

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
PROTEÍNAS DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS
DE *Equus caballus*

GLAUBER MONTEIRO DIAS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia, área de concentração:
Biologia Celular.

Orientador: Prof^o Claudio Andrés Retamal Martínez
Co-Orientador: Prof^a Maria Luisa López Alvarez

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
Outubro de 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
PROTEÍNAS DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS
DE *Equus caballus*

GLAUBER MONTEIRO DIAS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia, área de concentração:
Biologia Celular.

Aprovada em 11 de outubro de 2006

Comissão examinadora

Prof. Ângelo José Burla Dias - UENF

Prof. Elias Walter Alves - UENF

Prof. Jonas Enrique Aguilar Perales - FIOCRUZ

Prof. Claudio Andrés Retamal Martínez – UENF (Orientador)

Dedico este trabalho à minha filha Júlia Monken Dias

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UENF, FIOCRUZ, FAPERJ e TECNORTE pelas instalações e suporte financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço aos Professores desta universidade, bem como de outras instituições, que contribuíram com a realização desta dissertação através da disponibilização de materiais e equipamentos utilizados e até mesmo com sugestões, idéias, boa vontade e compreensão.

Agradeço enormemente o apoio técnico dos Srs. Arthur Rodrigues e Jucélia Araújo. Agradeço ao Dr. Alexander Henk pela disponibilidade em me receber e analisar minhas amostras no espectrômetro de massas na Fiocruz.

Não posso esquecer dos amigos de laboratório que mais me ajudaram do que atrapalharam: Roberta, Nathália, Thaísa, Renata, Tânia, Paula, as Fernandas Ventorin, Rodrigues e Brasil, Pink e Joseph. Muito obrigado!

Agradeço muito às orientações e ensinamentos dos Profs. Cláudio Andrés Retamal e Maria Luisa López.

Agradeço ao Prof. Victor Flores pela revisão rigorosa desta dissertação e aos Profs. Jonas Perales, Ângelo Dias e Elias W. Alves, que aceitaram o convite para avaliar este trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, que não são muitos, mas são leais.

Agradeço em especial ao meu Pai, minha Mãe, meu irmão, meu sogro e sogra, meus tios, primos, comadre e afilhada linda.

Agradeço à minha mulher Priscila pelo exemplo e tempo dedicados a mim e, agora, à nossa pequena família. Amo você. Obrigado pela “coisinha linda do papai!”

E por fim, eu agradeço à Deus, pela coragem de propor, enfrentar e superar os desafios.

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Resumo	ii
Abstract	iii
1- Introdução	1
2 - Revisão bibliográfica	4
2.1 - O epidídimo: Aspectos gerais.....	4
2.2 - Maturação espermática.....	8
a) Proteínas da superfície espermática.....	9
b) Proteínas do flagelo.....	13
2.3 – Análise proteômica de espermatozóides de mamíferos.....	17
3 - Objetivo Geral	19
3.1 - Objetivos Específicos	19
4 - Materiais e Métodos	20
4.1 - Obtenção dos espermatozóides epididimários.....	20
4.2 - Marcação das proteínas sulfidriladas.....	20
4.3 - Extração das proteínas espermáticas.....	21
4.4 - Determinação da concentração de proteínas.....	23
4.5 - Eletroforese unidimensional.....	23
4.6 - Eletroforeses bidimensionais.....	24
4.7 - Purificação das proteínas espermáticas de géis de poliacrilamida.....	27
4.8 - Coloração dos géis por impregnação por prata.....	27
4.9 - Análise densitométrica.....	27
4.10 - Análise de proteínas por espectrometria de massas MALDI ToF-ToF..	28
5 - Resultados	31
5.1 - Análise proteômica das proteínas totais de espermatozóides epididimários.....	31
5.2 - Detecção de proteínas tióis (SH) de espermatozóides epididimários.....	37
5.3 - Análise das proteínas das frações de cabeça e flagelo espermáticos.....	42

5.4 - Análise proteômica das frações enriquecidas em membranas espermáticas.....	55
5.5 - Estudo dos estados de agregação das proteínas espermáticas.....	60
6 - Discussão.....	66
7 - Conclusões.....	77
8 - Referências Bibliográficas.....	79

ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ACN	Acetonitrila
ADAM	“A disintegrin and metalloprotease”
β -ME	β -mercaptoetanol
BSA	Albumina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate
CRISP	“Cystein rich secretory protein”
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
Fn-2	Fibronectina tipo 2
G3PDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GST	Glutathione S-transferase
HSP	“Horse sperm protein”
IPG	“Immobilized pH gradient”
MALDI TOF	“Matrix assisted laser desorption ionization Time of Flight”
mBBr	monobromobimane
CUB	Componente do complemento Clr/Cls , Uegf , e proteína 1 morfogênica do osso (Bone)
AWN	Espermadesinas AWN
MP1	Frações enriquecidas em membranas solubilizadas com Triton X-100
MP2	Frações enriquecidas em membranas, delipidadas e solubilizadas com Triton X-100
MP3	Frações enriquecidas em membranas, delipidadas e solubilizadas com SDS
MS	Mass spectrometry – análise de massas dos peptídeos tripticos
MS/MS	Mass spectrometry-mass spectrometry – seqüenciamento aminoacídico dos peptídeos tripticos
NCBI	“National Center for biotechnology Information”
ODF	Fibras densas externas
PAGE	Eletroforese em géis de poliacrilamida
PBS	Tampão salino fosfato
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PMSF	“Phenyl Methylsulfonyl fluoride”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S-S	dissulfeto
TEMED	N',N',N',N' – tetrametiletlenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TPI	Triose fosfato isomerase
Tris	Tris (hidroximetil) amino etano
UV	Ultra-violeta
VDAC	Canal aniônico dependente de voltagem

RESUMO

Os espermatozoides de mamíferos sofrem uma série de complexas e seqüenciais mudanças bioquímicas e morfológicas no epidídimo. Como resultado, o espermatozoide adquire um padrão de motilidade maduro e habilidade para reconhecer e ligar-se a zona pelúcida. Entre estas mudanças, ocorre um amplo remodelamento do perfil protéico e glicoprotéico do espermatozoide, através de fatores presentes no microambiente epididimário. O objetivo desta tese foi caracterizar e identificar proteínas de espermatozoides epididimários de *E. caballus* mediante técnicas eletroforéticas e espectrometria de massas. Nossos resultados revelaram diferenças no perfil protéico de espermatozoides obtidos das diferentes regiões epididimárias. Alguns polipeptídeos detectados em espermatozoides maduros não foram observados ou se encontraram em baixa concentração em espermatozoides imaturos, enquanto outros apresentaram mobilidade eletroforética e concentração relativa semelhantes em amostras obtidas das regiões de cabeça proximal/distal, corpo e cauda epididimárias. A eletroforese 2D de alta resolução (2D-PAGE) demonstrou a presença de cadeias polipeptídicas sob a forma de trilhos ou "spots" isolados de intensidade e distribuição diferentes (entre pH 5.0-7.5; 9-10), com peso molecular entre 107-15 kDa. A maioria das proteínas parecem ser polimórficas visualizando-se como trilhos de manchas que poderiam corresponder a isoformas de diferentes pls. Os nossos experimentos sugerem a presença de agregados moleculares entre proteínas espermáticas majoritárias, como a proteína de 70 kDa, assim como a existência de ligações dissulfeto entre estas proteínas. A oxidação dos grupos SH espermáticos durante o percurso do gameta pelo epidídimo também foi demonstrada. 24 polipeptídeos foram identificados por espectrometria de massas MALDI ToF-ToF e pesquisa em banco de seqüências de proteínas, entre elas, as enzimas dissulfeto isomerase e triosefosfato isomerase, as proteínas citoesqueléticas, α e β -tubulinas e componentes estruturais como a proteína das fibras densas externas 2 (ODF2). Apesar dos numerosos estudos sobre as características funcionais/estruturais do espermatozoide, muito ainda resta por conhecer sobre a estrutura, função e as remodelações das diferentes macromoléculas espermáticas durante o processo de maturação no epidídimo.

