reação acrossômica (YIN; STOSSEL 1979; CABELLO-AGUEROS et al., 2003; BREITBART et al.,2005). A actina pode, ainda, constituir uma barreira preventiva contra a reação acrossômica prematura dos espermatozoides durante a fase de armazenamento na cauda do epidídimo (BREITBART et al., 2005).

5.4. Enzimas glicolíticas

As enzimas glicolíticas detectadas no plasma seminal dos carneiros Santa Inês incluem alfa-enolase, e β -galactosidase. Estas enzimas podem hidrolisar resíduos de

carboidratos presente na membrana fosfolipídica do espermatozóide durante a maturação epididimária (TULSIANI et al., 1995 e 1998) e podem mediar a interação espermatozóide/oócito (MIRANDA et al., 1997). Essas enzimas glicolíticas, podem atuar na produção de substratos energéticos para o metabolismo espermático (BROOKS, 1976), disponibilizando frutose e sorbitol (MURDOCH; WHITE, 1968). Recentemente, novas funções têm sido atribuídas a essas proteínas, tanto na modificação de glicoproteínas ligadas à membrana espermática no processo de maturação epididimal (SKUDLAREK et al., 1992; TULSIANI et al., 1995, 1998), quanto na mediação das interações entre espermatozóide e zona pelúcida/oócito (DE CERESO et al., 1996; ABASCAL et al., 1998).

A enolase é uma enzima que participa na degradação de glicose em piruvato, catalisando a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. Foram descritas duas isoformas da enzima, uma delas, a enolase- $\alpha\alpha$ (ENO- $\alpha\alpha$) é amplamente distribuída em diversos tecidos (TAKASHIMA et al., 2005; KANEMOTO et al., 2006). Outra, a enolase-S (ENO-S) é especificamente ligada ao espermatozóide (EDWARDS; GROOTEGOED, 1983). A atividade destas enzimas no espermatozóide parece estar relacionada à qualidade seminal. Em humanos, uma maior atividade de ENO- $\alpha\alpha$ está associado a espermatozóides com anormalidades morfológicas, enquanto a atividade da ENO-S estava correlacionada com células morfolologicamente normais (FORCE et al., 2002). A enolase espermática parece ser sintetizada durante a espermatogênese, localizando-se no flagelo, próxima ao sistema motor (GITLITS et al., 2000), região de alto consumo de ATP, o que sugere a participação desta proteína na manutenção do metabolismo espermático.

A β -galactosidase é uma glicosidase que cliva resíduos galactosil de diversos tipos de substrato (CONZELMANN; SANDHOFF, 1987). No pH predominante no epidídimo (6,6 a 6,8), essa enzima atua principalmente sobre resíduos galactosil de

glicoproteínas (SKUDLAREK et al., 1992). Duas formas diferentes de β -galactosidase foram observadas no epidídimo. Em ratos, uma isoforma, de cerca de 80 kDa é encontrada no interior do acrossomo (SKUDLAREK et al., 1993), e que, provavelmente, está envolvida na clivagem de carboidratos da zona pelúcida, após a reação acrossômica. Outra forma, de 84 kDa é encontrada no fluido da cauda do epidídimo (TULSIANI et al., 1995). Esta última, secretada pelo próprio epidídimo, parece estar envolvida, como outras glicosidases (TULSIANI et al., 1993), na clivagem de glicoproteínas da membrana espermática, como parte do processo de maturação epididimária (SRIVASTAVA; OLSON, 1991).

O espermatozóide de mamíferos para adquirir capacidade fecundante, necessita passar por diversas modificações estruturais e funcionais incluindo a capacitação espermática, hiperativação ou excitose, reação acrossômica e outras modificações bioquímicas afins de que haja a penetração no oócito (YANAGIMACHI, 1994). Espermatozoides pré-incubados com substâncias oxidativas exógenas se torna incapaz de fertilizar o oócito (FRASER; QUINN, 1976). Em espermatozoides de ratos, a reação acrossômica propriamente dita é fisiologicamente dependente do metabolismo oxidativo (BEDFORD, 1970). O ciclo do ácido cítrico é um caminho metabólico oxidativo regulado por enzimas, entre elas a citrato sintase, isocitrato desidrogenase e a alfacetoglutarato desidrogenase (CLARENBURG, 1992). A malato desidrogenase (MDH) é outra enzima do ciclo, apesar de não participar da regulação, possui um papel chave no transporte de redutores equivalentes através da membrana mitocondrial interna (CLARENBURG, 1992). A MDH está localizada no citoplasma e através da rota das pentoses fosfato, é a principal fonte de redutor celular NADP (CLARENBURG, 1992) e tem sido detectada no fluido da rede testes em suínos e carneiros (SUOMINEN & SETCHELL, 1972), no fluido do epidídimo em humanos (DACHEUX et al., 2006) e na peça intermediária de espermatozoides de

caprinos, suínos e búfalos (KOHSAKAT et al., 1992). A transferência de equivalentes redutores do citoplasma para a mitocôndria ocorre principalmente pela lançadeira malato-aspartato, uma vez que há uma ausência de atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase em espermatozóides epididimários e uma reduzida atividade em espermatozóides imaturos de ratos (BROOKS, 1978).

5.1.5. Proteases e inibidores

As proteases encontradas nos mapas 2D dos carneiros incluem plasma glutamato carboxipeptidase e leucina aminopeptidase. Durante o transito epididimário, o espermatozóide absorve novas proteínas modificando a sua membrana (SULLIVAN, et al., 2005). Estas proteinases possuem atividade no plasma seminal e tem sido associada com diferentes parâmetros seminais (TOGO; MORISAWA, 2004). Estas enzimas podem modificar resíduos de peptídeos presentes na membrana espermática e, dessa forma, contribuir com a maturação espermática durante o transito epididimário, além de estarem também presentes na região acrossômica do espermatozóide e podem estar envolvidas na reação acrossômica (AGRAWAL; VANHA-PERTTULA, 1986).

