



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

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS *BOS INDICUS* E  
ASSOCIAÇÕES COM PARÂMETROS SEMINAIS.**

**MICHELLE MOURA DA SILVA**

**Zootecnista**

**FORTALEZA-CE**

**2011**

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

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS *BOS INDICUS* E  
ASSOCIAÇÕES COM PARÂMETROS SEMINAIS.**

AUTOR: *MICHELLE MOURA DA SILVA*

ORIENTADOR: Prof<sup>o</sup> 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 2011

S578p Silva, Michelle Moura da  
Proteínas do plasma seminal de touros *bos indicus* e associações com  
parâmetros seminais. – 2011.  
71f. ;il. enc.

Orientador: Prof. PhD. Arlindo de Alencar Araripe Noronha  
Co-orientador: Dr. Jorge André Matias Martins  
Área de concentração: Reprodução animal  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Ciências Agrárias. Depto. de Zootecnia , Fortaleza, 2011.

1. Reprodução animal 2. Bovino - reprodução 3. Zootecnia I. Noronha,  
Arlindo de Alencar Araripe (orient.) II. Martins, Jorge André Matias. III.  
Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Zootecnia  
III. Título

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.

---

**MICHELLE MOURA DA SILVA**

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/2011**

---

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

---

**Dr. JORGE ANDRÉ MATIAS MARTINS  
CO-ORIENTADOR (UFC)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. ANA CLÁUDIA NASCIMENTO CAMPOS  
CONSELHEIRO (UFC)**

---

**Dra. CLÁUDIA ROBERTA DE ANDRADE  
CONSELHEIRO (UFC)**

---

**Dr. GYSELLE VIANA AGUIAR  
CONSELHEIRO (UECE)**

## **EPIGRAFE**

“Na ciência existem questões ingênuas, questões entediantes,  
questões apresentadas de modo inadequado.  
Mas cada questão é um grito para entender o mundo.  
Não existe pergunta sem sentido.”

Carl Sagan

Aos meus irmãos Paulinha e Mateus,

**OFEREÇO**

Aos meus pais Neto e Dora,

**DEDICO**

Ao meu namorado Emanuel,

**UM AGRADECIMENTO ESPECIAL**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, princípio e fim da vida, pela saúde para realização deste trabalho, por tudo que Ele providenciou.

Ao meu pai, exemplo de dedicação, responsabilidade, respeito. Por acreditar em mim, me incentivar, por me ensinar que sempre podemos sonhar e alcançar nossos sonhos quando temos determinação e contamos com a benção de Deus. À minha mãe, pela amizade, amor, carinho, dedicação, pelos conselhos, por me ensinar a perseverar nos momentos de cansaço e pela força nos momentos de desânimo.

À Paulinha e Mateus, meus irmãos, por todos os momentos juntos. Pela amizade e companheirismo, por se alegrarem com minhas conquistas.

Ao meu namorado Emanuel pela presença, por nossos sonhos, pelo carinho e apoio nos estudos, por tornar minha vida mais bonita, por alegrar meus dias e sempre encontrar uma maneira de me fazer sorrir.

À minha tia Amparo e minhas primas Vlândia e Eveline por se alegrarem com minhas vitórias.

Ao Luis Carlos pela amizade, pela torcida, incentivo e apoio.

À Universidade Federal do Ceará – UFC e Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, por proporcionar minha capacitação profissional.

Ao meu orientador Prof. Arlindo Alencar Araripe Moura, pela orientação, apoio na execução deste trabalho e por todos os conselhos profissionais.

À professora Ana Cláudia N. Campos pela amizade, carinho e por todo apoio.

À FUNCAP, pela bolsa de mestrado.

Ao Dr. Carlos Eduardo A. Souza pelo tempo dedicado em ensinar-me.

Ao Dr. Jorge Martins e Dr. Cláudia Andrade, por toda ajuda e paciência.



À toda equipe da Reprodução Animal da UFC, Érika, Rodrigo, Jorge, Cláudia, Alethéia, João Paulo, David, Verônica, Marco Antonio, Maurício e em especial ao amigo Ítalo, por todos os anos de convivência tranquila dentro e fora dos laboratórios.

Aos amigos Jeane, Igo Renan, Gabriel, Marco Antonio, Mariana, Karol, Josy, Monalisa, Ana Gláudia e a todos do laboratório de estudos em reprodução animal – LERA pelo companheirismo.

À Universidade Federal de Viçosa e aos professores do Departamento de Zootecnia e de Bioquímica desta universidade.

Ao Prof. Dr. José Tadeu de Oliveira e toda equipe do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa em especial ao Hélio Filho pela dedicação, apoio, amizade, presteza e conhecimento compartilhado.

À banca examinadora pela atenção dispensada na correção deste trabalho.

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

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de motilidade (Mot), percentual de espermatozóides morfológicamente normais (Normal), Circunferência escrotal (CE) e peso dos touros <i>Bos indicus</i> , raça Brahman.....	38
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo proposto para a proteção dos espermatozóides pela gema de ovo (LDL). Ação das proteínas BSPs..... 28
- Figura 2.** 2a: Motilidade dos espermatozóides de touros *Bos indicus* agrupados de acordo com a mediana da percentagem de espermatozóides móveis nas amostras de sêmen (Alta motilidade  $\geq 75\%$  e baixa motilidade  $< 75\%$ ). 2b: Percentual de células morfológicamente normais agrupadas de acordo com a mediana da percentagem de espermatozóides normais nas amostras de sêmen (Alto percentual de espermatozóides normais  $\geq 69\%$  e baixo percentual de espermatozóides normais  $< 69\%$ ). Os valores são apresentados como médias e respectivos erros-padrão. Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ )..... 37
- Figura 3.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* adultos. A figura 3A representa o gel sintético gerado pelo software PDQuest (Bio Rad, USA), construído a partir da combinação dos *spots* de todos os géis utilizados. As letras A, B, C, D, E e F indicam as isoformas de proteínas, setas azuis apontam as proteínas BSPs e setas verdes evidenciam as espermadésinas. A Figura 3B corresponde à imagem do gel de referência..... 39
- Figura 4.** Perfil protéico do fluido da cauda do epidídimo (A) e glândulas sexuais acessórias (B) de animais *Bos taurus* adultos (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010)..... 40
- Figura 5.** Comparação entre o mapa protéico do plasma seminal de *Bos indicus* (à esquerda) e proteínas das glândulas sexuais acessórias (A) e proteínas da cauda do epidídimo (B) de *Bos taurus* (à direita) adultos (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010)..... 41

**Figura 6.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* adultos. As intensidades dos spots indicados em vermelho e azul apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de animais com diferentes valores de motilidade espermática e percentagem de células normais, respectivamente..... 43

**Figura 7.** Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 506, 1202, 1406, 1505, 1701, 2003 e 2703 no mapa bidimensional do plasma seminal de touros *Bos indicus* agrupados de acordo com a percentagem de espermatozóides móveis nas amostras de sêmen (Alta motilidade  $\geq 75\%$ ; Baixa motilidade  $< 75\%$ ). Os números dos spots referem-se àqueles mostrados na Figura 5. Em parênteses a proteína na qual o número do spot se refere. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ )..... 44

**Figura 8.** Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 312, 1309, 1310, 1505 e 2703 no mapa bidimensional do plasma seminal de touros *Bos indicus* agrupados de acordo com o percentual de espermatozóides normais nas amostras de sêmen (Alto percentual de espermatozóides normais: motilidade  $\geq 69\%$ ; Baixo percentual de espermatozóides normais: motilidade  $< 69\%$ ). Os números dos spots referem-se àqueles mostrados na Figura 5. Em parênteses a proteína na qual o número do spot se refere. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ )..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – Adenosina Monofosfato Cíclico

aSFP – Acidic Seminal Fluid Protein (Proteína Ácida do Fluido Seminal)

BSP – Binder of Sperm Protein

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

cm – Centímetros

°C – graus Celsius

DTT – Ditioneitol

g – gravidade

h – horas

HDL – High density lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)

IAA – Iodoacetamida

IGF - Insulin-like growth factor (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

IGF-IR - Receptor de IGF

IPG - Immobilized pH gel (Gel com pH Imobilizado)

kDa – Quilo Dalton

Kg - Quilogramas

LDL – Low density lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)

M – Mol

MOT – Motilidade espermática

mL – MiliLitro

mm – Milímetros

mM – MiliMol

min – minutos

µg – Micrograma

µL - Microlitro

nm – nanômetro

OPN - Osteopontina

pI – Ponto Isoelétrico

PLA2 – Fosfolipase A2

ppm – Parte por Milhão

PS – Plasma Seminal

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

SDS – Docecil sulfato de sódio

SPMI – Spermatic Motility Inib (Inibidores de Motilidade Espermática)

TIMP-2 – Tissue Inhibitor of Metalloproteinases – 2 (Tecido Inibidor de Metaloproteinases)

V – Volts

Vh – Volts x Hora

## RESUMO

A realização desta pesquisa teve por objetivos a descrição do mapa eletroforético bidimensional do plasma seminal de touros adultos *Bos indicus*, raça Brahman, bem como a determinação das associações estatísticas entre proteínas do plasma seminal e parâmetros seminais destes touros. Amostras de sêmen de 56 touros foram coletadas e o plasma seminal foi obtido através de centrifugação e submetido à eletroforese bidimensional. Os géis foram corados com Coomassie coloidal, digitalizados e analisados por meio do aplicativo PDQuest. Os touros foram divididos em grupos de alta e baixa motilidade espermática e alto e baixo percentual de células espermáticas morfologicamente normais. As proteínas mais abundantes no plasma seminal dos touros *Bos indicus* e detectadas em todos os 56 géis apresentaram semelhança com espermedesinas e BSPs. A expressão de spots com valores de kDa e pI equivalentes aos das proteínas aSFP, BSPs, clusterina, albumina e osteopontina foram estatisticamente diferentes entre os grupos de animais com parâmetros contrastantes de motilidade e morfologia espermáticas. As associações encontradas entre tais spots protéicos e os parâmetros seminais sugerem a possibilidade do uso destes como marcadores moleculares da fertilidade potencial dos animais.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1. Proteômica.....	18
2.2. Eletroforese Bidimensional.....	19
2.3. Plasma seminal e proteínas do plasma seminal.....	22
2.3.1. Proteínas envolvidas com a proteção espermática.....	23
2.3.2. Proteínas associadas com a motilidade espermática.....	26
2.3.3. Proteínas que participam da capacitação espermática.....	27
2.3.4. Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação entre gametas.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Coleta, processamento do sêmen e eletroforese bidimensional.....	31
3.2. Quantificação da concentração de proteína total no plasma seminal.....	32
3.3. Eletroforese bidimensional.....	32
3.4. Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais.....	34
3.4.1. Edição de imagens.....	34
3.4.2. Detecção de spots.....	34
3.5. Análise Estatística.....	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A busca por melhores índices reprodutivos do rebanho cresce à medida que se intensificam os sistemas de produção e é nesse contexto que as pesquisas sobre possíveis marcadores moleculares de fertilidade conquistaram espaço nos últimos anos. O melhoramento genético é uma ferramenta indispensável para aumentar os níveis de produtividade e a qualidade dos produtos agropecuários. Para isto a seleção de animais com alto valor genético, capazes de expressarem e de transmitirem aos descendentes características de interesse econômico, é imprescindível.

O touro é o principal responsável pela multiplicação do rebanho e pelo ganho genético, já que um único reprodutor é capaz de inseminar um número significativo de fêmeas. Assim, a avaliação reprodutiva do touro é necessária ao sistema de produção quando se almeja melhorar os índices produtivos.

Vários parâmetros são utilizados na tentativa de estimar o potencial reprodutivo do touro, dentre os quais destacam-se a circunferência escrotal, motilidade, vigor e morfologia espermática, teste hiposmótico e teste de integridade acrossômica. Embora estes parâmetros sejam obtidos de maneira relativamente rápida, prática e a baixo custo, estes parâmetros podem ser insuficientes para prever o potencial fecundante dos espermatozoides ou fertilidade de um animal devido ao fato de que estes exames não levam em consideração a habilidade dos espermatozoides de sofrerem alterações fisiológicas, morfológicas e funcionais importantes para o processo de fertilização (AMMAN & HAMMERSTEDT, 1993; KILLIAN et al., 1993; MOURA et al., 2006a).

Vários autores mostraram a importância das proteínas encontradas no plasma seminal para a fertilidade em touros (KILLIAN et al., 1993; MANJUNATH et al., 2002; MOURA et al., 2006a). Durante as últimas décadas, com o surgimento da proteômica e o aprimoramento das técnicas de eletroforese e espectrometria de massa, a identificação e caracterização de

marcadores biológicos, várias questões sobre fertilidade puderam ser elucidadas. Assim, a realização desta pesquisa teve por objetivos:

1) Descrição do mapa eletroforético bidimensional do plasma seminal de touros *Bos indicus*, raça Brahman, adultos;

2) Determinação das associações estatísticas entre proteínas do plasma seminal e parâmetros seminais destes touros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Proteômica

Nos últimos anos a Bioquímica sofreu uma verdadeira revolução, principalmente devido aos espetaculares avanços na área de biologia molecular, que vem disponibilizando uma incrível gama de informações sobre os sistemas biológicos (SOUSA et al., 1999). Merecem destaque os seqüenciamentos de genomas de muitas plantas e animais que estão disponíveis hoje.