ABSTRACT

Mammalian spermatozoa undergo a series of complex and sequential biochemical and morphological changes in the epididymis. As a result of these modifications, the spermatozoon acquire a mature motility pattern and the ability to recognize and binding to the zona pelucida. Among these changes, a wide remodeling of sperm protein and glycoprotein profile occurs, through factors present in the epididymal microenvironment. The aim of this work was to characterize and identify sperm proteins of *E. caballus* using electrophoretic techniques coupled with mass spectrometry. Our results revealed differences in the sperm protein profile depending of the epididymidis region from which they were collected. Some polypeptides detected in mature spermatozoa were either absent or present in a low concentration in immature sperm cells, others presented similar electrophoretic mobility and relative concentration in samples obtained from the caput, corpus and cauda epididymal regions. High resolution 2D gel electrophoresis (2D-PAGE) showed many proteins displayed as isolated spots or trains of proteins of different intensity and distribution (between pH 5.0-7.5; 9-10) whose molecular weight ranged between 107-15 kDa. Most proteins appeared to be polymorphic and they occurred as trains of several spots that would correspond to isoforms of different isoelectric points (pIs). Our experiments suggest the existence of molecular complexes among majority proteins, as a 70 kDa protein and the presence of disulphide linkages among those proteins. Oxidation of sperm SH groups during epididymal transit was, also, showed. Twenty-four polypeptides were identified by MALDI ToF-ToF mass spectrometry and protein databank research, some of them were enzymes, such as disulphide isomerase and triosephosphate isomerase; others were cytoskeleton-associated proteins such as α and β -tubulins or structural components as a protein of outer dense fiber 2 (ODF2). Despite the numerous reports about functional and structural characteristics of mammalian spermatozoa, further studies are necessary to determine the structure and function of the different macromolecules present in this cell, as well as about the extensive remodeling that suffer during the epididymal maturation process.

INTRODUÇÃO

O processo reprodutivo tem despertado curiosidade durante séculos. Nas últimas décadas um dos focos de interesse dos pesquisadores têm sido o/os mecanismo(s) molecular(es) que possibilita(m) ou impede(m) a união dos gametas. Entre as moléculas-chaves deste processo, proteínas, lipídeos e glicídios específicos têm sido postulados como promotores diretos ou indiretos da aproximação, reconhecimento e fusão celular.

O espermatozóide maduro é consequência de uma série de eventos complexos e interdependentes, que progridem de forma seqüencial e altamente regulada. Uma etapa importante do processo de diferenciação espermática é a extensa remodelação da superfície do gameta, que se inicia na espermatogênese e continua durante todo o percurso do gameta pelas vias seminais do macho e da fêmea até atingir o ovócito. Cada etapa é mediada por um número significativo de proteínas. Consequentemente os genes que as codificam podem ser considerados como genes potenciais de fertilidade masculina (Leeb, et al., 2005). Enormes progressos estão sendo alcançados com a descoberta de aberrações genéticas que levam a infertilidade em humanos e camundongos. Baseados em estudos de genética humana e camundongos “knockout” mais de 200 genes têm sido associados com fertilidade masculina. Alguns deles foram também detectados em eqüinos. Contudo, ainda não têm sido identificados marcadores genéticos da performance reprodutiva de garanhões.

A qualidade espermática, em termos de motilidade e de reconhecimento do ovócito, é fortemente dependente das modificações pós-testiculares que ocorrem durante o processo de maturação espermática no epidídimo (Gatti et al., 2004). O mecanismo exato que torna fértil a célula espermática não está elucidado, mas as mudanças da superfície que ocorrem em resposta às interações do gameta com as secreções epididimárias são cruciais neste processo. Sob controle de andrógenos, o epitélio epididimário secreta proteínas as quais, associadas a exosomas ou epididimosomas, são transferidas ao espermatozóide

(Sullivan et al., 2005). Há proteínas que são secretadas como isoformas específicas, e só mostram homologia parcial com outras proteínas conhecidas. Algumas proteínas podem interagir com o espermatozóide enquanto outras poderiam agir como moléculas sinalizadoras.

Clivagem e remodelação de proteínas integrais da membrana espermática é outro mecanismo responsável pelas modificações seqüenciais que experimenta a membrana espermática durante o percurso epididimário. Concomitantemente, formas precursoras inativas se convertem em moléculas funcionalmente ativas. O mecanismo que media ou controla este processo, a ordem e tempo no qual ocorre, e sua importância relativa no potencial fertilizante do gameta não está bem estabelecida. A participação de proteases, glicosidases e glicosil-transferases tem sido amplamente postulada (Retamal, 1999; Dias, 2002; Dacheux et al., 2003; Tulsiani, 2003; Dias et al., 2004).

Um aspecto interessante da expressão gênica no epidídimo é o alto grau de regionalização do padrão de expressão do RNAm. A expressão regional de cada gene pode refletir funções diferentes. Análises eletroforéticas e proteômicas do fluido luminal demonstram que essas proteínas apresentam um padrão de distribuição diferente ao longo do conduto, sendo que as regiões proximais apresentaram maior atividade secretora (Gatti et al., 2004; Sullivan et al., 2005). Muitos genes somáticos e germinativos se expressam exclusivamente ou exibem altos níveis de expressão nesta região, enquanto outros genes só se expressam na região do corpo ou na cauda epididimária. A alta expressão de genes na região proximal deste órgão sugere que nela aconteceriam eventos iniciais do processo de maturação; entretanto genes que se expressam na região distal poderiam estar relacionados com a manutenção da função espermática durante a armazenagem dos espermatozóides (Cornwall e Hann, 1995).

Estudos realizados em nosso laboratório, utilizando como modelo experimental *Equus caballus*, demonstraram diferenças nas cargas de superfície, na distribuição e/ou densidade de receptores de lectinas e no perfil protéico,

glicoprotéico e lipídico de espermatozóides imaturos e maduros obtidos de diferentes regiões do epidídimo e de ejaculado (López et al., 1987; López e de Souza, 1991; López, 1996; Retamal, 1999; Retamal et al., 1999, 2000a; Dias, 2002; Dias, 2004; Dias et al., 2004). Algumas proteínas presentes em espermatozóides maduros foram purificadas e seqüenciadas. Entre elas, uma glicoproteína Rf 0,45 (20kDa) que apresentou uma seqüência aminoacídica terminal similar à HSP1 descrita por Calvette et al. (1995) em plasma seminal (Retamal, 1999). Postula-se que esta proteína de 121 aminoácidos participaria na interação espermatozóide-zona pelúcida (Retamal et al., 1999).

A identificação de moléculas que participam da interação espermatozóide - oócito, bem como sua caracterização estrutural e funcional, contribuirão significativamente ao conhecimento do processo de fertilização em mamíferos, e talvez possa sugerir novos alvos para procedimentos contraceptivos.