A interação e a remodelação da matriz extracelular são atributos de algumas proteínas identificadas no plasma seminal dos carneiros, sendo elas a *tissue inhibitor of metalloproteinases - 2* (TIMP-2), *matrix metalloproteinase - 2* (MMP-2) e a clusterina. Esse grupo de proteínas secretadas nas glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2006a) são importantes durante a fertilização em mamíferos quando o espermatozóide interage com as células do *cumulus*, zona pelúcida e membrana do oócito. As MMPs liberadas durante a reação acrossômica facilita a fusão entre o espermatozóide e o oócito em hamsters (DÍAZ-PEREZ; MEIZEL, 1992). A TIMP-2 está associada com a membrana espermática de bovinos e humanos (McCAULEY et

al., 2001; BECHMAN-SHAKED et al., 2002) podendo interferir na fusão entre gametas em ratos (CORREA et al., 2000).

O complexo protéico Proteassoma – 6, foi detectado nos mapas 2D dos carneiros Santa Inês. Este complexo protéico faz parte de um grupo de proteases multi-catalíticas pertencente ao proteassoma que degrada proteínas poliubiquitinadas em aminoácidos e pequenos peptídeos (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Proteassoma-6 foi detectada em espermatozóides de touros de baixa fertilidade (D'AMOURS et al 2010). A atividade do proteassoma tem sido detectada em espermatozóides de mamíferos, incluindo bovinos e humanos (PIZARRO et al., 2004), sua localização foi determinada, através de ensaios de imunofluorescência, na região acrossômica de todas as espécies estudadas (RAWE et al. 2008). Dessa forma, vários estudos reportam a participação do proteassoma nos eventos relacionados com a reação acrossômica (MORALES et al. 2003, SUTOVSKY et al. 2004, RAWÉ et al. 2008). Proteassomas também tem sido detectado na peça intermediária entre a cabeça e a cauda de espermatozóides bovinos e humanos (WOJCIK et al. 2000, RAWÉ et al. 2008). Dessa forma, foi sugerido que o proteassoma pode desempenhar diferentes papéis pós fertilização separando parte da cauda do espermatozóide, formação da haste espermática, e desenvolvimento e justaposição pronuclear (RAWÉ et al. 2008). Análises proteômica de espermatozóides em humanos utilizando gel de eletroforese 2D, revelou várias subunidades de proteassoma, incluindo o PSMA-6 (DE MATEO et al. 2007). Este mesmo estudo, associou altos níveis de expressão do PSMA-6 com fragmentação do DNA, observado pelo método *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling* (TUNEL). Para explicar esta observação posterior, uma alta correlação entre defeitos no DNA e ubiquitinação espermática em touros (SUTOVSKY et al. 2002), o que estar de acordo com a atividade catalítica do proteassoma em relação com proteínas ubiquitinadas e poderia

explicar a correlação negativa entre a porcentagem de espermatozóides viáveis e alta expressão da PSMA-6. Com relação aos carneiros Santa Inês, este é o primeiro estudo a relatar a presença da PSMA-6 no plasma seminal. Apesar de estar presente em todos os membros do gel master, a PSMA-6 representou apenas 0,14% do total das intensidades dos *spots* identificados.

5.6. Outras proteínas

Outra proteína encontrada nos mapas protéicos do plasma seminal foi a galactoquinase. Esta enzima utiliza a galactose como substrato, produzindo galactose-1-fosfato (DAVIT-SPRAUL et al., 1994). Apesar de sua função específica nos fluidos do trato reprodutivo não ser conhecida, outras enzimas que utilizam a galactose como fonte ou produto de fosforilação já foram descritas no fluido da cauda do epidídimo de diversas espécies (TANG, 1998). Suas funções ainda não estão bem esclarecidas, mas é possível que elas estejam envolvidas na modificação de glicoproteínas da membrana espermática, como parte do processo de maturação epididimária (JONES, 1989; TANG, 1998).

6. CONCLUSÕES

Utilizando uma abordagem proteômica foi possível a identificação de diversas proteínas presentes no plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês. A identidade destas proteínas sugere que as mesmas desempenham diversas funções, incluindo a modulação do metabolismo espermático, alterações nas propriedades bioquímicas e estruturais da membrana, proteção dos espermatozóides e interação entre gametas.

Este é o primeiro estudo a identificar proteínas do plasma seminal em carneiros da raça Santa Inês, ou em qualquer outra raça de ovinos deslanados, animais estes caracterizados pela capacidade de adaptação ao clima tropical. As proteínas mais abundantes no plasma seminal pertencem às famílias das BSPs e espermedesinas. Em função dos atributos bioquímicos destes componentes, sugere-se que, em ovinos, estes dois grupos de proteínas exerçam papéis importantes na fisiologia reprodutiva, participando da capacitação espermática, formação do reservatório espermático no oviduto e interação espermatozóide-oócito.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, I. et al. Alteration of the isoform composition of plasma-membrane-associated rat sperm α -L-fucosidase during late epididymal maturation: comparative characterization of the acidic and neutral isoforms. **The Biochemical Journal**, London, v. 333, p. 201-207, 1998.

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.

AGRAWAL, Y.; VANHA-PERTTULA, T. Dipeptidyl peptidases in bovine reproductive organs and secretions. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.9, 435-452, 1986.

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.

AKERLÖF, E. et al. Serum factors stimulate the motility of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.12, 124-130, 1989.

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, 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. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 2, p. 37-58, 1981.