Contudo, apenas com as seqüências completas de nucleotídeos no DNA não é possível elucidar muitos processos biológicos (PANDEY & MANN, 2000). Desta maneira, percebeu-se que investigar a expressão gênica poderia gerar informações valiosas, tais como: quais proteínas são expressas, o nível e momento de expressão destas proteínas e respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos (SILVA, et al., 2007). Portanto, a análise ao nível de proteína é necessária, pois o estudo dos genes através do seqüenciamento dos genes, ou seja, o estudo da genômica, não pode adequadamente prever a estrutura dinâmica das proteínas, uma vez que é ao nível das proteínas que muitos processos de uma célula ocorrem. Sendo assim, a proteômica é o método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou mesmo organismos (CIERO & BELATTO, 2002).

A proteômica é a ferramenta mais apropriada para se entender o funcionamento dos genes, porque analisa o produto final do genoma. O termo proteoma foi proposto como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma (WILKINS et al., 1997). Portanto, o proteoma não é estático, mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente (KAZMI & KRULL, 2001). Desta maneira, o proteoma reflete o

estado atual de funcionamento em condições fisiológicas específicas, ou seja, a expressão funcional do genoma (ROCHA et al., 2005).

Embora a identificação de todas as proteínas codificadas no genoma de um organismo pareça uma tarefa bastante difícil de realizar, mesmo em organismos mais simples, são cada vez mais completas as informações obtidas através de estudos proteômicos (SURESH, et al., 2005).

Os dados gerados por análise proteômica possuem implicações diretas em vários campos da biologia e da biotecnologia: (1) permite a descoberta de vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; (2) permite viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; e (3) permite também a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico (ROCHA et al., 2005).

## **2.2. Eletroforese Bidimensional**

A eletroforese bidimensional é uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo do proteoma, esta técnica foi proposta por O'FARREL (1975) e ao longo dos anos tem sofrido ajustes constantes que proporcionam resultados cada vez mais precisos.

A eletroforese bidimensional consiste em separar, sob a influência de um campo elétrico, moléculas que possuem cargas. Para isto, são realizadas duas corridas eletroforéticas sequenciais. Primeiro, a focalização isoeétrica (IEF) para separar as proteínas de acordo com o seu ponto isoeletrico, e a segunda, a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para separá-las de acordo com suas massas moleculares.

Uma proteína possui grupos carregados de ambas polaridades e, portanto apresenta um ponto isoelétrico, que é o pH no qual a proteína é imóvel em um campo elétrico. Se uma mistura de proteínas é submetida à eletroforese por meio de uma solução que possua um gradiente de pH estável, na qual o pH aumenta, aos poucos, do ânodo para o cátodo, cada proteína migrará para uma posição do gradiente de pH, que corresponda ao seu ponto isoelétrico. Se uma molécula protéica difundir para fora dessa posição, sua carga mudará à medida que ela for para uma região de pH diferente, e as forças eletroforéticas resultantes levarão a proteína de volta para a sua posição isoelétrica. Cada proteína é, portanto, “focalizada” em uma faixa estreita próximo ao seu ponto isoelétrico, que pode ser de até 0,01 unidade de pH. Por isso, essa técnica foi denominada focalização isoelétrica (IEF, de *isoelectric focusing*) (VOET & VOET, 2006).

Desde a introdução da técnica de 2D várias mudanças foram realizadas principalmente na primeira dimensão. Problemas como a baixa reprodutibilidade foram solucionados com o desenvolvimento de géis em forma de tiras com gradiente imobilizado (IPG – *immobilized pH gel*) (GÖRG, 1985). Antes do uso do IPG, utilizavam-se os anfólitos para estabelecer o gradiente de pH para a separação das proteínas pelo ponto isoelétrico. Entretanto, o uso de anfólitos com esta finalidade tem diversos problemas incluindo a incapacidade de correr grandes quantidades de proteínas necessárias para a micro seqüência, pouca estabilidade do gradiente de pH durante a eletroforese e freqüente falta de reprodutibilidade dos géis entre os laboratórios. O uso dos gradientes de pH imobilizados para a separação por cargas na 2DE solucionou muitos dos problemas. Encontra-se no mercado fitas de géis IPG desidratadas (Amersham Biosciences) feitas de uma matriz de poliacrilamida, a qual é modificada covalentemente com grupos ácidos e básicos que formam o gradiente de pH imobilizado em toda a extensão do gel. Há diversas faixas de pH, desde ampla (3-10), como faixas estreitas, como por exemplo de 4,5-5,5 ou 7,0-11,0. Esta flexibilidade na escolha das faixas de pH a

serem utilizadas é de grande utilidade para separar eficientemente o maior número de proteínas possível (CIERO & BELATTO, 2002).

A eletroforese de proteínas é geralmente executada em géis de um polímero que apresenta ligações cruzadas, a poliacrilamida. O gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, em que as moléculas de menor peso migram verticalmente mais facilmente pelo gel e as moléculas de maior peso molecular ficam retidas na porção superior do gel. A porosidade deste gel de poliacrilamida pode ser escolhida, sendo que quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros da malha formada (ROCHA et al., 2005).

Durante a eletroforese de proteínas, a taxa de migração ou mobilidade eletroforética é influenciada pela carga protéica no meio eletroforético, assim como pela sua forma, tamanho e associação com outros compostos ionizáveis. Os componentes dos extratos protéicos migram com velocidades individuais em um campo elétrico (BRUNE & ALFENAS, 1998).

Um método eletroforético comumente utilizado para estimar a pureza e o peso molecular utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS liga-se as proteínas provavelmente por ligações hidrofóbicas em quantidades aproximadamente proporcionais ao peso molecular da proteína, cerca de uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos (NELSON & COX, 2002). Grande parte da carga negativa do SDS mascara a carga intrínseca da proteína; logo, as proteínas tratadas com SDS tendem a apresentar relações carga-massa idêntica e formas semelhantes. Conseqüentemente, a eletroforese de proteínas em um gel de poliacrilamida contendo SDS separa as amostras na ordem das suas massas moleculares devido ao efeito filtrador do gel (VOET & VOET, 2006).

A eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focalização isoeétrica (IEF), seguida por uma separação de SDS – PAGE. Quando bem sucedida obtêm-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos *spots*, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína (ou a uma forma protéica) (SANTOS et al., 2004).

Em suma, a seqüência experimental para a realização da eletroforese 2D é: 1) Preparação da amostra: A preparação adequada da amostra é absolutamente essencial para bons resultados de eletroforese 2-D. Devido à grande diversidade de tipos de proteínas e origem destas, o processo de preparação de amostra ideal para uma dada amostra deve ser determinada empiricamente. Idealmente, o processo irá resultar na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas na amostra. 2) Focalização isoeletrica (primeira dimensão): Separa as proteínas de acordo com o pI. 3) SDS-PAGE - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (segunda dimensão): Separa as proteínas segundo suas massas moleculares. 4) Detecção das proteínas: As proteínas separadas eletroforeticamente podem ser visualizadas por métodos de coloração como: azul brilhante de coomassie, nitrato de prata, fluorescência ou autoradiografia, ou por métodos específicos como a coloração de glicoproteínas ou detecção com imunoquímicos (ROCHA et al, 2005) e 5) Análise da imagem. É realizada por meio de *softwares* específicos, após a digitalização do gel. O aplicativo permite a contagem do número de spots por gel, verificar a intensidade de cada spot e compará-las com os spots de diferentes géis, entre outros recursos.

### **2.3. Plasma seminal e proteínas do plasma seminal**

O PS é um fluído originado nas glândulas acessórias (ampolas, glândulas vesiculares e bulbo-uretrais), testículo e epidídimo e atua como veículo no transporte para os espermatozóides durante a ejaculação além de fornecer substâncias, como carboidratos, lipídios, proteínas e eletrólitos, que são essenciais para as células espermáticas no aparelho genital feminino (EVANS & MAXWELL, 1987; FRAZER & BUCCI, 1996).

Apesar dos espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo possuem capacidade de fertilização (YOUNG et al., 1985; JONES, 1998), muitos estudos destacam a

importância do contato do espermatozóide com o fluido proveniente das glândulas sexuais acessórias (KILLIAN et al., 1993; SPROTT et al., 2000; MOURA et al., 2006a). Em ramsters a retirada da próstata ventral reduz a fertilidade, e prejudica o desenvolvimento do embrião, indicando que os componentes da secreção proveniente desta glândula têm um papel na regulação epigenética do desenvolvimento embrionário (CHOW et al., 2003).

Várias pesquisas têm fornecido evidências de que componentes específicos de PS, particularmente proteínas, são adsorvidas na superfície dos espermatozóides ejaculados (METZ et al., 1990; WATSON, 1995; THOMAS et al., 2003). A concentração de proteínas do plasma seminal de mamíferos varia de 3 a 7%, dependendo da espécie (WHITE, 1988) e essas proteínas foram diversas vezes associadas a características reprodutivas de ruminantes (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998; MOURA et al., 2006a) destacando sua importância nos processos de capacitação e reação acrossômica (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002), integridade da membrana plasmática, (EINSPANIER et al., 1994) e motilidade (BRATANOV et al., 1978) e interação entre gametas (ROLDAN & FRAGGIO, 1993). Por meio das técnicas de biologia molecular, muitas proteínas foram identificadas e caracterizadas (AYAGARI et al., 1987; KILLIAN et al., 1993; FRAZER & BUCCI, 1996; MOREAU & MANJUNATH, 1999) e o estudo dessas proteínas poderá contribuir para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos ligados à fertilidade.

### **2.3.1. Proteínas envolvidas com a proteção espermática**

O plasma seminal 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., 2006b). Durante o trânsito epididimário e armazenamento na cauda do epidídimo, os espermatozóides podem sofrer lesões relacionadas ao estresse oxidativo (HINTON et



al., 1995). A geração de ROS pode ocorrer como uma consequência normal do metabolismo oxidativo e podem desempenhar um papel importante na função espermática normal, contudo, um desequilíbrio na produção ou degradação de ROS pode ter sérios efeitos adversos sobre o esperma podendo causar até infertilidade (RAO et al., 1989; AGRAWAL & SALEH, 2002; BALL, 2008).

Uma cascata de peroxidação lipídica ocorre quando ROS em excesso reagem com ácidos graxos insaturados presentes na membrana espermática (JONES et al., 1979; STOREY, 1997). O resultado dessa peroxidação é a perda de fluidez e integridade da membrana necessárias para a fertilização (JONES et al., 1979), já que o citoplasma dos espermatozoides contém baixa quantidade de enzimas antioxidantes (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995).

Glutathione S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e gama-glutamyl-transpeptidase são enzimas antioxidantes encontradas no epidídimo (ALVAREZ & STOREY, 1983; JEULIN et al., 1989; FOUCHÉCOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2006).

Outra proteína envolvida com a proteção da célula espermática é a aSFP que é secretada principalmente pelas glândulas vesiculares e ampolas (WEMPE et al., 1992) não tendo sido detectada em nenhum outro tecido bovino (EINSPAINER et al., 1991). Essa proteína possui 13 kDa e pertence à família das espermadesinas (CALVETE et al., 1995). A estrutura primária de aSFP é composta por 114 resíduos de aminoácidos, unidos por duas pontes dissulfeto (EINSPANIER et al., 1994). As espermadesinas foram identificadas no plasma seminal suíno (CALVETE et al., 1996), bovino (WEMPE et al., 1992), equino (REINERT et al., 1996) e ovino (BERGERON et al., 2005).

As aSFP se apresentam em diferentes isoformas e protegem os espermatozoides do dano oxidativo através da diminuição da peroxidação lipídica (EINSPANIER et al., 1994),

além de demonstrarem atividade mitogênica e estimularem a secreção de esteróides pelas células da granulosa, *in vitro* (EINSPANIER & EINSPANIER, 1992). Schoneck et al. (1996) sugeriram que a aSFP possui a capacidade de preservar a integridade de membrana, agindo como um redutor de peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide e regulando a atividade mitocondrial e, conseqüentemente a motilidade espermática, sendo portanto capaz de modular a função metabólica dos espermatozoides *in vitro*. Esse efeito é dose dependente, e altos níveis desta proteína podem apresentar efeito inverso como a inibição da motilidade espermática e atividade mitocondrial (SCHÖNECK et al., 1996).

Ainda em relação à aSFP, essa espermadesina liga-se somente à superfície do espermatozóide ejaculado e, para que ocorra a fertilização *in vitro*, é necessário a liberação desta proteína da membrana espermática (SCHÖNECK et al., 1996). Além de fraca ligação à membrana do espermatozóide, a aSFP não apresenta capacidade de ligação à zona pelúcida, o que indica que a mesma não está envolvida na interação entre gametas, entretanto essa proteína parece estimular, de forma dose-dependente a divisão celular de linfócitos, estimulando a secreção de progesterona pelo endométrio bovino e pelas células ovarianas (EINSPANIER et al., 1991).