As reorganizações e rearranjos estruturais não se limitam à membrana espermática, mas ocorrem em diversas estruturas do gameta afetando o metabolismo, padrão de motilidade, estrutura do acrossoma, características nucleares, etc. O núcleo espermático, já altamente condensado devido à substituição das histonas nucleares por protaminas, aumenta significativamente seu grau de compactação e estabilidade durante o percurso epididimário (Eddy e O'Brian, 1994). Pontes dissulfeto intra e intermoleculares entre resíduos cisteína presentes nas protaminas nucleares são responsáveis pela estabilização do complexo DNA - protamina durante o processo de maturação espermática (Balhorn, 1982; Dias, 2004; Dias et al., 2006). Esta estabilização confere ao núcleo uma maior resistência durante seu percurso pelas vias seminais e no trato reprodutivo da fêmea e facilita a penetração do espermatozóide à zona pelúcida (Bedford e Calvin, 1974; Dias, 2004). Proteínas sulfidriladas também estabilizam estruturas do aparelho flagelar como é a bainha mitocondrial e as fibras densas que recobrem o axonema central, ao nível da peça intermediária do espermatozóide. A oxidação das proteínas espermáticas durante o tráfego pelo epidídimo se relaciona diretamente com o aumento da

fosforilação das proteínas do flagelo e da cabeça do espermatozóide. Esse efeito parece se dever não a ativação de proteínas quinases, mas sim a inibição de fosfatases por oxidação dos tióis internos, mais especificamente da fosfotirosina fosfatase (PTP) (Seligman et al., 2004). Grupamentos tióis também fazem parte de algumas enzimas e moléculas antioxidantes, que poderiam participar na transdução de sinais durante a capacitação espermática (De Lamirande e Gagnon, 1998; 2003).

O melhor conhecimento das proteínas presentes em espermatozoides imaturos e maduros é um passo inicial na obtenção de marcadores que permitam estabelecer o potencial fertilizante de um gametócito. Apesar dos numerosos trabalhos existentes sobre características estruturais e funcionais do espermatozóide, muito resta por conhecer em relação à estrutura e função das diferentes macromoléculas nele presentes, bem como das modificações que experimentam durante o processo de maturação espermática.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O epidídimo: Aspectos gerais

O epidídimo é um órgão localizado na borda medial do testículo, faz parte das vias seminais superiores e tem como função principal gerar um microambiente que promova a sobrevivência e maturação dos espermatozoides (Hinton e Palladino, 1995; Hinton et al., 1996). Origina-se nos dutos eferentes, no ponto que estes se unem para formar um ducto único altamente enovelado, cujo comprimento varia nas diferentes espécies, alcançando até 60m nos grandes mamíferos. De forma irregular, distinguem-se nele três regiões macroscopicamente bem definidas, denominadas comumente de: cabeça, corpo e cauda (Robaire e Hermo, 1988). A cabeça do epidídimo normalmente é subdividida em regiões proximal e distal (Fig. 1).

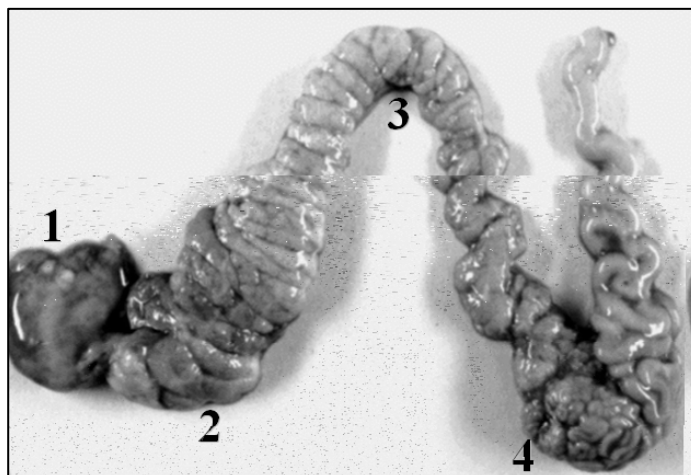


Figura 1: Morfologia do epidídimo eqüino. Regiões de cabeça proximal (1), cabeça distal (2), corpo (3) e cauda (4) do epidídimo.

As características morfológicas, limites, componentes e funções de cada uma delas podem variar entre espécies. Em eqüinos, como em humanos, a região proximal da cabeça é parte do extenso sistema de condutos eferentes. A cauda epididimária é inconspícua no homem, no entanto em grande parte das espécies é uma estrutura bulbosa. Nesta região os espermatozoides podem ser estocados, mantendo importantes reservas que representam o conteúdo de mais que dez ejaculados (Fournier-Delpech e Thibault, 1993). O epitélio epididimário apresenta diferenças região-específicas nas suas características morfológicas e funcionais ao longo do conduto (López et al., 1987, Retamal et al., 2000b). Na região da cabeça epididimária, proteínas e outros componentes do fluido da *rete testis* são modificados pelas atividades de absorção e secreção das células da região proximal do epidídimo. A atividade secretora das células epididimárias contribui significativamente para a renovação e regulação da composição do fluido luminal (Hinton e Palladino, 1995).

Os espermatozoides epididimários são mantidos em estado quiescente por fatores do fluido luminal, sendo seu transporte o resultado das contrações espontâneas dos elementos contráteis da parede do ducto e da pressão hidrostática existente no interior do epidídimo (Bedford, 1994). A concentração de

espermatozóides, que é baixa no fluido dos túbulos seminíferos e *rete testis*, aumenta na região distal do epidídimo, dada a grande absorção de água que ocorre nos condutos eferentes e região proximal desse órgão. Em associação a esta perda, há modificações importantes no conteúdo de alguns íons (Harper, 1994). Embora o ambiente epididimário promova ativamente a maturação e sobrevivência do gameta, nem todos os espermatozóides permanecem viáveis durante sua permanência no epidídimo (Cooper e Hamilton, 1977, Holstein, 1978; Weissenberg et al, 1994, López e Bustos, 1995). A proteção dos espermatozóides contra substâncias tóxicas, como xenobióticos ou espécies reativas de oxigênio é outra importante função epididimária (Hinton et al., 1995). Entre as proteínas que promovem a sobrevivência espermática neste órgão incluem proteínas envolvidas na conjugação de glutatona e seu metabolismo (Hinton et al., 1996; Robaire e Viger, 1995), a glicoproteína-2 sulfatada (SGP-2 ou clusterina) (Griswold et al., 1986; Collard e Griswold, 1987; Sylvester et al., 1991) que inibe a lise celular mediada pelo complemento, inibidores de proteases tais como proteína HE4 (Kirchhoff et al., 1998) e as proteínas da família CRES (Cornwall et al., 1992) que protegem espermatozóides da degradação proteolítica.

Diversos estudos têm demonstrado o dinamismo fisiológico e bioquímico entre proteínas sintetizadas/secretadas pelo epidídimo e proteínas espermáticas (Frenette et al., 2002; Saez et al., 2003; Gatti et al., 2003). Recentemente foram descobertos complexos de alto peso molecular (maiores que 1MDa) no fluido epididimário - os epididimossomas. Estas estruturas contêm algumas proteínas hidrofóbicas ligadas e postula-se ser um outro mecanismo de transporte de proteínas para espermatozóides epididimários (Gatti et al., 2004). Enquanto, parte das proteínas hidrofóbicas do fluido está ligada aos epididimossomas, outras proteínas permanecem na fase solúvel após a remoção das vesículas por centrifugação de alta velocidade (Gatti et al., 2003). Entre as proteínas que são transferidas aos espermatozóides pelos epididimossomas estão duas enzimas envolvidas na via de poliols: uma aldo-redutase e uma sorbitol desidrogenase. Uma citocina chamada MIF (fator inibitório da migração de macrófagos) tem sido postulada como uma outra proteína associada à

epididimosomas (Sullivan et al., 2005). Estes autores sugerem que essas proteínas estariam envolvidas na modulação da motilidade espermática. Estudos *in vitro* indicam que a transferência de proteínas a domínios específicos da membrana espermática é saturável, e temperatura e pH -dependente. A presença de zinco (e não de cálcio ou magnésio) aumenta significativamente a transferência destas proteínas (Sullivan et al., 2005).