AMANN, R.P.; CRISTINELLI, M.J.; SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. Equine Reproduction IV. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, p.113-120 (Suppl. 35), 1987.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.14, p.397-406, 1993.

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'Université 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.

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.

BAINS, R. et al. Human sperm cells express CD44. **Fertility and Sterility**, Amsterdam, v. 78, p. 307-312, 2002.

BAKER, M.A. et al. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, Berlin, v. 5, p. 1003-1012, 2005.

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.

BARRIOS B. et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, 588–595, 2005.

BARRIOS, B. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v.63, p.1531-1537, 2000.

BECHMAN-SHAKED, O. et al. Presence of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human sperm. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.23, 702–708, 2002.

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

BELLIN, M.E. et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.76, p.2032-2039, 1998.

BENOFF, S. et al. Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. **Human Reproduction**, Oxford, v.8, p.2141-2154, 1993.

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.

BINGLE, C.D.; CRAVEN , C.J. Comparative an alysis of the PLUNC (palate,lung and nasal epithelium clone) protein families. **Biochemical Society Transactions**, Norwich, v.31, part 4, 2003.

BINGLE, C.D, CRAVEN, C.J. PLUNC: Anovel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.11, 937–943, 2002.

BOHRING, C. et al. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.7, 113–118, 2001.

BORK, P; BECKMANN, G. The CUB domain. Awidespread module and developmentally regulated proteins. **Journal of Molecular Biology**, 231, 539–545, 1993..

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Anal Biochem**, v.72, 248–254, 1976.

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.

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

BRATANOV, K. et al. Effect of kallikrein on the motility of bull and ram spermatozoa after deep freezing. **Comptes Rendus de L'academie Bulgare des Sciencesv**, Sofia, v.31, p.1337-1338, 1978b.

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.

BREITBART, H., COHEN, G., RUBINSTEIN, S., Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, Bristol, v.129, 263-268, 2005.

BROOKS, D.E.. Activity and androgenic control of enzymes associated with the tricarboxylic acid cycle, lipids oxidation and mitochondrial shuttles in epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. **European Journal of Endocrinology**, v.138: 322–327, 1978.

BUDWORTH, P.R., AMANN, R.P., CHAPMAN, P.L. Relationships between computerized measurements of frozen and thawed bull spermatozoa and fertility. **International Journal of Andrology**, Schaumburg, v.9, p.41-54, 1988.

BUTLER, W.T. Structural and functional domains of osteopontin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 760, p. 6-11, 1995.

CABELLO-AGUEROS, J.F., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E.O., MÚJICA, A. The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 6, p.94-108, 2003.

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.

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.

CANDIANO G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.25, p.1327–1333, 2004.

CARDOZO, J.A. et al. Identification of rsvp14 and rsvp20 components by two-dimensional electrophoresis and western-blotting. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, in press, 2006.

CARVALHO, P.C. et al. Caititu: Atool to graphically represent peptide sequence coverage and domain distribution. **Journal of Proteomics**, Amsterdam v.71, 486 – 489, 2008.

CHANDONNET, L. et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 26, p. 313-318, 1990.

CHAPIN, R.E. et al. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. **International Journal of Andrology**, Schaumburg; v.22, 1030–1052, 2001.

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.

CICHY, J.; PURÉ, E. The liberation of CD44. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 161, p. 839-843, 2003

CLARENBURG, R. Enzymes. In: **Physiological Chemistry of Domestic Animals**. Mosby-Year book Inc., Saint Louis, pp. 63–78, 1992.

CONZELMANN, E.; SANDHOFF, K. Glycolipid and glycoprotein degradation. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, Malden, v. 60, p. 89-216, 1987.

COOPER, T.G.; WAITES, G.M.; NIESCHLAG, E. The epididymis and male fertility: a symposium report. **International Journal of Andrology**, Malden, v. 9, p. 81-90, 1986.

CORREA, J.R., PACE, M.M., ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, Amsterdam, v.48, p.721-731, 1997.

CORREA, L.M., CHO, C., MYLES, D.G., PRIMAKOFF, P. A role of TIMP-3-sensitive, Zn²⁺-dependent metalloprotease in mammalian gamete membrane fusion. **Developmental Biology**, Amsterdam, v.225, p.124–134, 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. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 250, p. 36-42, 2006.

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.

D'AMOURS, O. et al. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction**, Bristol. v.139, p.545-56, 2010.

DE CEREZO, J.M. et al. Fucosylated glycoconjugates of the human spermatozoon. Comparison of the domains of these glycoconjugates with alpha-fucosyl binding sites, and with lactosaminic glycoconjugates and beta-D-galactosyl binding site domains. **Bio cell**, Mendoza, v.20, p.11-20, 1996.

DE KRETZER, D.M.; KERR, J.B. The cytology of the testis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (eds.) **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, p. 1177-1290, 1994.

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 MATEO S. et al. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. **Proteomics**, Berlin, v.7, p.4264-4277, 2007.

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.

DESNOYERS L, MANJUNATH P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.267, p.10149-10155, 1992.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel

electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.37, p.425-435, 1994.

DIAMANDIS, E.P. et al. Seminal plasma biochemical markers and their associations with semen analysis findings. **Urology**, Amsterdam v. 53, p. 596-603, 1999.

DÍAZ-PEREZ, E.; MEIZEL, S. Importance of mammalian endoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.31, p.122–130, 1992.

DIX, D.J. et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington-DC. USA v.93, p.3264–3268, 1996.

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.

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.

EVANS, G. & MAXWELL, W.M.A. **Salamon's artificial insemination of sheep of goats**. Sydney, Butterworths, 1987. 194 p.

FERNÁNDEZ-JUAN, M. et al. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p.721–732, 2006.

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.

FLORMAN, H.M.; WASSARMAN, P.M. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. **Cell**, Orlando, v. 41, p. 313-324, 1985.