Uma outra classe de espermadesina que foi chamada de Z13, possui 50% da seqüência de aminoácidos idêntica à aSFP bovina. Moura et al. (2006a) e Killian et al. (1993) relacionaram a espermadesina Z13 à baixa fertilidade em touros. Moura et al. (2006a) sugerem ainda que a menor fertilidade de touros com altos níveis de espermadesina Z13 deva-se à capacidade desta proteína de alterar aspectos da motilidade espermática.

A clusterina é uma glicoproteína, heterodímero, composta de duas subunidades de 40 kDa ligadas por pontes dissulfeto (KIRSZBAUM et al., 1992). Foi isolada pela primeira vez do fluido da *rete testis* de carneiros (BLASCHUK, et al., 1983; FRITZ, 1993), e está presente em células epiteliais, com níveis mais elevados no

testículo, epidídimo (GRIMA et al., 1990; ARONOW et al., 1993) e em fluidos fisiológicos, como o leite e o sêmen (WATTS et al., 1990; KOUNNAS et al., 1995).

### **2.3.2. Proteínas associadas com a motilidade espermática**

A motilidade progressiva dos espermatozóides é adquirida durante o trânsito epididimário (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993). O plasma seminal possui diversos componentes capazes de afetar a motilidade dos espermatozóides (BAAS et al., 1983).

A proteína aSFP esta relacionada com a motilidade espermática sendo que esta em alta concentração possui efeito reversível inibitório sobre a motilidade, porém em baixa concentração seu efeito é estimulante, assim os espermatozóides armazenados na ampola, apresentam demanda energética reduzida aumentando sua viabilidade e, quando o sêmen é diluído nas secreções do trato reprodutivo da fêmea ocorre o restabelecimento da cinética espermática (SCHÖNECK et al., 1996).

Experimento realizado com touros por Donald et al., 2008 verificaram a influência do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) no aumento da motilidade progressiva do espermatozóide. Segundo os autores, o IGF-I presentes no plasma seminal bovino pode interagir com receptor do IGF-I localizado na região acrossomal do espermatozóide e essa interação do IGF-I e receptor parece estar associada à hiperativação. Contudo, são necessárias novas investigações para compreender estes achados.

A BSP 1 é uma proteína secretada pelas glândulas vesiculares seminais de bovinos, que se liga à peça intermediária dos espermatozóides, no momento da ejaculação. Esta proteína altera as propriedades biofísicas da membrana, por meio do efluxo de colesterol e fosfolípídeos no primeiro estágio da capacitação (MANJUNATH & THERIEN, 2002) e pode ter alguma influência na motilidade espermática (MANJUNATH et al., 2009).

As proteínas BSPs são secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas e atuam na capacitação espermática (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002). Estas representam aproximadamente 70% do total de proteína do plasma seminal bovino (MANJUNATH & SAIRAM, 1987). As proteínas designadas por BSP 1 (15-16kDa e pI 4,7-5,0), BSP 3 (15 kDa e PI 4,8-5,2) e BSP 5 kDa fazem parte deste grupo. (SEIDAH et al, 1987; DESNOYERS & MANJUNATH, 1992).

O plasma seminal contém cininogênio que é o substrato da enzima calicreína. A ligação destes resulta na formação de cininas que estimulam a motilidade espermática (BRATANOV et al., 1978).

### **2.3.3. Proteínas que participam da capacitação espermática**

As células espermáticas devem sofrer o processo de capacitação para serem capazes de fertilizar o óvulo (HAFEZ, 2004). Os espermatozoides sofrem capacitação quando há um efluxo de colesterol da sua membrana lipídica (ZARINTASH & CROSS, 1996). Esse processo leva a alterações estruturais da membrana, aumentando a permeabilidade da bicamada lipídica e da fluidez que é de suma importância para que essas células cheguem ao estado de capacitados (CROSS, 2003). O efluxo de colesterol pode regular a expressão de receptores da superfície do espermatozoide a zona pelúcida (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002).

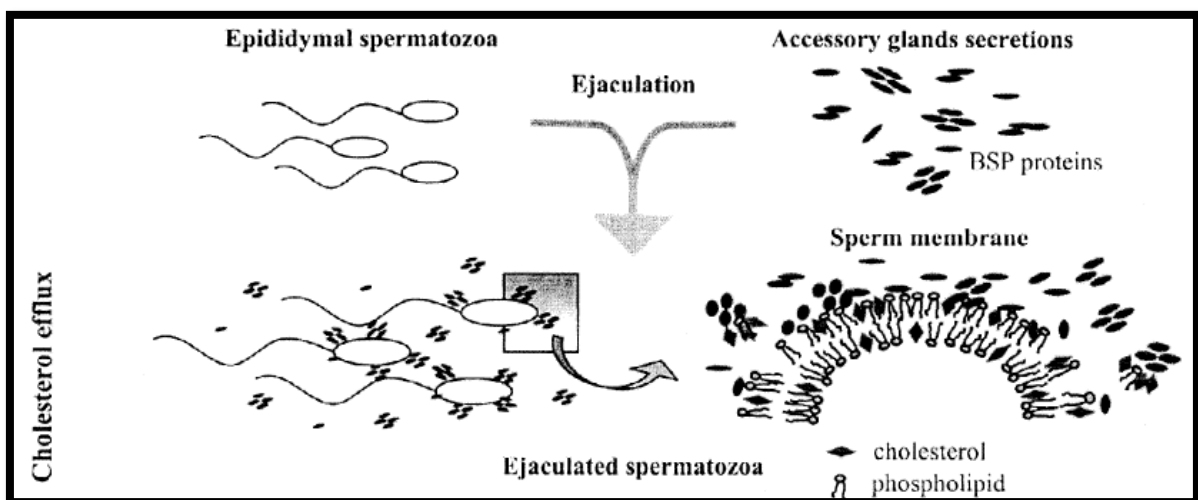
As BSPs promovem modificações na membrana lipídica do espermatozoide e interagem com a heparina e HDL, formando sítios de ligação na membrana plasmática, que é outro fator importante envolvido na capacitação do espermatozoide, Thérien et al. (1995) observaram tal afirmação em bovino.

As proteínas BSPs também podem estimular o efluxo de colesterol e fosfolipídios de espermatozoides armazenados no epidídimo. Contudo uma breve exposição à proteínas BSP's

não pode estimular a capacitação do espermatozóide epididimário, na ausência de heparina ou HDL. A necessidade de outro fator presente no líquido folicular ou oviduto (heparina, por exemplo) permite que as proteínas BSP promovam a capacitação espermática no momento adequado tornando os espermatozóides aptos a sofrerem a reação acrossômica (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002).

As proteínas BSPs ligam-se de forma rápida, específica e saturável ao LDL (Fig. 1) formando complexos (LDL-BSP proteínas) estáveis. Essa alta capacidade de ligação com a LDL é importante porque essas retiram as proteínas BSPs presentes no sêmen, evitando o efluxo de colesterol e conseqüentemente, a desestabilização da membrana (MANJUNATH et al., 2002). Contudo, quando os espermatozóides são continuamente expostos ao plasma seminal que contém proteínas BSPs, essas causam danos na membrana espermática o que pode comprometer a viabilidade do sêmen criopreservado (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002).

**Fig. 1. Mecanismo proposto para a proteção dos espermatozóides pela gema de ovo (LDL). Ação sobre as proteínas BSP.**



Fonte: MANJUNATH, et al. (2002).

Cada BSP isolada é capaz de estimular o efluxo de colesterol do espermatozóide epididimário. Com 15-30 minutos de exposição, 7-15% de colesterol é removido do espermatozóide e com 4h cerca de 25% do colesterol é removido da membrana espermática (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002). O efluxo de lipídios pelas proteínas BSP é tempo e concentração dependente (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002). As associações positivas da BSP 5 kDa com a fertilidade podem ser resultado de sua capacidade de atuar na capacitação espermática, evento fundamental para a fertilização e sobrevivência dos gametas masculinos no oviduto (MOURA et al., 2006a).

As proteínas BSP modulam a atividade da PLA<sub>2</sub> regulando o metabolismo dos fosfolipídios da membrana espermática (MANJUNATH et al., 1994). Os sítios de ligação dos colina-fosfolipídeos na membrana espermática são substratos para a PLA<sub>2</sub>, uma enzima-chave na capacitação (SOUBEYRAND et al., 1997).

#### **2.3.4. Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação entre gametas**

As proteínas BSPs estão envolvidas com o processo de reação acrossômica. Manjunath et al. (1994) verificaram que a BSP 1, 2 e a BSP 5 kDa exibiram uma alta atividade quando ligadas à calmodulina, o que pode influenciar no transporte intracelular do Ca<sup>2+</sup> e na reação acrossomal e, conseqüentemente, com os fenômenos de fertilização.

As PLA<sub>2</sub> são enzimas que variam de 14 a 20 kDa, encontradas em fluidos corporais (DENNIS, 1994). Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise de fosfolipídios na superfície de micelas convertendo-os em fosfolipídios em lisolipídios como a lisolecitina. No aparelho reprodutivo, a PLA<sub>2</sub> regula a maturação espermática e a reação acrossômica (UPRETI et al., 1994). A expressão de PLA<sub>2</sub> e osteopontina é detectada em maior abundância em touros com alta capacidade de fertilização (MOURA et al., 2006a).

A OPN é uma glicoproteína presente em tecidos e fluidos orgânicos, é proeminente no tecido ósseo e promove a mineralização e reabsorção da matriz. Possui peso molecular de 55 kDa, é rica em ácido aspártico, ácido glutâmico e serina (SORENSEN & PETERSEN, 1994). Foi isolada na glândula vesicular e na ampola do ducto deferente (RODRIGUEZ et al., 2000) e apresenta-se em alta concentração no PS em animais de alta fertilidade (CANCEL et al., 1997). A OPN liga-se à membrana espermática por meio das integrinas, e esse complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D'CRUZ, 1996). Souza et al. (2008) também sugerem a participação da OPN na interação espermatozóide-oócito e a influência desta proteína na fertilização e no desenvolvimento embrionário.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta, processamento do sêmen

Para o presente trabalho, foram selecionados 56 touros *Bos indicus*, da raça Brahman, com idade média de 24 meses,  $29,1 \pm 2,4$  cm de circunferência escrotal e peso vivo de  $353 \pm 37,2$  kg, criados a pasto na região de Queensland, Austrália. O estado de Queensland, latitude  $22^{\circ}0'$  Sul e longitude  $142^{\circ}0'$  leste, está localizado na região Nordeste daquele país, de clima subtropical úmido (KOPPEN, 1968), e possui áreas caracterizadas por temperaturas elevadas e escassez de chuvas. Os sistemas de produção de bovinos em Queensland também são baseados no uso de pastagens (nativas ou cultivadas) com pouca ou quase nenhuma suplementação.

As amostras de sêmen dos touros foram coletadas com o auxílio de eletroejaculador. Imediatamente após a coleta, uma alíquota foi retirada para avaliação da motilidade espermática e outra alíquota diluída em solução formol-salina para determinação da concentração espermática, utilizando câmara de Neubauer (FITZPATRICK et al, 2002). A morfologia espermática de 100 células por animal foi avaliada em laboratório. Uma gota de sêmen diluído em solução de 0,2% de glutaraldeído formol-salina-tamponada foi depositada entre lâmina e lamínula e utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (x1000) os espermatozóides foram classificados individualmente como morfolologicamente normais ou não (ENTWISTLE & FORDYCE, 2003). Após cada coleta, o restante do sêmen foi imediatamente centrifugado ( $700 \times g / 15 \text{ min} / 4^{\circ} \text{ C}$ ), o sobrenadante transferido para tubo de ensaio e novamente centrifugado ( $10000 \times g / 30 \text{ min} / 4^{\circ} \text{ C}$ ) para a retirada de restos celulares e demais impurezas (MOURA et al., 2006a).



### **3.2. 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<sup>-1</sup>. A cada 100 µL padrão, 2,5 mL do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) foram adicionadas, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de absorvância 595 nm (Ultraspec III, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA), após 10 minutos de incubação. Por meio das médias das triplicatas das absorvâncias obtidas a curva de calibração foi estabelecida gerando uma equação linear de absorvância em função da concentração ( $R^2 = 0,9761$ ) com a 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.