Controvérsias ainda existem a respeito da localização e expressão de algumas proteínas espermáticas. A P26h tem sido relacionada com fertilidade em touros e hamsters. São proteínas tipo carbonil redutase, que estão ancoradas à membrana espermática via glicosilfosfatidil inositol, e têm sido detectadas em espermatozóides e epididimosomas (Frenette e Sullivan, 2001; Légaré et al., 1998). Essa proteína de 26kDa foi encontrada na superfície acrossomal de espermatozóides de hamster e no fluido epididimário coletado da cabeça a cauda epididimária (Sullivan e Robitaille, 1989; Robitaille et al., 1991). O RNA mensageiro (mRNA) da P26h é fortemente expresso no testículo de hamster e, em um nível, menor no corpo do epidídimo (Robitaille et al., 1991; Berube et al., 1996). Esta proteína mostra uma afinidade espécie-específica com as glicoproteínas da zona pelúcida (Berube et al., 1996; Sullivan e Bleau, 1985) a qual é inibida pelo antisoro policlonal anti-P26h de maneira dose-dependente (Berube e Sullivan, 1994).

Contrariamente, Nagdas et al. (2006) mostraram que a P26h, hoje chamada de MP26, não está presente na fração de membrana plasmática e tampouco no fluido epididimário de cauda. Seus resultados confirmaram que se trataria de uma carbonil redutase da superfamília desidrogenase/reductase de cadeia curta. Análise por 2D-PAGE de homogeneizados de espermatozóides da cauda epididimária de hamster mostrou a presença de uma única isoforma da MP26 (pI 9.0). Porém, os dados de fracionamento bioquímico e imunocitoquímicos demonstraram que a MP26 está localizada na fração mitocondrial e que, também, não é secretada pelo epidídimo. Os ensaios de Nagdas e colaboradores sugerem que a MP26, assim como a fosfolípido hidropéroxido glutathiona peroxidase (GPX4), é um componente

da membrana mitocondrial externa (cápsula), que é formada por proteínas da membrana externa da mitocôndria que são interligadas extensivamente por pontes dissulfeto durante a maturação espermática. Apesar de não estar definida a função espermática da MP26, sugere-se que possa estar envolvida na detoxificação de compostos carbonil derivados da peroxidação lipídica (Nagdas et al., 2006).

Demonstrações que proteases estão envolvidas na ativação de proteínas presentes no fluido epididimário e na superfície do espermatozóide reforçam o papel das secreções epididimárias na maturação espermática. Tipler et al. (1997) tem descrito a presença de proteossomas em espermatozóides humanos e de camundongos, porém sua função biológica em espermatozóides de mamíferos é uma área ainda pouco explorada. Muitos componentes secretados no fluido epididimário precisam sofrer proteólise para serem inseridos na membrana do espermatozóide. Estas modificações certamente aumentam as propriedades hidrofóbicas ou expõe seqüências hidrofóbicas específicas que permitem que este processo possa ocorrer. Alternativamente, pode permitir reconhecimento por receptores de superfície específicos (Gatti et al., 2004).

Maturação espermática

No conduto epididimário os espermatozóides sofrem uma série de modificações em suas características físicas, bioquímicas, morfológicas e fisiológicas, reunidas sob a denominação genérica de maturação espermática. A maturação espermática é avaliada pelo seu efeito final no gameta masculino: aquisição de motilidade e habilidade de reconhecer, ligar-se à zona pelúcida e fundir-se com o ovócito. Ensaio de inseminação *in vitro* com espermatozóides obtidos das diferentes regiões do epidídimo mostram um aumento do potencial de fertilidade entre cabeça e corpo alcançando o máximo na região da cauda epididimária, onde o

epidídimo (Burkin e Miller, 2000). Reconhecimento e fusão envolvem componentes específicos e domínios na superfície do espermatozóide.

a) Proteínas da superfície espermática

Diversas metodologias, como marcação com lectinas, anticorpos, precursores radioativos; análise por microscopia de força atômica; recuperação de fluorescência após fotobranqueamento (FRAP) e perda de fluorescência em fotocloreamento (FLIP), entre outras, têm mostrado que grandes mudanças ocorrem na composição de proteínas e lipídeos dos diferentes domínios da membrana espermática durante o trânsito pelo epidídimo (Dacheux et al., 1984; Voglmayr et al., 1985; Yanagimachi, 1994, López, 1996; Retamal, 1999, Ellis et al., 2002). Um aspecto interessante da diferenciação da superfície espermática é que algumas proteínas envolvidas no reconhecimento e união à zona pelúcida, inicialmente, estão inseridas de forma uniforme na membrana plasmática e como consequência de remodelações posteriores, localizam-se em domínios específicos onde se tornam funcionais. Essas mudanças resultam de diferentes mecanismos incluindo redistribuição ou desaparecimento por processamento proteolítico, ação de enzimas glicolíticas e integração de novos componentes sintetizados pelo epidídimo (Hunnicut et al., 1997; Okamura et al., 1992; Eccleston et al., 1994). Exemplos de proteínas proteoliticamente processadas durante o trânsito pelas vias seminais são as proteínas da família ADAM, incluindo a fertilina (pH30), ciritestina e testase (Evans, 1999). Essas proteínas, também conhecidas como MDC (Metaloproteases Desintegrinas ricas em Cisteína), possuem um domínio desintegrina homólogo às desintegrinas de venenos de serpente e podem interagir com integrinas mediando a ligação espermatozóide - ovócito ou a fusão de membranas dos gametas (Em: Evans, 1999). Um grande número de proteínas epididimárias tem sido descritas como sendo integradas na membrana do espermatozóide durante o percurso pelo epidídimo, entretanto, não se sabe exatamente se elas são simplesmente adsorvidas em sua superfície, estabelecem interações iônicas, ou se inserem na membrana (Cooper, 1998).

Um exemplo de componentes que são completamente removidos do espermatozóide durante o trânsito epididimário é a enzima conversora de angiotensina-I (ACE) presente na superfície da peça intermediária e da peça principal do flagelo (Gatti et al., 1999; Métayer et al., 2002b). A proteína é, então, liberada no fluido em uma forma ativa e pode ser encontrada posteriormente no plasma seminal (Métayer et al., 2001).

Clusterina é uma das proteínas secretadas pelo epidídimo que se encontram associadas com a membrana do espermatozóide (Howes et al., 1998). Entretanto, apenas certas isoformas desta proteína (80 kDa) se ligam à membrana do espermatozóide morfológicamente alterado. Esta associação pode estar relacionada à integridade do gameta (O'Bryan et al., 1994). O tipo de interação não é conhecido podendo interagir com a membrana por sua atividade chaperona ou por simples adsorção devido a sua alta concentração extracelular.