FORCE, A. et al. Enolase isoforms activities in spermatozoa from men with normospermia and abnormospermia. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 23, p. 202-210, 2002.

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

FRANZEN, A., HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. **The Biochemical Journal**, London, v.232, p.715-724, 1985.

FRASER, L.R, QUINN, P.J. A glycolic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.61, p.25–35, 1976.

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.

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.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, p.431–444, 2005.

GARCÍA-RAMÍREZ, M. et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v.50, p.1294–1303, 2007.

GASSET, M; MAGDALENO, L; CALVET, J.J. Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v.374, p.241-247, 2000.

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.

GATTI, J.L. et al. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 321-339, 2004.

GERENA, R.L. et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, Madison, v.58, p.826-833, 1998.

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.

GESTEL, R.A.V. et al. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucid of the oocyte. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.13, No.7 pp. 445–454, 2007.

GILMONT, R.R. et al. Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. **Biology of Reproduction**, Madison, v.43, p.151–157, 1990.

GITLITS, V.M. et al. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. **European Journal of Cell Biology**, Amsterdam, v.79, p.104-111, 2000.

GODFREY R.W. et al. Effect of season and location on semen quality and serum concentrations of luteinizing hormone and testosterone in Brahman and Hereford bulls. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.68, p.734-749, 1990.

GONÇALVES, R.F.; STAROS, A.L.; KILLIAN, G.J. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg

binding, fertilization and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v.43, p.720-729, 2008.

GONÇALVES, R.F.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Effect of osteopontin on in vitro bovine embryo development. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, 36, 2003, Cincinnati. **Proceedings...** Cincinnati, OH: SSR, 2003.

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.

GRIMA, J. et al. Rat Sertoli cell clusterin, alpha 2-macroglobulin, and testins: biosynthesis and differential regulation by germ cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, p.89, p.127-140, 1992.

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. 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.

HENAULT, 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.

HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.108, p.199-204, 1996.

HERMO L, BARIN K, ROBAIRE B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. **The Anatomical Record**, Malden, v.233, p.205-228, 1992.

HERMO, L. et al. Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). **Biology of Reproduction**, Madison, v.44, p.1113-1131, 1991.

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.

HINTON, B.T., PALLADINO, M.A., RUDOLPH, D., LABUS, J.C., The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.7, p.731-745, 1995.

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.

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.

HOWES, E.A., HURST, S.M., JONES, R., Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular

signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.22, p.62-72, 2001.

HUANG Z, VIJAYARAGHAVAN S. Increased phosphorylation of a distinct subcellular pool of protein phosphatase, PP1g2, during epididymal sperm maturation. **Biology of Reproduction**, Madison, v.70, p.439–447, 2004.

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.

HUSZAR, G. et al. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70 kDa heat shock protein HspA2. **Biology of Reproduction**, Madison v.63, p.925–932, 2000.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Senso agropecuário, 2007.

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

JÄÄTTELÄ M, WISSING D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. **The Anatomical Record**, Malden, v.24, p.249-58, 1992.

JANUSKAUSKAS, A. et al. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 53, p. 859-875, 1999.

JENNE, D.E., TSCHOPP, J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity 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.

JOBIM, M.I.M. et al. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 63, p. 2053-2062, 2005.

JONES R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.53, p.73 – 84, 1998.

KANEMOTO, K. et al. Neurone-specific enolase and liver metastasis in small cell lung cancer. **Clinical Oncology**, Amsterdam, v. 18, p. 505, 2006.

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.

KOHSAKAT, T. et al. A new technique for the precise location of lactate and Malate dehydrogenase in goat, boar and water buffalo spermatozoa using gel incubation film. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.95, p.201–209, 1992.

KOUNNAS, M.Z. *et al.* Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, p.13070-13075, 1995.

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.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v.65, p.33-46, 2005.

KUBOTA, H.; YOKOTA, S, YANAGI, H, YURA T. Structures and co-regulated expression of the genes encoding mouse cytosolic chaperonin CCT subunits. **European Journal of Biochemistry**, Malden, v.262, p.492-500, 1999.

LA FALCI, V.S.N. et al. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, Amsterdam v.57, p.1035-1048, 2002.

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.; 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.

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.

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

MATOS, C.A.P. et al. Genetic analyses of scrotal circumference size and growth in Rambouillet lambs. **Journal of Animal Science**, v.70, p.43-50, 1992

MATSUOKA, T.; IMAI, H.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, Nagoya, v. 52, n. 5, p.675-683, 2006.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.8, p.1165–1178, 1997.

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

MCCAULEY, T.C.; ZHANG, H.M.; BELLIN, M.E.; AX, R.L. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of

metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.58, p.336–34, 2001.

MELO, L. M. et al. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Molecular Reproduction and Development**, Malden. v.75, p.8-16, 2008.

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.

MIRANDA, P.V. et al. Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.3, p.399-404, 1997.

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.

MORALES, P. et al. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v.18, p.1010-1017, 2003.

MOREAU, R. et al. Type II domains of BSP-A1/-A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 246, p. 148-154, 1998.

MOREAU, R., MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1487, p.24-32, 2000.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1438, n.2, p.175-184, 1999.

MORI, E.; MORI, T.; TAKASAKI, S. Binding of mouse sperm to β -galactose residues on egg zona pellucida and asialofetuin-coupled beads. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 238, p. 95-99, 1997.

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

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.74, p.214–222, 2006b.

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. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.

MURDOCH, R.N.; WHITE, I. G. Studies of the metabolism of human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v. 16, p. 351-361, 1968.

MUSLIN, A. J.; TANNER, J. W.; ALLEN, P. M.; SHAW, A. S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. **Cell**, Cambridge v.84, p.889–897, 1996.