### **3.3. Eletroforese bidimensional**

As amostras de plasma seminal foram submetidas à eletroforese bidimensional para separação das proteínas com base na massa molecular e ponto isoelétrico (MOURA et al., 2006a; MOURA et al. 2010; REGO, 2010; SOUZA et al., 2010). Alíquotas de PS contendo 750 µg de proteína total foram ressuspensas em tampão de re-hidratação (7M Uréia, 2M Tiouréia, 1% de anfólitos “IPG buffer pH 4-7”, 65mM DTT, 1% CHAPS e traço de azul de bromofenol), aplicadas em bandeja de hidratação (Immobilized DryStrip Reswelling Tray) e incubadas com tiras de pH imobilizado (24 cm, com faixa de pH linear de 3 a 11; GE Healthcare, USA) por um período de 16 horas, em temperatura ambiente. A focalização

isoeétrica foi conduzida em um equipamento ETTAN<sup>TM</sup> IPGphor III (GE Lifesciences, USA) de acordo com a seguinte programação: step 100 V (1:00 h), step 500 V (1:20 h), grad 1000 V (0:30 h), step 5000 V (1:20 h), grad 10000 V (0:30 h) e step 10000 V (40000 Vh). Após a focalização, as tiras foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de óleo mineral e equilibradas por 15 minutos em solução de equilíbrio contendo DTT (1 %) e uma solução base de 50mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5M; 87% glicerol; 6M Uréia; 2% SDS e azul de bromofenol, sob leve agitação. Em seguida, as tiras foram incubadas na mesma solução de equilíbrio, contendo 2,5% IAA, ao invés de DTT, por mais 15 minutos, sob leve agitação. Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram dispostas sobre as placas com gel de poliacrilamida (15 %) em presença de SDS e fixadas com agarose, utilizando um sistema do tipo DALT twelve (GE Healthcare, USA). A segunda dimensão do processo de eletroforese foi realizada primeiramente estabelecendo uma voltagem de 100 volts durante os primeiros 60 minutos e de 200 volts para o restante do processo.

Após a separação com base na massa molecular aparente, os géis foram corados com Sypro Ruby (Bio Rad, USA). Desta forma, os géis foram fixados em solução contendo metanol (50%) durante 15 minutos e ácido acético (7%) por mais 15 minutos; em seguida os géis foram imersos em solução de coloração SYPRO<sup>®</sup> durante 3 horas sob leve agitação. Após esse período os géis foram lavados em metanol (10%) e ácido acético (7%) durante 30 minutos e digitalizados em equipamento com detecção de fluorescência UV- 300 nm (Typhon, GE Healthcare, USA). Em seguida, as imagens foram salvas no formato .tif para posterior análise computacional.

### **3.4. Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais**

#### **3.4.1. Edição de imagens**

As imagens digitalizadas foram inseridas no programa PDQuest, versão 8.0 (Bio Rad, USA). Utilizando a ferramenta de edição, os géis foram cortados e ajustados quanto ao tamanho, de forma que cada gel foi delimitado para 274.9 mm de largura e 182.2 mm de altura. Em seguida, foi realizada a filtragem dos géis para eliminar artefatos da imagem. Uma grande variedade de filtros, disponíveis pelo programa, foi testada e os filtros que funcionaram melhor para as condições das imagens foram as opções “Salt”, utilizado para retirar manchas mais claras que o *background*, “Pepper” para retirada de manchas mais escuras que o gel, e o filtro de 9x9 pixels.

#### **3.4.2. Detecção de spots**

Os parâmetros para detecção de spots foram escolhidos em duas etapas descritas a seguir. Etapa 1: selecionou-se um “faint spot” (ponto mais fraco da digitalização), um “smallest spot” (spot menor) e um “largest spot” (spot maior). Esta seleção definiu a sensibilidade e os parâmetros de valor mínimo e máximo de pico que o programa utilizou para detecção automática dos spots; Etapa 2: foram ajustados os valores de “sensitivity” (sensibilidade), “min peak” (pico mínimo) e “size scale” (tamanho da escala). O aumento da sensibilidade permitiu selecionar os pontos fracos que não foram reconhecidos na etapa 1, o pico mínimo definiu o pico de intensidade mínima que deveria ter um ponto a ser identificado e o tamanho da escala foi ajustado para melhor distinguir a intensidade do sinal (pontos) dos artefatos da imagem. Desta maneira, após extensivas tentativas foram utilizados os valores de 15, 13 e 2251 para “sensitivity”, “min peak” e “size scale”, respectivamente, e foram selecionadas as opção “gaussian model during test”, que permitiu maior precisão de detecção

de spots sobrepostos, e a opção “reduce over-detection of large spots”, que reduz o excesso de detecção de manchas grandes. Feito isso, automaticamente os spots de cada gel foram identificados segundo os mesmos critérios.

O gel que melhor representou o perfil protéico entre todos os géis foi denominado de gel de referência (Figura 3B). Com base neste gel, utilizou-se o aplicativo do PDQuest de criação automática de um gel padrão sintético, denominando de “*master gel*”. Os spots presentes consistentemente em pelo menos 50 % dos géis mas ausentes no gel de referência foram acrescentados ao *master gel* (Figura 3A). O *master gel* representou, portanto, o molde para realização do “*Match*” ou pareamento automático de cada spot em todos os mapas. Para tanto, verificou-se manualmente o match de cada spot e os potenciais artefatos que haviam sido considerados como spots foram excluídos. Spots presentes nas principais regiões do gel foram usados como marco e o ajuste final dos spots foi obtido após extensivas comparações entre os mesmos em cada gel individual, o gel de referencia e o master gel (MOURA *et al.*, 2006a). A quantificação dos *spots* nos géis foi dada através da total da densidade óptica integrada dos spots em todos os géis e expressa em ppm, de acordo com o aplicativo do PDQuest.

Em função de estudos anteriores conduzidos sobre o proteoma do plasma seminal e fluido das glândulas sexuais acessórias e da cauda do epidídimo (KILLIAN *et al.*, 1993; GERENA *et al.*, 1997; MOURA *et al.*, 2006a; MOURA *et al.*, 2010), foram definidos valores de peso molecular e ponto isoelétrico de spots conhecidos como BSP A1, BSP 5, TIMP-2, clusterina, albumina e transferrina. A partir destas informações, estimou-se, através do próprio software, a massa molecular e pI dos demais spot dos mapas bidimensionais obtidos no presente estudo.

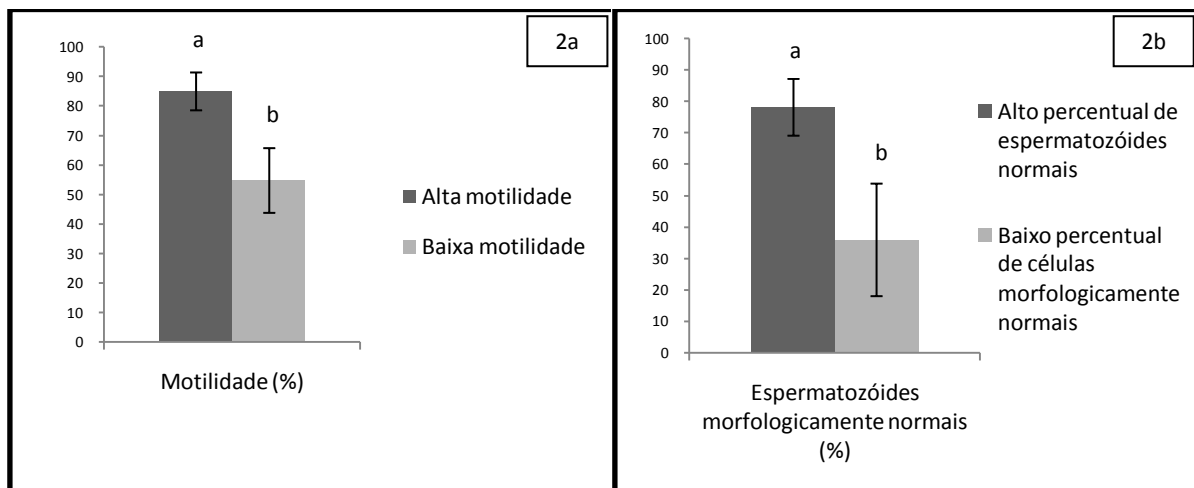
### 3.5. Análise Estatística

Os touros foram divididos em grupos de alta e baixa motilidade espermática e alto e baixo percentual de células espermáticas morfolologicamente normais. Esta divisão foi realizada segundo a mediana daquelas características, obtidas pelo procedimento MEANS do programa estatístico SAS (SAS, 2002). Os valores de intensidade óptica total integrada de cada spot dos 56 mapas foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, assimetria e curtose por meio do procedimento UNIVARIATE do SAS. Os valores de intensidade dos spots que apresentaram distribuição normal foram considerados variáveis paramétricas e os valores que não apresentaram tal distribuição foram submetidos à transformação logarítmica ( $\log(x + 1)$ ). Destas variáveis transformadas, as que apresentaram uma aproximação da distribuição normal também foram consideradas paramétricas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal, mesmo após a transformação, foram consideradas não paramétricas.

Os valores de intensidade paramétricos foram avaliados entre os grupos de alta e baixa motilidade e alto e baixo percentual de células morfolologicamente normais pela análise de variância por meio do procedimento GLM e comparados pelo teste t de Student do pacote estatístico SAS. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos estudados pelo teste de Mann-Whitney por meio do procedimento NPAR1WAY do programa SAS.

## 4. RESULTADOS

Os touros apresentaram ejaculados com, em média,  $70,4 \pm 18$  % de motilidade e  $60,1 \pm 2$  % de células morfolologicamente normais. Animais com sêmen de elevada motilidade apresentaram em média 84,5 % de células móveis, em contraste com os touros de reduzida motilidade espermática, com 55,6 %. A diferença entre os animais com elevada e baixa percentagem de espermatozóides normais foi de 40,6%, dado que o primeiro grupo apresentou valor médio de 80,4 % e o segundo, de 39,8 % de células normais nos ejaculados (Tabela 1).



**Figura 2.** 2a: Motilidade dos espermatozóides de touros *Bos indicus* agrupados de acordo com a mediana da percentagem de espermatozóides móveis nas amostras de sêmen (Alta motilidade  $\geq 75$  % e baixa motilidade  $< 75$  %). 2b: Percentual de células morfolologicamente normais agrupadas de acordo com a mediana da percentagem de espermatozóides normais nas amostras de sêmen (Alto percentual de espermatozóides normais  $\geq 69$ % e baixo percentual de espermatozóides normais  $< 69$ %). Os valores são apresentados como médias e respectivos erros-padrão. Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

A análise dos mapas bidimensionais através do software PDQuest permitiu a detecção de  $167,7 \pm 26$  spots por gel, com uma variação de 250 a 129. Com base no máster gel (Figura 3A), que incluiu todas as proteínas do gel de referência (Figura 3B) e os spots consistentemente presentes em pelo menos 50 % dos demais géis, verificou-se que vários

grupos de proteínas são expressas como isoformas, especialmente aquelas indicadas nas seqüências A, B, C, D, E e F (Figura 3A).

**Tabela 01.** Valores de motilidade (Mot), percentual de espermatozóides morfologicamente normais (Normal), Circunferência escrotal (CE) e peso dos touros *Bos indicus*, raça Brahman

<b>Touro</b>	<b>Mot (%)</b>	<b>Normal (%)</b>	<b>CE (cm)</b>	<b>Peso (kg)</b>
1	95	83	33,5	403
2	50	68	30,5	399
3	50	21	31	392
4	50	52	28	354
5	50	37	28,5	398
6	80	83	30,5	432
7	90	59	30	406
8	90	86	30,5	403
9	85	70	29,5	423
10	50	76	28	326
11	80	73	33	399
12	90	72	32	399
13	50	90	32	356
14	80	78	29	381
15	70	32	31	403
16	75	40	29,5	347
17	75	85	29,5	345
18	90	91	32	392
19	90	53	31,5	355
20	90	49	30,5	381
21	85	94	28,5	328
22	65	13	28	366
23	50	77	27,5	341
24	85	80	30,5	334
25	40	56	27,5	374
26	50	50	26,5	322
27	60	62	25,5	304
28	60	24	26	340
29	50	6	29,5	352
30	70	74	26	340
31	75	50	26,5	362
32	50	79	33,5	392
33	65	13	26,5	410
34	85	91	27	344
35	75	61	31	328
36	60	74	29	344
37	85	61	27,5	344
38	30	18	28,5	344
39	75	73	29,5	356
40	85	89	32,5	272
41	95	89	24,5	334
42	50	51	26,5	340
43	65	32	31,5	280
44	90	13	28	300
45	70	46	23,5	306
46	65	60	28	326
47	90	89	29	354
48	30	80	28	316
49	65	78	28	328
50	50	11	25	312
51	65	51	25	318
52	85	70	30,5	322
53	95	74	29,5	328
54	80	81	33,5	374
55	80	71	27	336
56	90	60	25,5	288