Em carneiro, α -manosidase é secretada nas regiões da cabeça-corpo epididimárias na forma de 135 kDa e um fragmento desta proteína (27 kDa) é encontrado inserido no segmento equatorial da cabeça do espermatozóide (Okamura et al., 1992, 1995). Em espermatozóides maduros, este fragmento está concentrado na região apical da cabeça.

Um grande número dessas proteínas têm sido propostas como essenciais para fertilidade. Essa afirmação é baseada em resultados experimentais nos quais a ligação espermatozóide – ovócito é inibida com anticorpos contra proteínas específicas de membrana, ou proteínas e peptídeos recombinantes ligantes de receptores de superfície; além disto machos que tiveram esses genes silenciados (“knockout”) se mostraram inférteis (Esther et al., 1996; Evans, 2001). A remoção de uma proteína de superfície resulta no decréscimo ou na ausência de outros componentes da superfície celular (Evans, 2001; Nishimura et al., 2001) sugerindo que a arquitetura da superfície espermática depende do correto posicionamento de todos os componentes. A perda de um desses componentes

pode comprometer a formação ou a própria maturação de outras proteínas de membrana durante o trânsito epididimário o que, por sua vez, pode ser refletido como baixa taxa de fertilidade.

Numerosas tentativas têm sido realizadas no intuito de se estabelecer marcadores de fertilidade em machos. A P34H no espermatozóide humano na região

oligoméricas, e não as monoméricas, têm demonstrado essa habilidade (Calvete et al., 1999). A ligação dessas proteínas na superfície espermática deve preceder os processos de capacitação induzidos por heparina (Müller et al., 1998; Manjunath e Therien, 2002).

As proteínas da família CRISP (proteínas secretoras ricas em cisteína) - CRISP1, CRISP2, CRISP3 - são caracterizadas por 16 resíduos cisteína invariantes. Todos os resíduos cisteína estão envolvidos em pontes dissulfeto, assim, subdividindo a molécula em três domínios, uma região N-terminal de aproximadamente 50 aminoácidos, um agrupamento de cisteína N-terminal formado por três ligações dissulfeto e um domínio C-terminal rico em cisteína contendo 10 resíduos cisteína. CRISP2 e CRISP1 são expressas nos testículos e epidídimo respectivamente, enquanto CRISP3 (AEG2) é predominantemente expressa na ampola do vaso deferente. Diversos membros da família CRISP têm sido encontrados em várias funções relacionadas à fusão espermatozóide - oócito. CRISP1 ou AEG1 (glicoproteína epididimária acídica 1), antigamente chamada proteína DE, se associa fortemente à superfície espermática durante o trânsito epididimário e migra ao segmento equatorial durante a capacitação (Da Ros et al., 2004). Ela participa na fusão dos gametas através de sítios de ligação complementares (Cuasnicu et al., 2001), entretanto, não participa nos eventos de ativação do ovócito (Busso et al., 2003). Uma análise inicial da função estrutural indica que o correto padrão de ligações dissulfeto na molécula é crucial para sua função (Ellerman et al., 2002). Estas proteínas podem ser inseridas na membrana do espermatozóide após a remoção proteolítica de sua região carboxi-terminal (Roberts et al., 2002).

As proteínas CRISP espermáticas de eqüinos estão localizadas na região equatorial e pós-acrossomal da cabeça, bem como, na peça intermediária do flagelo. Sua associação com a superfície espermática começa na região de corpo do epidídimo (Schambony et al., 1998). Pode-se dizer que as moléculas de CRISP1 e/ou CRISP2 devam exercer uma função direta nos últimos eventos de fertilização

(fusão espermatozóide-oócito), enquanto CRISP3 parece contribuir para as funções do plasma seminal no trato genital feminino.

As espermadesinas, contendo 110-133 aminoácidos, representam também uma família de proteínas que se associam a superfície do espermatozóide durante o percurso no trato reprodutor masculino. Essas moléculas compreendem um único domínio CUB (Bork e Beckmann, 1993), que é estabilizado por duas pontes dissulfeto conservadas com resíduos cisteína vizinhos e consiste de um sanduíche β feito por duas folhas β (Romero et al., 1997). As espermadesinas são proteínas multifuncionais exibindo habilidades ligantes à heparina, inibidores de proteases, fosfolipídeos e carboidratos (Töpfer-Petersen et al., 1998; Töpfer-Petersen, 1999a,b). Demonstrou-se que proteínas AWN se ligam à zona pelúcida de eqüinos (Reinert et al., 1996). As espermadesinas têm sido identificadas apenas em espécies unguladas (ex.: porco, boi e cavalo). Nessas espécies encontram-se as espermadesinas AWN, AQN-1, AQN-2, PSP-I e PSP-II. A AWN é secretada pela cauda do epidídimo de machos e, também, nos ovidutos do trato genital da fêmea (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2002), porém também já foi detectada em espermatogônias, *rete testis*, ao longo do ducto epididimário e vesícula seminal (Reinert et al., 1997; Hoshiba e Sinowitz, 1998). A presença da AWN eqüina em espermatozoides testiculares e o aumento de sua associação ao espermatozóide durante o tráfego epididimário também têm sido verificados (Töpfer-Petersen et al., 2005).

b) Proteínas do flagelo

Em espermatozoides de mamíferos, o flagelo apresenta três segmentos bem definidos: a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal. No primeiro segmento, a bainha mitocondrial envolve as fibras densas externas (ODF) e o axonema composto por 9 pares de microtúbulos que circunda 1 par central (Fig. 2). Na peça intermediária existem nove ODF cada uma sendo conectada com um par de microtúbulos do axonema. A estrutura de todo o flagelo é composta por diversos componentes citoesqueléticos. A grande diferença encontrada na peça principal em

relação ao segmento intermediário é a perda da bainha mitocondrial e o aparecimento da capa fibrosa (FS) que segue até o final da peça terminal, concomitantemente com o afinamento do axonema (Davies Morel, 1999).

Figura 2: Esquema do espermatozóide eqüino. Corte transversal da peça intermediária do flagelo. Fonte: Davies Morel, 1999.

Durante o processo de maturação epididimária, os espermatozóides adquirem a motilidade progressiva unidirecional. Nas vias genitais da fêmea os espermatozóides passam por uma série de processos preparatórios prévios a fertilização, eles se ativam e capacitam na região do istmo do oviduto. Aparentemente são eventos independentes que envolvem mudanças em regiões específicas da membrana espermática, como conseqüência das interações com o microambiente do oviduto. Um possível significado funcional da hiperativação seria o aumento do padrão de batimento flagelar e da força

condições aeróbicas (De Lamirande e Gagnon, 1998). Foi encontrada uma associação causal entre a formação de ROS, fosforilação de tirosina e função espermática (Aitken et al., 1995).

A fosforilação da tirosina, demonstrada por imunoblotting, foi significativamente aumentada em diversas proteínas do flagelo espermático durante sua passagem pelo epidídimo. A oxidação dos tióis espermáticos com diamida aumenta a fosforilação das proteínas flagelares e a redução dos dissulfetos com DTT diminui a fosforilação. Verificou-se também que a atividade fosfotirosina fosfatase (PTP) é significativamente maior no espermatozóide imaturo do que nos espermatozóides maduros da cauda epididimária. Foram encontradas três bandas principais de proteínas PTP (50, 40 e 27 kDa) em espermatozóides inteiros obtidos da cabeça do epidídimo, enquanto os espermatozóides da cauda só apresentaram a banda de 27 kDa. O mesmo experimento feito com as cabeças de espermatozóides imaturos e maduros, mostrou que as bandas que sofrem redução (50 e 40 kDa) pertencem ao flagelo do espermatozóide (Seligman et al., 2004).