NICHI, M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, Amsterdam, v.66, p.822-828, 2006.

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.

OLIVEIRA, A. A. P.; LIMA, V. P. M. S. Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira. In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA TROPICAL BRASILEIRA, 1, 1994, Sobral, **Anais...**, Sobral – CE, EMBRAPA-CNPC, 1994.

ORGBIN-CRIST, M.C. Sperm maturation in rabbit epididymis. **Nature**, London, v. 216, p. 816-818, 1967.

OTT, R. S.; MEMON, M. A. Breeding soundness examinations of rams and bucks. In: Society of Theriogenology sheep and goat manual. **Hastings**, NE: Society for Theriogenology, 1980, v. 10, p. 38.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

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.

PEETERMANS WE. Heat shock proteins in medicine. **Acta Clinica Belgica**, Belgium, v.50, p.131-6, 1995.

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.

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.

PETRUNKINA, A. M. et al. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v.64, p.1766-82, 2005.

PIZARRO, E. et al. Proteasomal activity in mammalian spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.69, p.87-93, 2004.

POPWELL, J. M.; FLOWERS, W. L. Viability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.81, p.97-113, 2004.

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.

RAWE, V. Y. et al. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. **Human Reproduction**, Oxford, 23 573-580. 2008

REDDY, V. R. K.; RAJEEV, S.; GUPTA, V. $\alpha 6 \beta 1$ integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. **Fertility and Sterility**, Amsterdam, v. 79, p. 1590-1596, 2003.

REINERT, M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on

spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.29, p.179–186, 1997.

REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Characterization of cauda epididimal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.63, p. 500–509, 2002.

RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life**, Malden, v.52, p.35–41, 2001.

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.

ROCHA, S. L. G. et al. Crotalid Snake Venom Subproteomes Unraveled by the Antiophidic Protein DM43. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.2351–2360, 2009.

RODRIGUES, G. C. **Parâmetros testiculares, seminais e endocrinológicos e as correlações com o desenvolvimento ponderal em touros Nelores**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Dissertação de Mestrado, 69p. 2000

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.

ROGERS, B. et al. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.4, p.119–125, 1983.

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.

ROMMELAERE H, VAN TROYS M, GAO Y, MELKI R, COWAN NJ, VANDEKERCKHOVE, J.; AMPE, C. Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t-complex polypeptide 1 and seven related subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington-DC, v.90, p.11975-11979, 1993.

ROSENBORG, M. E.; SILKENSEN, J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. **International Journal Biochemistry and Cell Biology**, London, v.27, p.633-645, 1995.

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.

SARAH, A.; BROADLEY, F. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.583, p.2647–2653, 2009.

SAS Institute Inc. **SAS Introductory Guide for Personal Computers**, Cary, NC. USA: SAS Institute Inc., 2000.

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.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, p. 269-277, 2003.

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.

SCHUH, S. M. et al. Signaling pathways for modulation of mouse sperm motility by adenosine and catecholamine agonists. **Biology of Reproduction**, Madison, v.74, p.492-500, 2006.

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, 1993;49:233-242.

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.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational Modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v.37, p.55-44, 2004.

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.

SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v. 16, p. 464-468, 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.

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.

SKUDLAREK, M. D.; TULSIANI, D. R. P.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Rat epididymal luminal fluid acid β -D-galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. **The Biochemical Journal**, London, v. 286, p. 907-914, 1992.

SKUDLAREK, M. D.; TULSIANI, D. R. P.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Rat epididymal luminal fluid acid β -D- galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. **The Biochemical Journal**, London, v. 286, p. 907-914, 1992.

SMITH, G. D. et al. Motility potential of macaque epididymal sperm: the role of protein phosphatase and glycogen synthase kinase-3 activities. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.20, p47–53, 1999.

SOLÍS, D. et al. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. **FEBS Letters**, Amsterdam, 431, 273–278, 1998.

SORENSEN, E.S.; HOJRUP, P.; PETERSEN, T.E. Posttranslational modifications of bovine

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.

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.; MOURA, A. A.; LIMA, A. C. B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p.196-198, 2001.

SOUZA, C. E. 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 Animal**, Malden, v.45, p.644–653, 2010.

SPROTT, L.R. *et al.* Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.78, p.795-798, 2000.

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

STERNLICHT, H. *et al.* The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington-DC, v.9, p.9422-9426, 1993.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, Amsterdam, v.35, p.1-1, 2005.

SUOMINEN, J.; SETCHELL, B. P. Enzymes and trypsin inhibitor in the rete testis fluid of rams and boars. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.30, p.235-245, 1972.

SUTOVSKY, P.; NEUBER, E.; SCHATTEEN, G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.61, p.406-413, 2002.

SUTOVSKY, P. et al. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, Madison, v.71, p.1625-1637, 2004.

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.

SYLVESTER, S.R. et al. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**, Madison, v.31, p.1087-1101, 1991.

TAKASHIMA, M. et al. Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis. **Proteomics**, Berlin, v. 5, p. 1686-1692, 2005.

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

TEDESCHI, G. et al. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, Malden, v.267, p.6175–6179, 2000.

TEIXEIRA, D. I. A. Isolation and partial characterization of a protein from Buck seminal plasma (*Capra hircus*) homologous to spermadhesins. **Protein and Peptide Letters**, Sharjah, v.9, p.331-335, 2002.

TEIXEIRA, D. I. A. et al. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.5, p.79-87, 2006.

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.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induces cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v.58, p.768-776, 1998.

THÉRIEN, I. et al. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 71, p. 97-106, 2005.

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 52, p. 1372-1379, 1995.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

TOGO, T.; MORISAWA, W.; GPI-anchored aminopeptidase is involved in the acrosome reaction in sperm of the Mussel *mytilusedulis*. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.67, p.465-471, 2004.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v.5, p.314–329, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, Berlin, v.30, p.217–224, 1998.

TOPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.89, p.159–170, 2005.

TULSIANI, D. R. P. et al. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 48, p.41-428, 1993.

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.

TZIVION, G.; AVRUCH, J. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, p.3061–3064, 2002.

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., FUJIMOTO, N., HAYAISHI, O. Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.260, p.12410-12415, 1985.

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.

URADE, Y., HAYAISHI, O. Prostaglandin D synthase: structure and function. **Vitamins and Hormones**, Amsterdam v.58, p.89-120, 2000a.

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.

WATTS, M. J.; DANKER, J. R.; MORGAN, E. P. Characterization of the active site of human multicatalytic proteinase. **The Biochemical Journal**, London, v.265, p.471-477, 1990.

WEBER, G.F. et al. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). **Science**, Washington-DC, v. 271, p. 509-512, 1996.

WESTON, W. M. et al. Differential Display Identification of *plunc*, a Novel Gene Expressed in Embryonic Palate, Nasal Epithelium, and Adult Lung. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.274, p.13698–13703, 1999.

WHEELER, T.T. et al. The BSP30 salivary proteins from cattle, LUNX/PLUNC and von Ebner's minor salivary gland protein are members of the PSP/LBP superfamily of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1579, p.92–100, 2002.

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.

WOJCIK, C. et al. Proteasomes in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Malden, v.23, p.169-177, 2000.

WOOD, Z. A, POOLE, L. B, KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, Washington-DC, v.300, p.650–653, 2003.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization, Chapter 5. In: The physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J. D. (eds). **Raven Press**, Ltd, NewYork, 1994 pp. 189–317.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, Cambridge, v.3, p.371-372, 1994.

YARNEY, T. A, SANFORD, L. M. and PALMER, W. M. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of post-pubertal reproductive function. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, vol. 70, p.139, 1990.

YIN, H. L.; STOSSEL, T. P. Control of cytoplasmic actin gelsol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. **Nature**, London, v. 281, p.583-586, 1979.

.

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

Proteína e spot #	kDa/pI		Proteína ID (gi)	MS/MS score ³	Sequência coberta ⁵	Expect	Matched peptides	Ion score
	Teór. ¹	Exper. ²						
01. Matrix metalloproteinase 2								
<i>Spot 01</i>	73.7/5.4	73.0/5.2	27807447	115	8%	47	(¹²⁹)IIGYTPDLDPQTVDDAFAR; ⁽¹⁴⁷⁾	26
						0.13	(²⁹⁸)FQGTSYDSCCTTEGR; ⁽³¹¹⁾	53
						1e+03	(⁵²¹)IDAVYEDPQEEK; ⁽⁵³²⁾	14
						1.6e+03	(⁵⁸¹)TYIPAGDK ⁽⁵⁸⁸⁾	23
<i>Spot 02</i>	73.7/5.4	72.7/5.3	27807447	57	21%	22	(⁸)IIGYTPDLDPQTVDDAFAR; ⁽²⁶⁾	29
						37	(⁴²)IHDGEADIMINFR ⁽⁵⁵⁾	28
02. Albumina								
<i>Spot 03</i>	69.1/5.8	71.3/6.0	57164373	259	9%	3.3	(¹⁶¹)YLYEVAR; ⁽¹⁶⁷⁾	40
						0.38	(⁴⁰²)HLVDEPQNLIK; ⁽⁴¹²⁾	49
						0.004	(⁴²¹)HGEYGFQNALIVR; ⁽⁴³³⁾	69

						0.0026	⁽⁴³⁷⁾ KAPQVSTPTLVEISR; ⁽⁴⁵¹⁾	67
						6.6	⁽⁵⁶⁹⁾ TVMENFVAFVDK ⁽⁵⁸⁰⁾	37
Spot 04	69.1/5.8	71.6/5.9	57164373	268	11%	1.2	⁽¹⁶¹⁾ YLYEVAR; ⁽¹⁶⁷⁾	44
						1.3e+02	⁽³⁶⁰⁾ RHPEYAVSVLLR; ⁽³⁷¹⁾	19
						5	⁽⁴⁰²⁾ HLVDEPQNLIK; ⁽⁴¹²⁾	36
						0.0014	⁽⁴²¹⁾ HGEYGFQNALIVR; ⁽⁴³³⁾	72
						0.00029	⁽⁴³⁷⁾ KAPQVSTPTLVEISR; ⁽⁴⁵¹⁾	75
						1.2e+02	⁽⁵⁶⁹⁾ TVMENFVAFVDR ⁽⁵⁸⁰⁾	24
Spot 05	69.1/5.8	71.6/5.8	57164373	133	5%	27	⁽¹⁶¹⁾ YLYEVAR; ⁽¹⁶⁷⁾	30
						17	⁽⁴⁰²⁾ HLVDEPQNLIK; ⁽⁴¹²⁾	31
						0.00065	⁽⁴³⁷⁾ KAPQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	72
<hr/>								
03. Heat shock protein 1 (70 kDa)								
Spot 06	70.4/5.9	70.7/6.2	119915459	327	11%	0.00022	⁽³⁹⁾ TTPSYVAFTDTER; ⁽⁵¹⁾	80
						0.00054	⁽²²³⁾ ATAGDTHLGGEDFDNR; ⁽²³⁸⁾	77
						24	⁽²³⁹⁾ LVSHFVEEFKR; ⁽²⁴⁹⁾	27
						0.00015	⁽³³³⁾ IHDIVLVGGSTR; ⁽³⁴⁴⁾	78
<hr/>								