Figura 3A

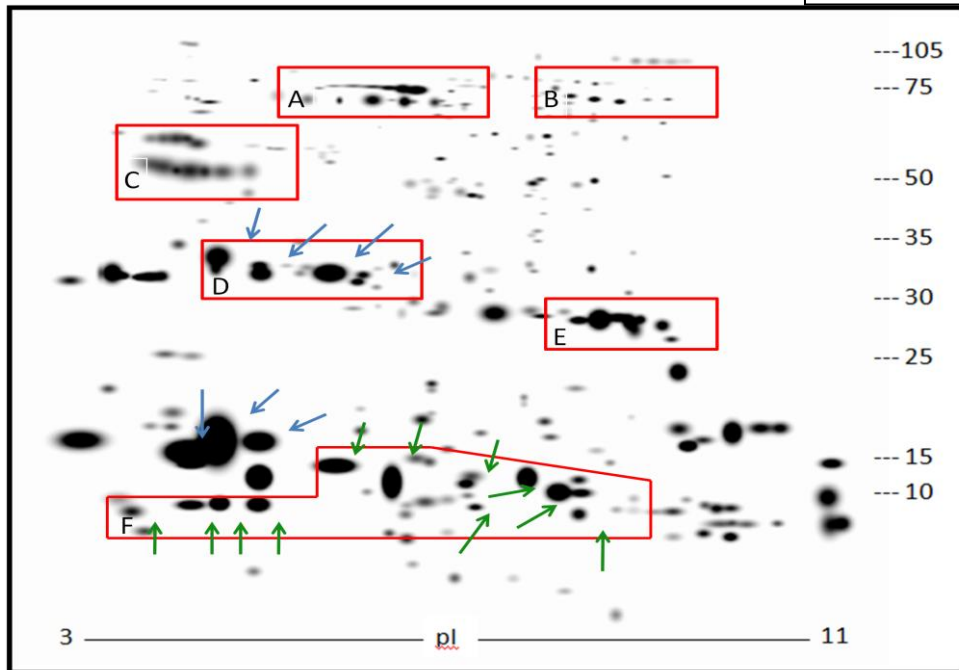
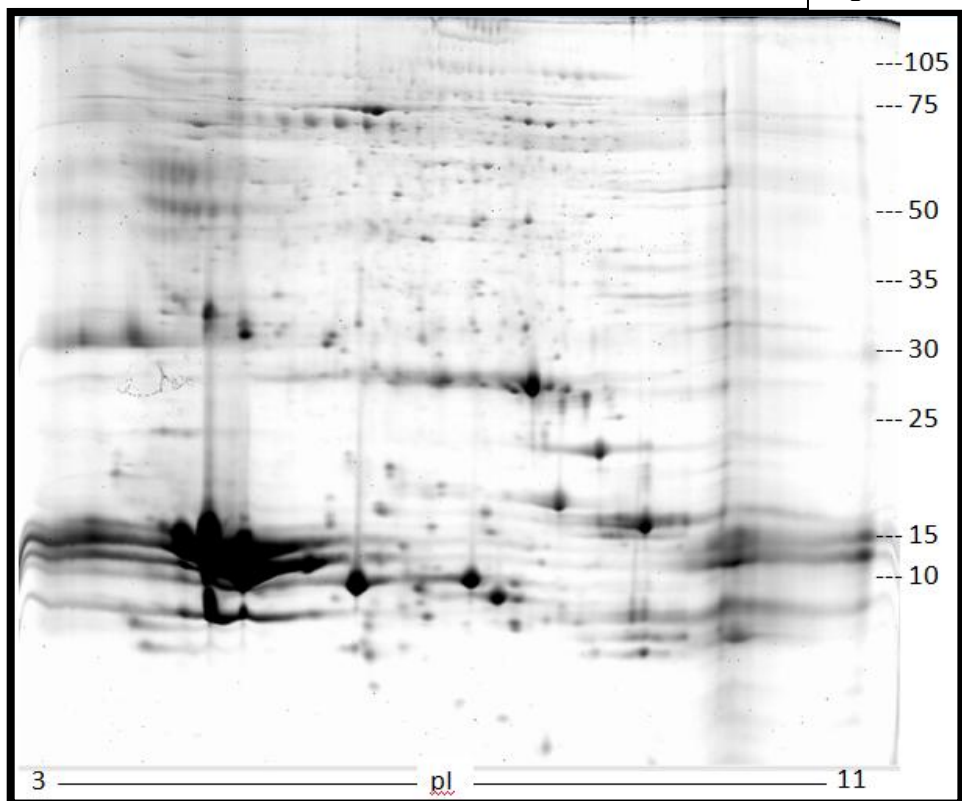


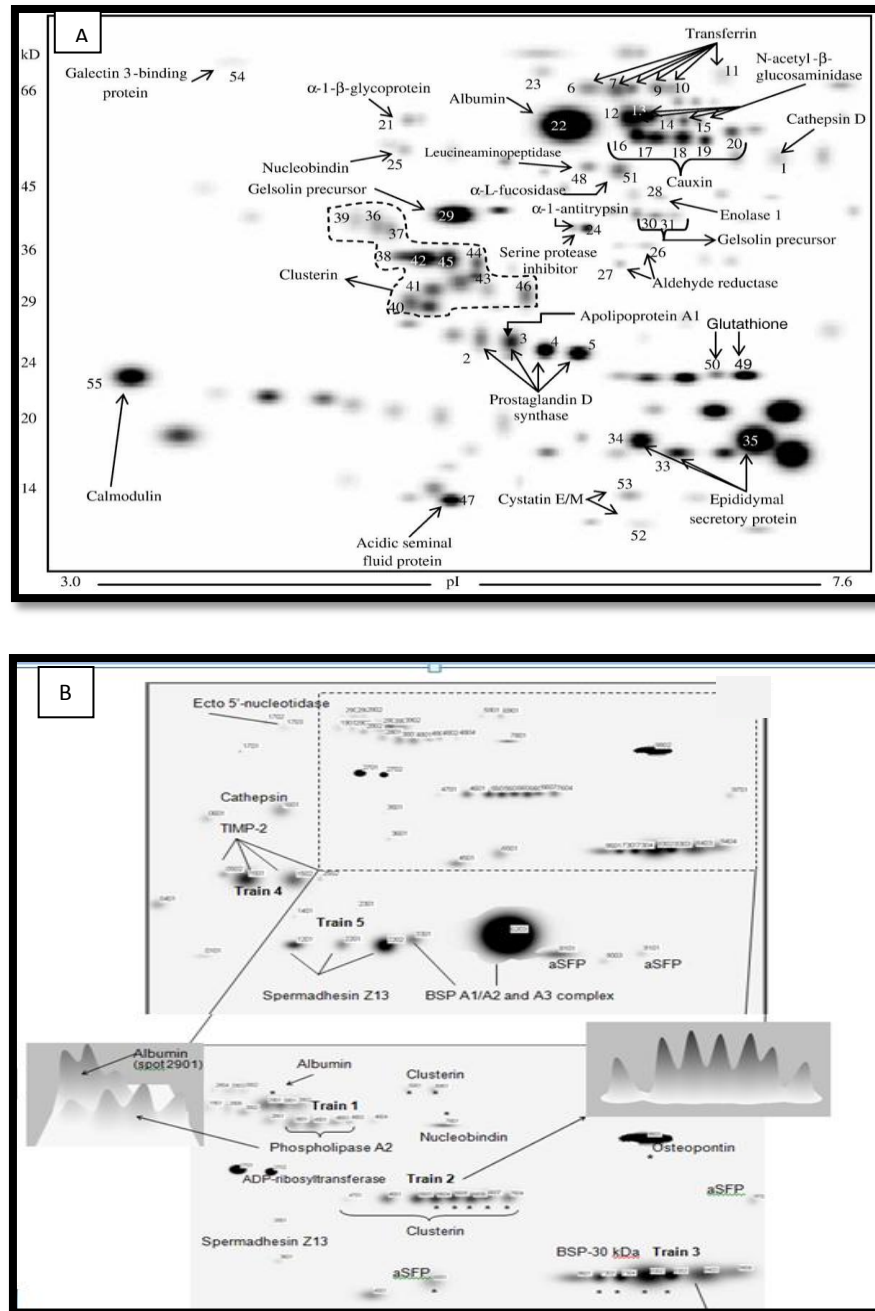
Figura 3B



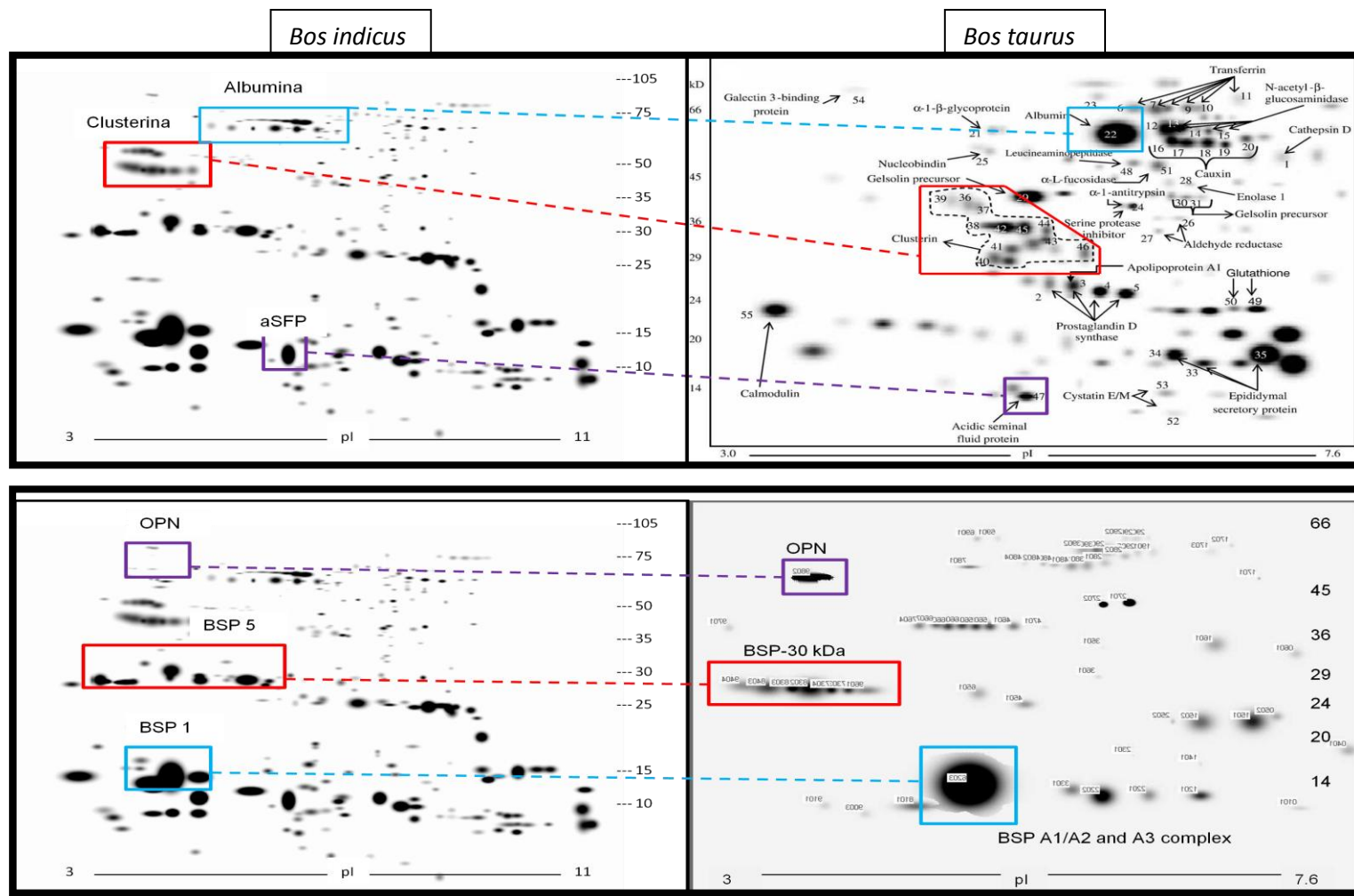
**Figura 3.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* adultos. A figura 3A representa o gel sintético gerado pelo software PDQuest (Bio Rad, USA), construído a partir da combinação dos *spots* de todos os géis utilizados. As letras A, B, C, D, E e F indicam as isoformas de proteínas, setas azuis apontam as proteínas BSPs e setas verdes evidenciam as espermadésinas. A Figura 3B corresponde à imagem do gel de referência.



Os géis montados no presente estudo foram comparados com aqueles previamente publicados sobre o proteoma das glândulas sexuais acessórias e da cauda do epidídimo de animais *Bos taurus* adultos (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010) (Figura 4) e, com base nos valores de pI, massa molecular e intensidade dos spots protéicos, identificou-se por comparação, as principais proteínas expressas nos géis dos touros da *Bos indicus*.