Estudos prévios realizados por citometria de fluxo de espermatozóides eqüinos marcados com monobromobimane (mBBr) fluorescente demonstraram que proteínas tióis são oxidadas em sua passagem pelo conduto epididimário (Dias et al., 2006; Dias, 2004), resultados similares têm sido demonstrados em ratos (Shalgi et al., 1989; Seligman e Shalgi, 1991). Contudo, observações pela microscopia de fluorescência indicaram que enquanto há um decréscimo de marcação tiól na cabeça do espermatozóide maduro obtido da cauda epididimária ocorre um aumento da fluorescência na região do flagelo espermático, principalmente na peça intermediária (Dias, 2004).

Através da análise morfológica do sêmen por microscopia óptica é possível verificar diversas anomalias espermáticas, principalmente as flagelares. Suzuki-Toyota et al. (2004) mostraram que camundongos GOPC-/- (globozoospermicos) apresentam várias má-formações na cabeça espermática, porém sua estrutura flagelar parece normal durante a espermiogênese. Entretanto o

enrolamento do flagelo ao redor do núcleo e a desorganização da bainha mitocondrial ocorrem durante a passagem do espermatozóide pelo epidídimo. A presença de citoplasma perinuclear e a ausência do anel posterior parecem ser responsáveis por essas mal-formações de flagelos, agravadas pelo tráfego epididimário. Quando a gota citoplasmática se move distalmente, o núcleo se move também se enrolando no flagelo. A separação das mitocôndrias das fibras densas externas (ODF) pode ser resultado de problemas nas proteínas que compõem essa fibra (ex.: ODF1 e ODF2) causadoras de sua fragilidade ou deficiência na substância adesiva existente entre as mitocôndrias e ODF e mitocôndrias entre si (Suzuki-Toyota et al., 2004).

As ODFs, principal componente flagelar, são encontradas em flagelos de espermatozóides de animais com fecundação interna, e são conservados através da árvore filogenética animal, incluindo insetos (Baccetti, et al., 1973). Apesar de estarem diretamente envolvidas na indução da motilidade progressiva, as ODFs parecem ter influência modulatória na motilidade espermática. Elas podem ser necessárias para a manutenção das propriedades elásticas do flagelo espermático e podem gerar força de tensão que é necessária para proteger o flagelo espermático durante o transporte epididimário e especialmente durante a ejaculação (Baltz et al., 1990). Análise das frações de ODF em ratos, revelaram pelo menos 14 bandas polipeptídicas das quais as bandas de 84, 80 32-26, 20 e 14,4 kDa foram os principais (Oko, 1988).

Análise proteômica de espermatozóides de mamíferos

O estudo das proteínas de organismos, células é de fundamental importância para o entendimento de processos metabólicos, fisiológicos e patológicos do mesmo. Através das informações geradas pela análise proteômica é possível interferir na natureza de forma a beneficiar o homem. Nos últimos anos, tem sido possível observar um aumento significativo no volume de pesquisas proteômicas que tem por objetivo o mapeamento e identificação de proteínas expressas ou apresentadas por um organismo, tipo celular ou sistema biológico em determinadas situações.

Para isso, a análise proteômica utiliza duas ferramentas principais: eletroforeses uni e bidimensionais, e espectrometria de massas, para separar e identificar as proteínas, respectivamente. A separação das proteínas por eletroforese 2D em géis de poliacrilamida (2D-PAGE) é crucial e amplamente utilizada nas análises proteômicas e consiste em separar os polipeptídeos por pontos isoelétricos, na primeira dimensão, e massa molecular, na segunda dimensão. Desenvolvida por O'Farrel (1975) e aperfeiçoada por Gorg et al. (1980) e Bjellqvist et al. (1982), esta técnica oferece resolução superior comparado a métodos cromatográficos para misturas complexas (Mackun e Downard, 2003). A espectrometria de massas é uma tecnologia central na proteômica devido a sua velocidade e sensibilidade incomparáveis na identificação e sequenciamento de proteínas em misturas biológicas complexas e em pequenas quantidades de amostra (Downard, 2000). Espectrometria de massas "matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight" (MALDI ToF) é uma técnica relativamente nova para a determinação da massa de biomoléculas pesando de 400 a 500.000 u. MALDI ToF é amplamente utilizado em análises proteômicas por apresentar um alto-processamento rápido, sensível e confiável para a identificação de proteínas (Flensburg et al., 2004; Wikner, 2000).

As análises proteômicas têm sido empregadas nos últimos anos como uma ferramenta para compreender diversos processos relacionados com a reprodução das espécies. Em machos, pesquisadores (Fouchécourt et al., 2000;

Gatti et al., 2004; Dacheux et al., 2006) têm desenvolvido o proteoma do fluido e o secretoma do epitélio epididimário de eqüinos e humanos. A investigação proteômica do espermatozóide de mamíferos é muito mais recente. Em humanos, esta análise tem identificado 1.760 proteínas do espermatozóide ejaculado, utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massas (Johnston et al., 2005). Stein et al. (2006) identificaram mais de 100 proteínas obtidas das regiões espermáticas que promovem as interações espermatozóide-oócito durante a fertilização. Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho que analise proteômicamente os espermatozóides obtidos das diferentes regiões epididimárias de nenhuma espécie mamífera.

Tendo como base estudos preliminares de nossa equipe, que demonstram mudanças no padrão protéico de espermatozóides durante a maturação epididimária em mamíferos, e com o intuito de entender melhor a biologia espermática durante este processo, é nosso propósito dar início a uma caracterização proteômica parcial de espermatozóides epididimário de *E. caballus*.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar e identificar proteínas de espermatozóides epididimários de *E. caballus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil protéico, uni e bidimensional, de espermatozóides epididimários de *E. caballus*.

Caracterizar e identificar algumas proteínas extraídas de espermatozóides obtidos de diferentes regiões do conduto epididimário, mediante técnicas eletroforéticas e espectrometria de massas MALDI ToF-ToF, respectivamente.

Detectar e identificar as proteínas tióis presentes em espermatozóides epididimários de equinos.

Analisar as proteínas separadas por suas características bioquímicas e suas funções específicas no espermatozóide.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção dos espermatozóides epididimários

Neste estudo foram utilizados espermatozóides epididimários imaturos e maduros de eqüinos. Os epidídimos foram obtidos por castração de animais sadios, sexualmente maduros, pertencentes a Haras da Região Norte Fluminense. O epidídimo foi cuidadosamente dissecado, retirando-se o tecido conjuntivo adjacente. Este órgão foi dividido em quatro regiões morfológicamente características: cabeça proximal, cabeça distal, corpo e cauda. Estas regiões epididimárias foram fragmentadas em soro fisiológico pH 7,2 em gelo; e o conteúdo luminal, obtido por filtragem em gaze, foi centrifugado a 760xg durante 10 min (Hermle z 252 mk). Os espermatozóides foram lavados em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 (3x) e centrifugados a 760xg por 10 min cada. As células lavadas foram processadas de acordo com os experimentos programados ou estocadas a -20°C.