4.8e-02	(351)LLQDYFNGR;(359)	17
0.5	(542)NALESYAFNMK(552)	48

04. Beta-galactosidase

<i>Spot 07</i>	73.4/7.0	76.1/6.5	BGAL BOVIN	48	4%	1.1E+02	(30)TFQIDYR(36)	14
						80	(49)YISGSIHYFR(58)	16
						53	(359)VPEGPIPPSTPK(370)	18

05. Transferrina

<i>Spot 08</i>	69.1/8.2	73.8/6.7	114053269	58	3%	7.4	(298)SAEFQLFYSPHGK.D;(310)	35
						72	(367)GYVVAVVK.K(375)	23

06. Lactoferrina

<i>Spot 09</i>	78/8.5	73.2/6.8	164525	62	1%	0.0037	(268)VPSHAVVAR(276)	62
----------------	--------	----------	--------	----	----	--------	---------------------	----

07. Ram Seminal vesicles 22 kDa protein

<i>Spot 10</i>	17.0/8.4	61.3/4.2	219521812	146	20%	0,044	(76)EWCSLDEDYVGR(87)	57
						4.9	(99)CHFPIYR(106)	38
						38	(134)EYAWQYCDR(142)	28
						96	(134)EYAWQYCDRY(143)	23

Spot 15	17.0/8.4	52.0/4.2	219521812	67	15%	2.7e+02	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	19
						6.3e+02	⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDR ⁽¹⁴²⁾	14
						7.8	⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	34
Spot 29	17.0/8.4	25.6/4.5	219521812	144	14%	2.4e-06	⁽⁸⁵⁾ EWCSLDEDYVGR; ⁽⁹⁶⁾	100
						0.66	⁽¹⁴³⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁵²⁾	45
Spot 35	17.0/8.4	16.6/6.1	219521812	93	20%	0.84	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	44
						88	⁽⁹⁹⁾ CHFPIYR ⁽¹⁰⁶⁾	25
						61	⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	25
Spot 31	17.0/8.4	24.7/5.1	219521812	52	12%	58	⁽⁹⁹⁾ CHFPIYR ⁽¹⁰⁶⁾	20
						2.4	⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	32
08. Ram Seminal vesicles 14 kDa protein								
Spot 33	14.7/5.0	16.0/5.0	219521810	215	48%	0.28	⁽³⁴⁾ SSEESHEDEECVFPFTYK; ⁽⁵¹⁾	51
						0.06	⁽⁵⁵⁾ HFDCTFHGSIFPWCSLDADYVGR; ⁽⁷⁷⁾	107
						5.8e-07	⁽¹⁰⁶⁾ IGSIFGAWCSLSPNYDQDGAWK ⁽¹²⁷⁾	58
Spot 34	14.7/5.0	15.3/5.1	219521810	179	34%	2.9e-09	⁽⁵⁵⁾ HFDCTFHGSIFPWCSLDADYVGR; ⁽⁷⁷⁾	130
						0.45	⁽¹⁰⁶⁾ IGSIFGAMCSLSPNYDQDGAWK ⁽¹²⁷⁾	49

09. Plasma glutamato carboxipeptidase

Spot 11	51.6/5.5	62.5/5.4	115495837	116	11%	2.9	⁽⁶⁷⁾ LALLVDTVGPGR; ⁽⁷⁷⁾	29	
							44	⁽⁹⁷⁾ GDGLENVHLEPVK; ⁽¹⁰⁹⁾	26
							4.5e+02	⁽¹¹⁶⁾ GEESAVMLEPR; ⁽¹²⁶⁾	18
							1.1	⁽²⁶²⁾ SYPDADSFNTVAEITGSK ⁽²⁷⁹⁾	43

10. Leucina aminopeptidase

Spot 12	55.5/5.7	63.0/6.1	410689	183	12%	0.099	⁽⁷⁹⁾ TFYGLHEDFPSVVVGLGK ⁽⁹⁷⁾	54	
							0.0031	⁽¹⁸³⁾ GVLFGSQNLAR ⁽¹⁹⁴⁾	70
							6.2e+02	⁽²⁴⁸⁾ GSEPPVFLEIHYK ⁽²⁶¹⁾	17
							2.3e+02	⁽⁴²⁶⁾ MPLFEHYTR ⁽⁴³⁴⁾	21
							1.1e+02	⁽⁵⁰⁰⁾ TLIEFLFR ⁽⁵⁰⁷⁾	23

11. Chaperonin containing TCP-1 β

Spot 13	57.4/5.9	60.5/6.6	468546	90	15%	1.7e+02	⁽⁹⁰⁾ VQDDEVGDGTTSTVTLAAELLR ⁽¹¹¹⁾	21	
							1.5e+02	⁽²⁸⁵⁾ HGINCFINR ⁽²⁹³⁾	24
							2.7e+03	⁽³²³⁾ LALVTGGEIASTFDHPELVK ⁽³⁴²⁾	9
							4.3e+03	⁽³⁵⁹⁾ LIHFSGVALGEACTIVLR ⁽³⁷⁶⁾	6

15 ⁽⁵⁰²⁾QVLLSAAEAAEVILR⁽⁵¹⁶⁾ 30

12. Chaperonin containing TCP-1 α

<i>Spot 17</i>	60.2/5.7	67.6/5.9	57032236	122	5%	1.5e+02	⁽¹¹²⁾ IHPTSVISGYR; ⁽¹²²⁾	23
						0.017	⁽⁴³⁴⁾ EQLAIAEFAR; ⁽⁴⁴³⁾	61
						4.4	⁽⁴⁶⁹⁾ AFHNEAQVNPER ⁽⁴⁸⁰⁾	38