**Figura 4.** Perfil protéico do fluido da cauda do epidídimo (A) e glândulas sexuais acessórias (B) de animais *Bos taurus* adultos (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010)

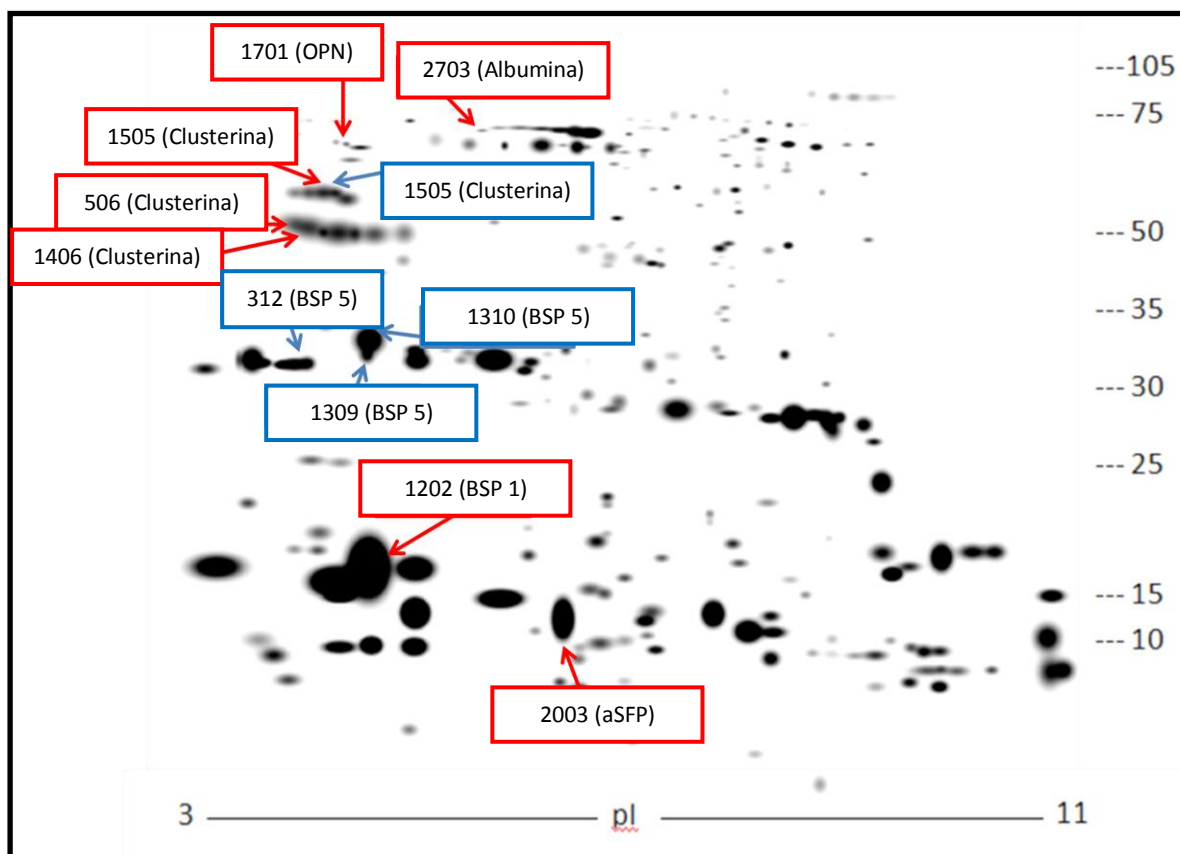


**FIGURA 5.** Comparação entre o mapa protéico do plasma seminal de *Bos indicus* (à esquerda) e proteínas das glândulas sexuais acessórias (A) e proteínas da cauda do epidídimo (B) de *Bos taurus* (à direita) adultos (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010).

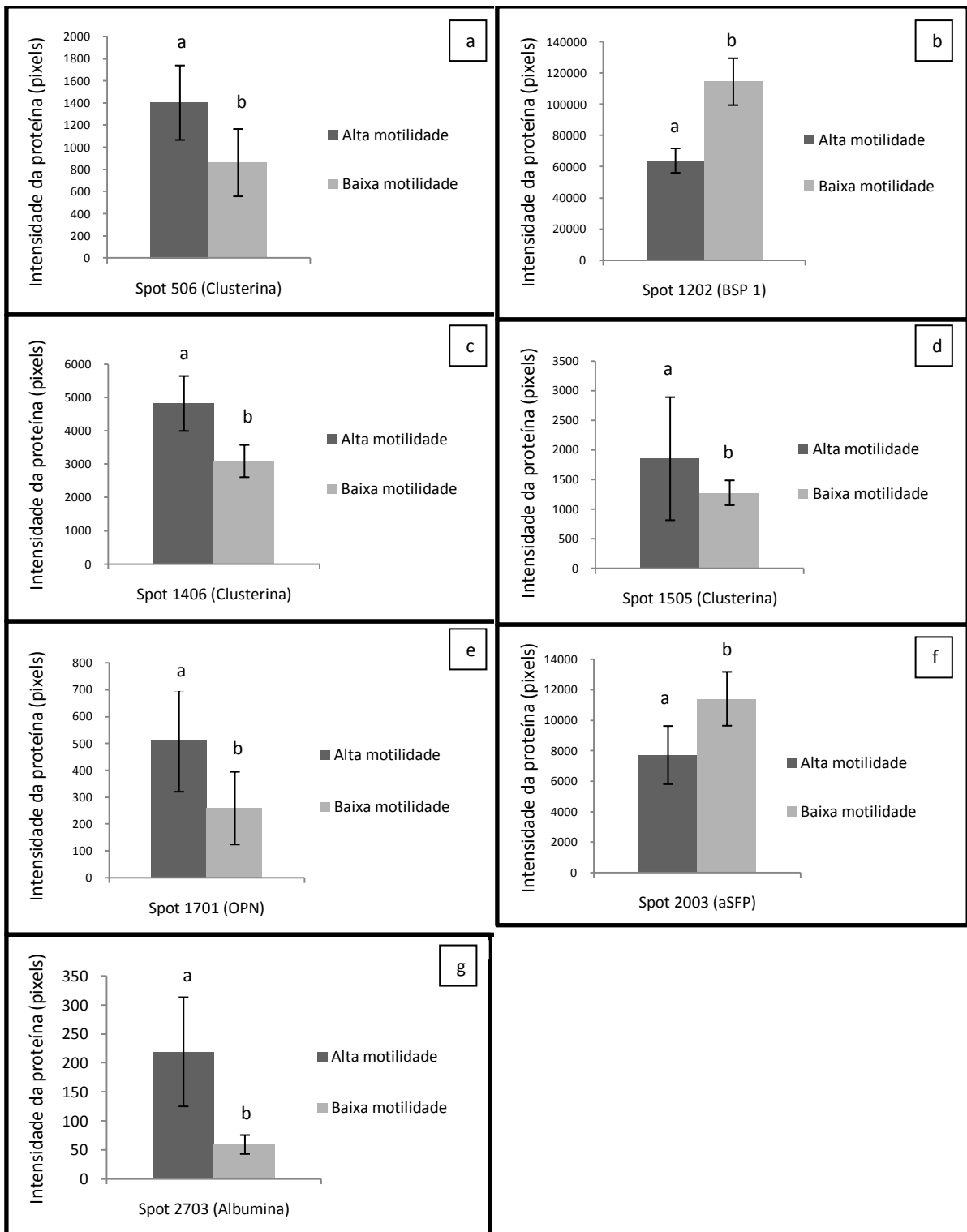
As proteínas mais abundantes no plasma seminal dos touros *Bos indicus* e detectadas em todos os 56 géis apresentaram semelhança com espermadesinas e BSPs (Figura 3A). A intensidade dos spots classificados como BSPs e espermadesinas representou 39% e 10,3%, respectivamente, da intensidade total de todos os spots detectados nos mapas. A intensidade dos spots equivalentes às proteínas clusterina, TIMP-2 e albumina representaram, respectivamente, 6,2%, 2,6% e 4% da intensidade total dos mapas eletroforéticos do plasma seminal dos touros *Bos indicus*.

Os animais cujas amostras de sêmen foram avaliadas como de alta e baixa motilidade espermática apresentaram expressão diferenciada ( $p < 0,05$ ) com relação a sete spots (506, 1202, 1406, 1505, 1701, 2003 e 2703) nos mapas protéicos do plasma seminal. Novamente em função da separação destes spots nos géis e comparações com estudos prévios realizados sobre o proteoma do fluido da cauda do epidídimo e fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010), os spots 506 (47,1 kDa, pI 4), 1406 (46,3 kDa, 4,3 pI) e 1505 (52,8 kDa, pI 4,7) foram semelhantes à clusterina, o spot 1202 (14,7 kDa, pI 5) como BSP 1 e o spot 2003 (27,8 kDa, pI 6,2), à espermadesina. Spots identificados com o número 1701 (66,5 kDa, pI 4,8) equivalem à osteopontina e o spot 2703 (71 kDa, pI 5,6), como pertencente a isoformas de albuminas (Figuras 4 e 5).

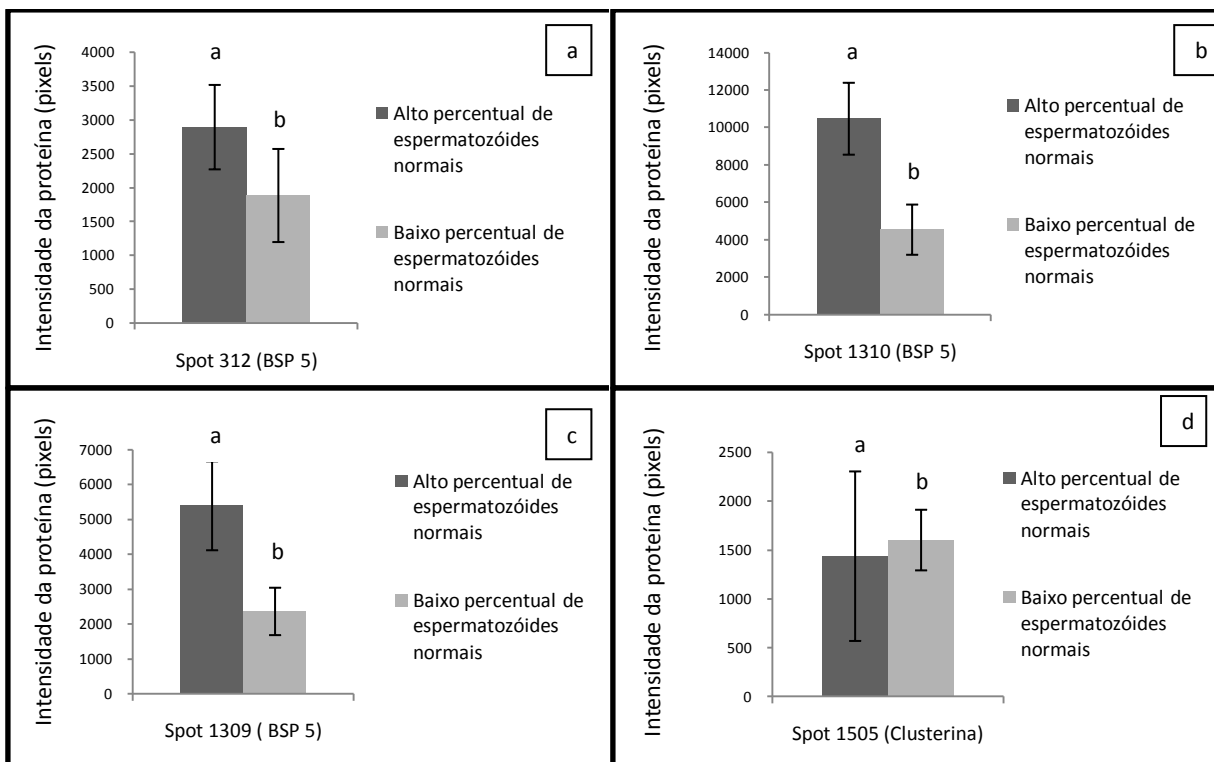
As intensidades de 4 spots (312, 1309, 1310 e 1505) diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os géis dos animais do grupo de alta e baixa porcentagem de espermatozóides normais (Figura 7). Considerando os mapas protéicos das proteínas das glândulas sexuais acessórias e da cauda do epidídimo de animais *Bos taurus*, determinados em estudos anteriores (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010), verificou-se que os spots 312 (29,1 kDa, pI 4,2), 1309 (29,9 kDa, pI 5) e 1310 (31,6 kDa, pI 5) são equivalentes à família das proteínas BSPs e o spot 1505 (52,8 kDa, pI 4,7) apresenta distribuição semelhantes à migração da clusterina nos géis bidimensionais (Figura 4 e 5).



**Figura 6.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* adultos. As intensidades dos spots indicados em vermelho e azul apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos de animais com diferentes valores de motilidade espermática e percentagem de células normais, respectivamente.



**Figura 7.** Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 506, 1202, 1406, 1505, 1701, 2003 e 2703 no mapa bidimensional do plasma seminal de touros *Bos indicus* agrupados de acordo com a percentagem de espermatozóides móveis nas amostras de sêmen (Alta motilidade  $\geq$  75%; Baixa motilidade  $<$  75%). Os números dos spots referem-se àqueles mostrados na Figura 5. Em parênteses a proteína na qual o número do spot se refere. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 312, 1309, 1310, 1505 e 2703 no mapa bidimensional do plasma seminal de touros *Bos indicus* agrupados de acordo com o percentual de espermatozoides normais nas amostras de sêmen (Alto percentual de espermatozoides normais: motilidade  $\geq 69\%$ ; Baixo percentual de espermatozoides normais: motilidade  $< 69\%$ ). Os números dos spots referem-se àqueles mostrados na Figura 5. Em parênteses a proteína na qual o número do spot se refere. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Com a utilização de uma metodologia com base no processo de eletroforese bidimensional e análise computadorizada dos géis, apresenta-se neste trabalho o mapa das proteínas do plasma seminal de animais *Bos indicus* adultos e a descrição de spots cuja expressão associa-se diferencialmente a grupos de animais previamente selecionados de acordo com os parâmetros de motilidade e morfologia espermática. Tais parâmetros tem importância fundamental no processo de avaliação de reprodutores bovinos em rebanhos de corte utilizados em sistemas de monta natural ou para produção de sêmen para inseminação artificial. De fato, estudos mostram que o percentual de células normais foi considerada como a variável com relação mais significativa com a fertilidade de touros *Bos indicus* criados a pasto e avaliados em sucessivas estações de monta na Austrália (MCGOWAN et al., 2008).