2. Marcação das proteínas sulfidriladas

Para detectar as proteínas sulfidriladas e determinar o estado de oxido-redução dos grupos sulfidrilas durante a passagem do gameta pelo epidídimo, tratamos um grupo de espermatozóides, já lavados com PBS, com ditioneitol (DTT) 1 mM por 10 minutos e um outro grupo não. Os espermatozóides sem o tratamento com DTT foram utilizados como controle. Após a etapa de redução, todas as amostras foram incubadas com o agente marcador de grupos tióis (SH), monobromobimane (mBBr) (Calbiochem) a 2 mM por 20 min, ao abrigo de luz. O mBBr é excitado com luz ultra-violeta a 398 nm. As amostras foram lavadas em PBS duas vezes (760xg; 10 min/cada) para retirar o mBBr.

3. Extração das proteínas espermáticas

3.1 Extrato total

As amostras de espermatozóides (mantidas em gelo) foram incubadas com uma solução de extração contendo SDS 5%, DTT 1 mM e β -mercaptoetanol (β -ME) 3% na proporção de 1:2 (amostra : solução de extração), acrescido de inibidores de proteases (PMSF 1%, Benzamidina 1%, EDTA 20mM e Pepstatina 1mM). As células foram sonicadas com um aparelho sonic dismembrator 60 (Fisher Scientific) a 10 Watts (RMS) por 10 ciclos de 30 segundos em gelo. A amostra foi centrifugada a 10.000xg (30 min) a 4 °C e o sobrenadante foi separado e armazenado a -20 °C para posteriores análises eletroforéticas em géis desnaturantes (SDS-PAGE).

Para os estudos em 2D-PAGE utilizou-se, para a extração das proteínas, o tampão Tris HCl 30 mM pH 8,5 contendo triton X-100 2%, uréia 8 M e DTT 30 mM; e para as análises com nativo-PAGE (Davis, 1964) foi usado apenas um tampão Tris HCl 20 mM. As células foram sonicadas e centrifugadas conforme descrito para a análise em SDS-PAGE.

3.2 Extração das proteínas da cabeça e flagelo

Os espermatozóides, pré-tratados com DTT 1mM (10 min) e marcados com mBBr, foram sonicados 1x (potência média) por 30s e centrifugados (760xg; 1 min) visando separar as cabeças dos flagelos. O sobrenadante, contendo os flagelos, foi centrifugado a 2000xg por 20 min. Ambas as frações de flagelos e de cabeças, foram resuspendidas em tampão de extração de proteínas: SDS 5% + DTT 1mM para posteriores análises em SDS-PAGE; e Tris HCl 30 mM pH 8,5 + triton X-100 2% + uréia 8 M + DTT 30 mM para análise em 2D-PAGE. Todas as amostras foram incubadas com inibidores de protease (Pepstatina 1 μ M, PMSF 1mM e EDTA 1mM), sonicadas e centrifugadas como descrito para extração de proteínas totais.

3.3 Frações enriquecidas em membranas

Três alíquotas de espermatozóides epididimários, foram lavadas em PBS e diluídas (1:9) num meio hiposmótico contendo frutose e citrato de sódio (150 mosmol) por 2 horas em banho-maria a 37°C. As amostras foram transferidas para o gelo. As células foram rompidas num homogeneizador “Potter” por 2 min à 4°C. Em seguida, as amostras foram sonicadas (4x 30s) a 10 Watts (RMS). Posteriormente, foram centrifugadas (4.000xg; 15 min; 4°C) para retirar as células não rompidas e os debris celulares. O sedimentado não foi utilizado. O sobrenadante sofreu uma ultracentrifugação (100.000xg; 4°C) por 2 horas. Os três precipitados obtidos, nomeados MP1, MP2 e MP3, foram processados diferentemente a partir deste ponto:

- MP1 foi resuspendido em tampão tris HCl 30 mM contendo triton x-100, uréia 8M, tiouréia 2M, DTT 30 mM e anfólitos 0,4% (pH 3-10).
- MP2 sofreu uma etapa de delipidação antes da incubação com tampão de extração (o mesmo de MP1). O processo de delipidação consistiu em tratar a amostra com 14 mL de metanol - acetona (1:8) para cada mL de amostra (90 min; 4°C). O material foi centrifugado (2.800xg; 15 min) e lavado com 1mL de acetona seguido de metanol.
- MP3 também foi delipidado com metanol e acetona antes da incubação com 200 µL de tampão de amostra pH 6,8 com SDS 1% e β-mercaptoetanol 10%.

Uma vez incubadas com os respectivos tampões, todas as amostras foram fervidas utilizando-se um forno de microondas (~10s), agitadas (vortex) e sonicadas. As proteínas extraídas foram submetidas às técnicas de separação por eletroforese.

3.4 Proteínas extraídas da fração nuclear do espermatozóide:

Os núcleos obtidos na fração precipitada (1000xg, 30 min) após a sonicação dos espermatozóides (6x 30s) foram resuspendidos em Triton X-100 0,1% (10 min) e centrifugados a 1000xg (10 min). Após a centrifugação o pellet foi

resuspendido em 1M NaCl, 0,1M β -mercaptoetanol, 1mM PMSF, 1mM EDTA por 2h e logo, centrifugado novamente (1000g x 10min). O sedimentado foi resuspendido em tampão PBS contendo 500 unidades/mL de DNase I por 15 min. Adicionou-se 600 μ L de uréia 6M, GuCl 0,4M, 10 mM DTT em fosfato de sódio (2 horas). Após esse período, foi acrescentado H_2SO_4 à amostra ficando a uma concentração final de 0,2 M e agitou-se fortemente a mistura. Para obter as proteínas nucleares solubilizadas, a amostra foi centrifugada a 30.000xg (15 min) e o sobrenadante liofilizado foi resuspenso em tampão de amostra (10 μ L de glicerol, 5 μ L β -mercaptoetanol, 40 μ L de ácido acético 0,9 N) e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% uréia ácido, com os pólos invertidos, segundo Panyim e Chalkley (1969).

4. Determinação da concentração de proteínas:

A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Utilizou-se azul de coomassie G250 na solução corante. No estabelecimento da curva padrão foi utilizado albumina sérica bovina (BSA) em uma faixa de 0-20 μ g. As medições foram realizadas em um espectrofotômetro Femto 600 Plus a 595 nm.

5. Eletroforese Unidimensional

5.1 Géis de poliacrilamida em condições desnaturantes - SDS-PAGE

As proteínas totais e as proteínas da fração enriquecida em membranas foram submetidas a eletroforeses em minigéis (BioRad) com diferentes concentrações de poliacrilamida, em condições desnaturantes segundo a técnica de Laemmli (1970) e reveladas com azul brilhante de coomassie R-250 (Reisner, 1984). Uma parte de tampão de amostra 4x (4 vezes concentrado - Tris HCl 0,5M pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 1% e SDS 2%) foi adicionada a três partes de amostra com β -mercaptoetanol a uma concentração final de 10% e carregada no gel. A eletroforese ocorreu a \sim 100V / 20mA em tampão de corrida para SDS-PAGE (Tris HCl 25 mM pH 8,3, glicina 1,4%, SDS 0,1%) até a marcação do azul de bromofenol

(frente de corrida) chegar a base do gel. Após a eletroforese, os géis foram observados e fotografados utilizando um transiluminador de luz UV acoplado a uma máquina fotográfica (ImageMaster®VDS) para verificar a fluorescência das proteínas marcadas com o mBBr. Logo, os géis foram corados com uma solução de azul brilhante de coomassie 2% em água, metanol, e ácido acético (6:3:1) por 4 horas e descorados em solução composta de água, metanol e ácido acético na mesma proporção usada na solução corante. As imagens capturadas dos géis corados com azul de coomassie e marcados com mBBr foram analisadas densitometricamente.