13. Chaperonin containing TCP-1 ϵ

<i>Spot 18</i>	33.2/5.4	67.7/6.0	74353962	66	8%	3.1	⁽¹³³⁾ IADGYEQAAR; ⁽¹⁴²⁾	39
						47	⁽²²⁷⁾ GVIVDKDFSHPQMPK ⁽²⁴¹⁾	26

14. Actina

<i>Spot 15</i>	41.7/5.3	51.2/5.4	ACTB SHEEP	45	4%	0.05	⁽²³⁹⁾ SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵⁴⁾	45
<i>Spot 16</i>	24.9/4.8	51.1/5.4	61676573	94	15%	1e+02	⁽²⁸⁾ VAPESHVLLTEAPLNPK ⁽⁴⁵⁾	23
						0.0014	⁽¹⁷¹⁾ SYELPDGQVITIGNER ⁽¹⁸⁶⁾	73

15. α -Enolase

<i>Spot 19</i>	47.2/6.4	42.2/6.4	4927286	184	12%	0.055	⁽¹⁶⁾ GNPTVEVDLFTAK; ⁽²⁸⁾	56
						0.67	⁽³³⁾ AAVPSGASTGIYEALRL; ⁽⁵⁰⁾	43
						0.3	⁽¹⁸⁴⁾ IGAEVYHNLK; ⁽¹⁹³⁾	48

4.6 ⁽²⁴⁰⁾VVIGMDVAASEFYR⁽²⁵³⁾ 37

16. Clusterin

Spot 20 51.1/5.7 41.3/5.4 27806907 64 3% 0.0099 ⁽¹⁹³⁾RPQDTQYYSPFSSFPR⁽²⁰⁸⁾ 64

Spot 23 51.1/5.7 46.5/6.1 27806907 67 6% 9.8e+02 ⁽¹⁷⁷⁾ASSIMDELQDR⁽¹⁸⁸⁾ 15

0,14 ⁽¹⁹³⁾RPQDTQYYSPFSSFPR⁽²⁰⁸⁾ 52

17. Zinc-alpha-2-glycoprotein

Spot 21 33.8/5.1 47.8/5.5 ZA2G BOVIN 51 8% 0,012 ⁽¹⁰⁹⁾EGSHTFQGAFGCELR⁽¹²³⁾ 51

18. Galactokinase 1

Spot 22 42.3/5.3 41.3/5.7 95767475 78 4% 0.00036 ⁽¹⁹⁾ALMEEFGAEP ELAVSAPGR⁽³⁷⁾ 78

19. Malato desidrogenase

Spot 24 36.4/6.2 40.0/6.4 77736203 86 6% 0.51 ⁽²²¹⁾GEFITTVQQR⁽²³⁰⁾ 48

5.8 ⁽²⁹⁹⁾VVEGLPINDFSR⁽³¹⁰⁾ 38

20. Palate, lung and nasal epithelium associated

Spot 26 26.6/6.1 32.9/4.4 27806071 102 7% 5.6e-07 ⁽¹¹⁰⁾ITNPQLLELGLVQSPDGHR⁽¹²⁸⁾ 102

21. 14-3-3 protein zeta chain

<i>Spot 27</i>	27.7/4.7	29.3/4.7	253706	207	19%	0.00065	⁽²⁸⁾ SVTEQGAELSNEER; ⁽⁴¹⁾	76
						1.1	⁽¹⁰⁴⁾ FLIPNASQAESK; ⁽¹¹⁵⁾	44
						0.0013	⁽¹²⁸⁾ YLAEVAAGDDKK; ⁽¹³⁹⁾	73
						9.7e+02	⁽¹⁵⁹⁾ EMQPTHPIR ⁽¹⁶⁷⁾	14

22. Proteasoma α 6

<i>Spot 29</i>	27.4/6.3	28.8/6.6	6755198	78	11%	48	⁽¹²⁾ HITIFSPEGR ⁽²¹⁾	29
						9.1e+02	⁽²²⁹⁾ ILTEAEIDAHLVALAER ⁽²⁴⁵⁾	14
						6.3	⁽²²⁹⁾ ILTEAEIDAHLVALAERD ⁽²⁴⁶⁾	36

23. Bodesina

<i>Spot 38</i>	11.6/6.3	16.3/6.3	77864607	73	9%	0.0038	⁽¹²⁾ ISSFSWGPK ⁽²¹⁾	73
----------------	----------	----------	----------	----	----	--------	---	----

24. Bodesina-2

<i>Spot 30</i>	11.7/6.7	19.2/5.2	121484235	87	18%	4.2e-05	⁽⁸⁷⁾ SSNQPVSFPDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	87
<i>Spot 31</i>	11.7/6.7	24.4/5.7	121484235	90	18%	2.2e-05	⁽⁸⁷⁾ SSNQPVSFPDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	90
<i>Spot 35</i>	11.7/6.7	14.7/5.4	121484235	57	27%	5.2e+02	⁽¹²⁾ ISSFSWGPK ⁽²¹⁾	18
						2.1	⁽⁸⁷⁾ SSNQPVSFPDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	39

Spot 36	11.7/6.7	15.1/5.5	121484235	127	18%	9.6e-09	⁽⁸⁷⁾ SSNQPVSPFDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	127
25. Tissue inhibitor of metallopeptidase (TIMP-2)								
Spot 32	24.3/7.4	25.4/6.6	75832065	190	13%	1.5	⁽⁵⁴⁾ EVDSGNDIYGNPIK; ⁽⁶⁷⁾	38
						5.2e-07	⁽⁵⁴⁾ EVDSGNDIYGNPIKR; ⁽⁶⁸⁾	102
						0.066	⁽²⁰⁶⁾ GAAPPKQEFLDIEDP ⁽²²⁰⁾	50
26. Peroxiredoxin 5								
Spot 39	23.2/8.6	17.8/6.7	27807445	61	5%	0.001	⁽⁶³⁾ VGDAIPSVEVFEK ⁽⁷⁵⁾	61