Após a análises dos mapas protéicos através do software PDQuest, o spot 1202 apresentou massa molecular e ponto isoelétrico (14,7 kDa, pI 5) semelhantes aos da BSP-1 e a expressão desse spot foi maior no grupo de animais com reduzida motilidade espermática. As proteínas BSPs são secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas e atuam tipicamente na capacitação espermática (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002). Estas proteínas ligam-se ao espermatozóide por ocasião da ejaculação e permanecem associadas às células espermáticas mesmo após o contato com os fluidos do ístmo e ampola do oviduto (THÉRIEN et al., 1998; SOUZA et al., 2008). Os espermatozóides sofrem capacitação quando há um efluxo de colesterol da membrana lipídica (ZARINTAS & CROSS, 1996) e esta liberação de colesterol resulta em alterações na arquitetura da membrana, aumentando a permeabilidade da bicamada lipídica (CROSS, 1998). Como o efluxo de colesterol depende da concentração e tempo de exposição das células às BSPs, quanto maior a concentração de proteínas BSPs ou uma maior a exposição (como no sêmen não diluído), maior será a quantidade de colesterol e

fosfolipídios removidos, resultando na desestabilização da membrana plasmática (MANJUNATH et al., 2002). Tal processo de desestabilização da membrana, caso ocorra em demasia, pode de alguma maneira interferir negativamente na motilidade espermática, essa afirmação provavelmente justifica a maior expressão do spot 1202 nos animais com reduzida motilidade espermática. Confirmando esta hipótese, Roncoletta et al. (2006) mostraram que touros com sêmen de baixa fertilidade e congelabilidade foram detectados com maior concentração de BSP 3 em géis de extrato protéico oriundo da membrana de espermatozóides ejaculados.

Os spots de número 312 (29,1 kDa, pI 4,2), 1309 (29,9 kDa, pI 5) e 1310 (31,6 kDa, pI 5) também apresentaram valores de kDa e pI semelhantes à BSP 5 e foram expressos com maior intensidade nos animais com elevado percentual de células morfologicamente normais. A razão para a existência deste tipo de correlação entre a BSP 5 e a morfologia dos espermatozóides não é clara porque o processo de definição deste parâmetro é inerente à espermatogênese e maturação epididimária e não a eventos delimitados por mecanismos pós-ejaculação. A BSP 5, semelhante às demais formas das BSPs, é sintetizada nas glândulas sexuais acessórias e entra em contato com as células espermáticas somente no momento da ejaculação. É certo que as BSPs ligam-se aos espermatozóides com extrema afinidade e permanecem associadas aos mesmos após o contato destes com os fluidos do oviduto e após os processos de capacitação e reação acrossômica (SOUZA et al., 2008). Resultados não publicados (MOURA et al., 2011) indicam ainda que as BSPs permanecem associadas às membranas espermáticas mesmo após sucessivas lavagens e centrifugações. Há evidência, portanto, de que as BSPs ligam-se aos espermatozóides, mas estudos mais detalhados precisam ser conduzidos para esclarecer potenciais influências destas proteínas sobre aspectos morfológicos dos gametas.



No presente estudo, o spot 2003 (27,8 kDa, pI 6,2) apresentou massa molecular e ponto isoelétrico equivalente à aSFP e apresentou maior intensidade no grupo de touros com menor percentual de espermatozóides móveis no sêmen. Schoneck et al. (1996), trabalhando com espermatozóides bovinos, observaram que a motilidade dos espermatozóides foi significativamente menor quando estas células estavam em contato com maiores níveis de aSFP. No touro, os espermatozóides armazenados antes da ejaculação na ampola, onde há altos níveis de aSFP, sofrem um efeito de preservação de energia por restringir a motilidade (SCHONECK et al., 1996). A aSFP liga-se à superfície do espermatozóide bovino no ejaculado, contudo, é quantitativamente liberada durante a capacitação *in vitro* (DOSTALOVA et al., 1994).

Estes relatos justificam a maior expressão desta proteína no grupo de menor motilidade. A aSFP pertence à família das espermadesinas (CALVETE et al., 1995). Isto sugere que a aSFP atua como fator decapacitante do espermatozóide bovino, ao invés de molécula de ligação à zona pelúcida, não possuindo, assim, um papel na interação de gametas (DOSTALOVA et al., 1994).

Recentemente uma nova proteína da família das espermadesinas do plasma seminal de bovino foi purificada, sendo denominada de SPADH-2 ou Z13. É um polipeptídeo não-glicosilado de 13 kDa, sem afinidade por heparina, que possui 116 resíduos de aminoácidos, os quais apresentam 53% de similaridade com a aSFP e 43 % de homologia com os SPMI encontrados no PS humano (ROBERT & GAGNON, 1996; TEDESCHI et al., 2000). A maior diferença significativa entre Z13 e as outras espermadesinas encontra-se na existência de um quinto resíduo de cisteína (C89) na primeira molécula (TEDESCHI et al., 2000). Moura et al. (2006a) e Killian et al. (1993) relacionaram a espermadesina Z13 à baixa fertilidade do touro. Moura et al., (2006a) sugerem que a menor fertilidade de touros com altos níveis de

espermedesina Z13 deva-se à capacidade desta proteína de alterar aspectos da motilidade espermática.

Outro spot identificado no mapa eletroforético como o spot 2703 (71 kDa, pI 5,6) apresentou maior expressão em touros com maior percentual de células móveis no sêmen. Em função da localização deste spot no gel bidimensional, sugere-se que seja a albumina, um componente multifuncional que está presente tanto no fluido da cauda do epidídimo como nas secreções das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010). A albumina protege a membrana espermática ligando-se aos peróxidos de lipídeos e reduzindo assim os efeitos danosos destes compostos à membrana (ALVAREZ & STOREY, 1995). Esta proteína também foi associada com a capacitação espermática, já que, promove profundas alterações na membrana do espermatozóide, incluindo o efluxo do colesterol da membrana plasmática (YANAGIMACHI, 1994, VISCONTI et al., 1998; FLESCH & GADELLA, 2000). Embora o sítio fisiológico da capacitação seja o aparelho reprodutivo feminino, o espermatozóide pode ser capacitado *in vitro*, em meio contendo adequadas concentrações de eletrólitos, fontes de energia metabólica e albumina (GO & WOLF, 1985). A albumina modula a perda de colesterol da membrana plasmática, aumentando sua permeabilidade a íons cálcio e bicarbonatos e que subsequente ativamente o sistema de adenilato ciclase ou fosfodiesterases (VISCONTI & KOPF, 1998). A partir daí, ocorre uma elevação do AMPc que resulta na ativação da proteína kinase A, que ativa a tirosina kinase ou inativa a tirosina fosfostases, mecanismos responsáveis pela capacitação (FLESCH & GADELLA, 2000). Estas alterações bioquímicas promovem uma alteração transitória no padrão de motilidade espermática, denominada hiperativação (YANAGIMACHI, 1994). A hiperativação espermática é um processo que os espermatozoides sofrem durante a passagem no oviduto da fêmea, sendo descrito como um movimento vigoroso, não progressivo e não linear (VERSTEGENS et al., 2002). Durante a hiperativação, o padrão e o vigor da trajetória

do espermatozóide são alterados, passando a ser caracterizados por uma larga amplitude do batimento flagelar, aumento médio do movimento lateral da cabeça e da cauda do espermatozóide associados também com uma motilidade lenta ou não progressiva de baixa frequência de batimento flagelar (MORTIMER & MORTIMER, 1990; SUAREZ, 1996; KAY & ROBERTSON, 1998; VERSTEGEN et al., 2002). No presente estudo, a albumina apresentou intensidade maior nas amostras de plasma seminal dos reprodutores bovinos com alta motilidade espermática. A albumina age na redistribuição e extração de colesterol da membrana aumentando a permeabilidade iônica, predispondo a célula à reação acrossômica e a hiperativação da motilidade (DE MIRANDE et al., 1997; FLESCHE & GADELLA, 2000), isto explica a maior intensidade desta proteína nos animais com alta motilidade espermática. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Dott et al. (1979), onde a albumina sérica bovina, quando adicionada a espermatozoides epididimários incubados com o plasma, epididimário ou seminal, estimulou a motilidade espermática.

Os spots 506 (47,1 kDa, pI 4), 1406 (46,3 kDa, 4,3 pI) e 1505 (52,8 kDa, pI 4,7) foram caracterizados como clusterina, em função dos respectivos valores de massa molecular e ponto isoelétrico nos mapas eletroforéticos bidimensionais do plasma seminal. Os spots 506, 1406 e 1505 apresentaram maior expressão nos mapas eletroforéticos de animais com maior motilidade espermática sendo que a intensidade do spot 1505 foi mais elevada no plasma seminal de animais com menor percentagem de células morfológicamente normais. A clusterina está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo adesão e agregação celular (BLASCHUK et al., 1983), maturação espermática (SYLVESTER et al., 1991) e proteção das membranas celulares expostas a moléculas hidrofóbicas potencialmente tóxicas nas barreiras fluido-teciduals (ARONOW et al., 1993). A clusterina também pode agir como uma chaperona, associando e solubilizando proteínas parcialmente desestruturadas, reduzindo a citotoxicidade da precipitação protéica induzida por

estresses celulares (HUMPHREYS et al., 1999), o que poderia ser importante para a proteção dos espermatozóides no aparelho reprodutivo feminino (ROSENBORG & SILKENSEN, 1995; MERI & JARVA, 2001). Este achado pode justificar a maior intensidade da clusterina no grupo de maior motilidade já que esta proteína pode diminuir a toxicidade da precipitação protéica que provavelmente causa danos à membrana celular e assim interfere na motilidade do espermatozóide. A expressão do spot 1505 foi associada ao grupo de menor porcentagem de células morfologicamente normais. Como esta proteína pode estar envolvida com o processo de maturação espermática (HERMO et al, 1991), uma grande exposição do espermatozóide a essas proteínas pode causar danos à membrana celular por um processo de ação semelhante ao das BSPs.

As características de migração do spot 1701 (66,5 kDa, pI 4,8) nos mapas eletroforéticos bidimensionais do plasma seminal foram semelhantes à osteopontina (MOURA et al., 2006; MOURA et al. 2007). A OPN é uma proteína de 55kDa mas, nos fluidos do trato reprodutivo bovino, foram encontradas isoformas de 14 a 70 kDa (ERIKSON et al., 2007), isoformas estas geradas possivelmente através de modificações pós-traducionais (PATARCA et al., 1993; MOURA, 2005). Foi demonstrado que a OPN liga-se à membrana de espermatozóides bovinos ejaculados (SOUZA et al., 2008) e, considerando que essa é uma molécula que atua na adesão celular, é possível supor que esta proteína esteja envolvida diretamente na interação entre espermatozóide e oócito (MOURA, 2005; GONÇALVES et al., 2007). A OPN promove a capacitação dos espermatozóides através de mecanismos ainda indeterminados e aumenta a viabilidade espermática, provavelmente por bloquear vias apoptóticas (ERIKSON et al., 2007).

No presente estudo, a maior expressão de osteopontina foi relacionada aos touros que apresentaram elevada porcentagem de células móveis no sêmen. A osteopontina

liga-se aos espermatozóides através de receptores de integrina e CD44 e possivelmente ativam sistemas de mensageiros secundários intracelulares que potencialmente regulam mecanismos associados à motilidade espermática (MOURA et al., 2007; SOUZA et al., 2008). Outro ponto importante refere-se ao fato de que a OPN bovina possui um sítio de ligação ao cálcio (DENHARDT et al., 2001), elemento responsável por modificações bioquímicas essenciais para a função normal do espermatozóide (NISHIMURA, 1993) e, no meio intracelular, exerce papel nos processos de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fertilização. Além disso, o cálcio intracelular é o principal elemento para a motilidade flagelar e fusão da vesícula acrossomal (DARSZON et al., 1999). A motilidade hiperativada é definida como o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozóide no sítio de fertilização. O cálcio possui uma importante função na regulação da motilidade hiperativada (SUAREZ & HO, 2003), atuando principalmente no axonema, embora pouco se saiba de seu modo de ação. Lima et al. (2006), trabalhando com sêmen de suínos, observaram resultados mais favoráveis à motilidade espermática em animais que foram submetidos a maiores níveis de  $\text{CaCl}_2$  (5,0 e 7,5 mM) em comparação com aqueles cujas amostras de sêmen foram submetidas a menores níveis deste sal. Chinoy et al. (1983) também observaram que íons cálcio em níveis adequados, mostraram-se essenciais para a motilidade espermática. Neste trabalho, a expressão da OPN foi maior no grupo que apresentou maior percentual de espermatozóides móveis. Dado que o  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à OPN, sugere-se que a OPN pode influenciar indiretamente a motilidade espermática via ligação com  $\text{Ca}^{2+}$ . Embora esta seja uma hipótese plausível, avaliações experimentais são necessárias para a caracterização funcional da OPN e sua relação com  $\text{Ca}^{2+}$  e motilidade espermática.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho descreve pela primeira vez, o perfil eletroforético bidimensional das proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* adultos. Com base nas características destas proteínas, o que inclui os pontos isoelétricos, massas moleculares e intensidades nos géis, concluiu-se que as proteínas mais abundantes no plasma seminal destes animais pertencem às famílias das BSPs e espermedesinas. Vários grupos de proteínas são expressos também como isoformas no PS destes animais, como as próprias BSPs e espermedesinas, clusterina, albumina, TIMP-2 e transferrina.

A expressão de spots com valores de kDa e pI equivalentes aos das proteínas aSFP, BSPs, clusterina, albumina e osteopontina foram estatisticamente diferentes entre os grupos de animais com parâmetros contrastantes de motilidade e morfologia espermáticas. As associações encontradas entre tais spots protéicos e os parâmetros seminais sugerem a possibilidade do uso destes como marcadores moleculares da fertilidade potencial dos animais. Entretanto, mais estudos são necessários para a caracterização bioquímica e funcional dessas proteínas a fim de confirmar as associações empíricas apresentadas no presente estudo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **The Urologic Clinics of North America**, v.29, p.817-827, 2002.

ALVAREZ, J.G.; STOREY B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Mol Reprod Dev**. v.42, p.334–346, 1995.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. **Biol Reprod**, Madison, v.28, p.1129-1136, 1983.

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

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.

AYYAGARI, R.R.; FAZLEABAS, A.T.; DAWOOD M.Y. Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. **J Obstet Gynecol**, v.157, p. 1528-33, 1987.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 257–267, 2008.

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.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Mol Reprod Dev**, v.71, p. 461-470, 2005.

BLASCHUK, O.; BURDZY, K; FRITZ, B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **J biol Chem**, 12, p. 7714-7720, 1983.

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, p. 248–254, 1976.

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

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. **Viçosa: UFV**, p. 574, 1998.



CALVETE, J. J.; SANZ, L.; DOSTALOVI, Z.; TOPFER-PETERSEN, E. Spermadhesins: Sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. **Fertilrat I I**, p.35-40, 1995.

CALVETE, J.J.; CARRERA, E.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **Biol Chem**, v.377, p.521-527, 1996.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod**, v.57, p.1293-1301, 1997.

CHINOY, N.J.; VERMA, R.J.; PATEL K.G. Effect of calcium on sperm motility of cauda epididymis in vitro. **Acta Eur Fertil**; v.14, p.421–423, 1983.

CHOW, P.H.; JIANG, H.Y.; POON, H.K.; LEE, K.H.; O. W.S. Embryos sired by males without accessory sex glands induce failure of uterine support: a study of VEGF, MMP and TGF expression in the golden hamster. **Anat Embryol**, v.206, p.203–213, 2003.

CIERO, L. D.; BELLATO, C. M. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.29, p.158-164, 2002.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol of Reprod**, v.59, p.7-11, 1998.

CROSS, N.L. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. **Biology Reproduction**, v.69, p.529–534, 2003.

D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, 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.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; ISHIGAKI, T.; ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Review**. v.79, n.2, p.481-510, 1999.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion human spermatozoa. **Free Radic Biol Med**, v.18, p.487-495, 1995.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p. 48-54, 1997.

DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p. 723-749, 2001.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.13057-13060, 1994.

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

DONALD M. H.; ANDREW J. K.; BRETT R. L.; WILLIAM R. B.; SANDRA L. G. Identification of Insulin-Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility. **Biol Reprod**. v.59, p.330–337, 1998.

DOSTALOVA, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesin in accessory sex gland fluids and on surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. **Biochim Biophys Acta**, v. 1200, p.48-54, 1994.

DOTT, H.M.; HARRISON, R.A.P.; FOSTER, G.C.A. The maintenance of motility and the surfaces properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **J Reprod Fertil**, v.55, p.113-124, 1979.

EINSPANIER, R.; EINSPANIER, A. Isolation of a new growth factor from bovine seminal fluid stimulating uterine and ovarian granulosa cells *in vitro*. **Ada Endocrinologica**, 126 (Supplement 4), 44, 1992.

EINSPANIER, R.; EINSPANIER, A.; WENPE, F.; SCHEIT, K-H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochem. Bioph. Res. Comm**, v.179, p.1006-1010, 1991.

EINSPANIER, R.; KRAUSE, L.; CALVETE, J.J.; TOPFER-PETERSEN, E.; KLOSTERMEYERB, H.; KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. **FEBBS**, v.344, p.61-64, 1994.

ENTWISTLE, K.; FORDYCE, G. Evaluating and Reporting Bull Fertility. **Australian Association of Cattle Veterinarians**, 2003.

ERIKSON D.W, WAY A.L., BERTOLLA R.P., CHAPMAN D.A., KILLIAN G.J. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. **Anim Reprod**, v.4, n.3/4, p. 103-112, 2007.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goat**. Sydney: Bulterworths, p.194, 1987.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, n. 3, p.197-235, 2000.

FOUCHÉCOURT, S. et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. **Biol Reprod**, Madison, v.62, p.1790-1803, 2000.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS pages characterization of the protein in equine seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v.46, p.579-591, 1996.

GO, K.J.; WOLF, D.P. Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation. **Biol Reprod**, v.32, p.145-153, 1985.

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

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S.; WESER, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. **Electrophoresis**, v.6, p.599-604, 1985.

GRIMA, J.; ZWAIN, I.; LOCKSHIN, R. A.; BARDIN, C. W; CHENG, C. Y. Diverse secretory patterns of clusterin by epididymis and prostate/seminal vesicles undergoing cell regression after orchiectomy. **Endocrinology**, v.126, p.2989-2997, 1990.

HAFEZ, E. S. E. Fertilização e clivagem. In: Hafez, E. S. E. **Fisiologia da Reprodução**. Ed. Manole, 7ª ed. São Paulo, 2004.

HERMO, L.; WRIGHT, J.; OKO, R. MORALES, C. R. Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). **Biol Reprod**, Madison, v.44, p.1113-1131, 1991.

HINTON, B.T.; PALLADINO, M.A.; RUDOLPH, D.; LABUS, J.C. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.731-745, 1995.

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

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

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; CIMAROSTI, H.I.; MATTOS, R.C. Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen 1. **Rev Bras Reprod Anim**, v.26, p.296-305, 2002.

JONES, R. Plasma membrane structure and remodeling during sperm Maturation in the epididymis. **J Reprod Fertil** (Suppl. 53), p.73-84, 1998.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertil Steril**. v.31, p.531-537, 1979.

KAY; V.J.; ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological functions and application in assisted reproduction. **Hum Reprod**, v.4, p.776-786, 1998.

KAZMI, S.; KRULL, I. S. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. **Pharma Genomics**, p.14-29, 2001.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod**, v.49, p. 1202-1207, 1993.

KIRSZBAUM, L.; BOZAS, S. E.; WALKER I. D. SP-4040, a protein involved in the control of the complement pathway, possesses a unique array of disulphide bridges FEES. **Lett**, v,297, p.70-76, 1992.

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

LIMA F.P. ; MURGAS L.D.S.; OLIVEIRA, S.L.; LIMA, D.; ALVARENGA, A.L.N.; FIALHO, E.T. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática e atividade da aspartato amino transferase no sêmen resfriado de suíno. **Cienc agrotec**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1506-1511, set./out., 2007

LUEDTKE, C.C.; MCKEE, M.; CYR, D.G.; GREGORY, M.; KAARTINEN, M.T.; MUI, J. & HERMO, L.; Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biol Reprod**, v.66, p.1437–1448, 2002.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochem J.** v.241, p.685–692, 1987.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol Reprod**, v.50, p.27-37, 1994.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology Reproduction**. v.67, p. 1250 – 1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal Reproduction Immunology**. 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**, v.80, p.394–397, 2009.

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-7, 2001.

METZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma-proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**. v.34, p. 691–700, 1990.



MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins. **Bioch Bioph Acta**, v.1438, p.175-184, 1999.

MORTIME, S.T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **J Androl**, v.11, p.195-203, 1990.

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

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.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.98, p.169-188, 2006b.

MOURA, A.A.; CHAPMAN D.A.; KOC H.; KILLIAN G.J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocytepenetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.214-222, 2007.

MOURA, A.A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B.A.; CHAMPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature. **Journal of Proteomics**, v.73, p.2006-2020, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica, 3ªed**, 2002.

NISHIMURA, K. Effect of calcium ions on the malate-aspartate shuttle in slow-cooled boar spermatozoa. **Biol Reprod**, v.49, p.537 – 543, 1993.

O' FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v.250, p.4007-4021, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. v.405, p.837-846, 2000.

PATARCA R, SAAVEDRA RA, CANTOR H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. **Crit Rev Immunol**, v.13, p.225-246, 1993.

RAO, B. et al. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, v. 24, p.127-134, 1989.

RÊGO, J.P.A. Análise proteômica do plasma seminal de carneiros santa inês adultos. Fortaleza-CE. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia)**. Universidade Federal do Ceará – UFC. Março, 2010.

REINERT, M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MANN, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **Eur J Biochem**, v.242, p.636-640, 1996.

ROBERT M, GAGNON C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. **Biol Reprod**, v.55, p.813–821, 1996.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas. **Embrapa, Comunicado Técnico 136**, 2005.

RODRÍGUEZ, C.M.; DAY, J.R.; KILLIAN, G.J. Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.21, p.414-420, 2000.

ROLDAN, E. R. S.; FRAGIO, C. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.268, p. 13962-13970, 1993.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; ESPER, C.R.; BARNABE, V.H.; FRANCESCHINI, P.H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Anim Reprod Sci**, v.91, p. 77-87, 2006.

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

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microorganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v.77, p.7-17, 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System - Getting Started with the SAS® Learning Edition**. SAS Institute Inc., Cary, USA, 86pp, 2002.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v.45, p.633-642, 1996.

SEIDAH, N. G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J.; SAIRAM, M. R.; CHRÉTIEN, M. complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and the collagen-binding domain of fibronectin. **Biochemical Journal**, v.24, p.195-203, 1987.

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.

SILVA, A. M .S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteomica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em revista**, v.02, p.1-10, 2007.

SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, p.200-205, 1994.

SOUBEYRAND, S.; KHADIR, A.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Purification of a novel phospholipase A(2) from bovine seminal plasma. **J Biol Chem**; v.272, p. 222-227, 1997.

SOUSA. M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.7, p.12-14, 1999.

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

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

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Mol Human Reproduction**, v.3, p.203-213, 1997.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **J Androl**, v.17, p.331-334, 1996.

SUAREZ, S. S.; HO, H. C. Hyperactivation of mammalian sperm. **Cellular and Molecular Biology**. v.49, n. 3, p.351-356, 2003.

SURESH, S.; MOHAN, S. S.; MISHRA, G.; HANUMANTHU, G. R.; SURESH, M.; REDDY, R.; PANDEY, A. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. **Gene**. v.364, p.13-18, 2005.

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

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

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biol Reprod** 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. **Biol Reprod**, v.57, p.1080–1088, 1997.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biol Reprod.** v.59, p.768–776, 1998.

THOMAS, C.J.; ANBAZHAGAN, V.; RAMAKRISHNAN, M.; SULTAN, N.; SUROLIA, I.; SWAMY, M.J. Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study. **Biophys**, v.84, p.3037-3044, 2003.

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

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.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMMER, H.; NING, X. P. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n. 5, p.3235-3242, 1999.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol Reprod**, v.59, n. 1, p.1-6, 1998.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica** - 3ªed. Artmed, p.149-150, 2006.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev.** v.7, p.871–891, 1995.

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

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acid seminal plasma. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, v.183. n.1, p.232-237, 1992.

WHITE, I. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: Hafez E.S.E. **Reprodução Animal**. 4.ed. São Paulo: Manole, p.212-228, 1988.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**. p.243, 1997.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **The Physiology of Reproduction**. New York: E. Knobil e JD Neil. p.189-317, 1994.

YOUNG, L.G.; HINTON, B. T.; GOULD, K.G. Surface changes in Chimpanzee sperm during epididymal transit. **Biol Reprod**, v.32, n.2, p. 399-412, 1985.



ZARINTASH, R.J.; CROSS, N.L. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. **Biol Reprod**, v.55, p. 19-24, 1996.