5.2 Géis de poliacrilamida em condições nativas (n-Page)

Os géis nativos foram feitos como descritos acima, porém sem a presença do SDS e β -mercaptoetanol no gel propriamente dito e tampouco nos tampões de “amostra” e “corrida”.

6. Eletroforeses bidimensionais

6.1 Nativo - desnaturante (n-PAGE - SDS-PAGE)

Na primeira dimensão, a amostra contendo as proteínas dos espermatozóides obtidas por sonicação foi misturada (3:1) ao tampão de amostra 4x na ausência de SDS e β -mercaptoetanol. A eletroforese foi realizada a ~100V - 20mA em géis com 8% de acrilamida sem SDS contendo repetições da mesma amostra. Um canal do gel contendo a amostra foi corado com azul de coomassie. Outro canal, não corado, foi incubado com tampão de amostra 2x concentrado contendo SDS (1%) e β -mercaptoetanol (10%) e submetido a um SDS-PAGE com 12% de acrilamida. Após a eletroforese, o gel 2D foi corado por impregnação por prata.

6.2 Nativo - nativo com gradiente de concentração de acrilamida poro transverso

A técnica de separação de proteínas em estado nativo num gradiente de concentração de acrilamida horizontal foi descrito por Retamal e Babul (1988). A mesma amostra distribuída em 8-10 poços foi submetida a um n-PAGE. Uma tira foi

corada com azul de coomassie e foi utilizada como referência para a retirada das bandas de interesse do restante do gel não corado. As bandas eleitas após a separação por n-PAGE, foram submetidas a uma segunda dimensão em um gel nativo com gradiente de concentração de acrilamida (6-18%) em poro transversal (horizontalmente), no intuito de verificar as massas moleculares nativas e estados de agregação. As tiras do gel, após incubação com tampão de amostra 2x sem SDS e β -ME, foram dispostas sobre um gel nativo com um gradiente de concentração de poliacrilamida poro transversal (6-18%) e submetidas à eletroforese sob as mesmas condições das anteriores. Os géis foram corados por prata e logo analisados densitometricamente. A partir dessa análise foi realizada a correlação entre mobilidade eletroforética (R_f) e concentração de acrilamida. Com esses valores foi gerada uma reta (gráficos de Ferguson) para cada proteína e seus coeficientes angulares foram comparados com gráficos desenhados a partir de proteínas com massas moleculares conhecidas (Retamal e Babul, 1988).

6.3 SDS-PAGE - SDS-PAGE

O experimento realizado para verificar a participação de pontes dissulfeto na organização/estabilização de agregados de proteínas consistiu em submeter a amostra a duas eletroforeses em condições desnaturantes, a primeira sem β -ME e a segunda na presença do agente redutor. Após a separação das proteínas em géis SDS (como já descrito), as tiras não coradas do gel foram retiradas, incubadas com tampão de amostra 2x com SDS e β -mercaptoetanol (30 min) e re-eletroforizadas sobre outro gel desnaturante. Os géis 2D foram corados com azul de coomassie.

6.4 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE):

a) Foi utilizado o método 2D-PAGE parcialmente modificado por Gorg et al., (1980) e Bjellqvist et al (1982), que consiste na aplicação de um gradiente de pH imobilizado (IPG) gerado através da polimerização de anfólitos químicos com a matriz de acrilamida sobre uma tira plástica ("strip" - Amersham-Pharmacia). Uma alíquota da

amostra foi diluída em tampão de re-hidratação, contendo CHAPS 2%, uréia 8M, DTT 0,2%, anfólitos 0,5% (pH 3-10 / 4-7) e azul de bromofenol 0,002%, até o volume máximo de 125 mL. Após a re-hidratação dos “strips” de 7 cm (IPG 3-10 e 4-7), a eletrofocalização foi realizada num sistema de focalização IPGphor® (Amersham-Pharmacia), até aproximadamente 28.000 Vh^{-1} . Após a primeira dimensão, as tiras foram incubadas em 2 tampões de equilíbrio: um para redução e o segundo para alquilação das proteínas. Na primeira etapa de equilíbrio, foi utilizado tris HCl 50 mM, pH 8,8, uréia 6M, glicerol 30%, DTT 1% por 15 min. Para o segundo equilíbrio se utilizou o mesmo tampão com iodoacetamida a 2,5% no lugar do DTT (15 min). Na segunda dimensão, cada tira foi colocada no topo de um gel de poliacrilamida 12% e selada com agarose 0,5% em tampão de corrida 10 vezes concentrado para SDS-PAGE (Tris HCl 250 mM pH 8,3, glicina 14,2%, SDS 1%) e azul de bromofenol. Após a solidificação do agar as proteínas foram submetidas a uma eletroforese usando-se um sistema vertical (BIORAD III) sob voltagem constante de 120 V.

b) O protocolo de focalização isoelétrica manual, segundo a técnica de O'Farrel (1975) original, consiste na preparação do gel de focalização (1ª dimensão). Para um gel de 0,5mL, foram misturados 0,146 mL da solução A (acrilamida 28% + bisacrilamida 0,74%), 0,016 mL de anfólitos pH 3-10 (Bio Rad), 0,031 mL da amostra em tampão Tris-HCl 30mM pH 8,5, Triton X-100 2%, uréia 8M e DTT 30mM, 0,078 mL da solução F (riboflavina 0,004%), 0,0004 mL de persulfato de amônio 6% e 0,0004 mL de TEMED. Completar o volume até 0,5 mL com água deionizada.

Foi gerado um gel em tira através da polimerização de um gradiente de anfólitos de pH 3-10 com a matriz de acrilamida e a amostra, para a focalização isoelétrica a baixa voltagem (~100V, 5hs, 4°C). Foi utilizado ácido ortofosfórico 0,2% no anodo e hidróxido de sódio 0,28% como solução catodo. A segunda dimensão foi realizada em géis 12% de acrilamida com SDS 0,1%, sob voltagem constante de 120V.

7. Purificação das proteínas espermáticas de géis de poliacrilamida

As proteínas espermáticas foram selecionadas para a purificação por sua marcação SH-positiva. Os espermatozóides da cauda do epidídimo foram pré-tratados com DTT 1 mM (10 min) e incubados com monobromobimane como descrito anteriormente. As células foram divididas em cabeças e flagelos que, separadamente, foram sonicados (6x/30s, em gelo) a 10 Watts (RMS). As amostras foram centrifugadas a 5.000xg por 30 minutos e o sobrenadante, submetido a um SDS-PAGE. Após a observação do gel sob luz UV, as bandas fluorescentes foram cortadas do gel e incubadas por 30 min em tampão de amostra duas vezes concentrado acrescido de β -ME a 10%. Em seguida, cada banda sofreu, individualmente, uma segunda eletroforese num gel de poliacrilamida com SDS. Os géis foram observados sob UV e corados com azul de coomassie. As bandas purificadas foram analisadas por espectrometria de massas MALDI ToF-ToF e as imagens foram analisadas densitometricamente.

8. Coloração dos géis por impregnação por prata

Os géis corados por prata seguiram o protocolo descrito por Shevchenko et al. (1996). O gel foi banhado com metanol 50% e ácido acético 5% por 20 min, e logo, com metanol 50% por 10 min, para a fixação das proteínas. Lavou-se o gel em água deionizada por no mínimo 2 horas. Após esse período, o gel foi tratado com tiosulfato de sódio 0,02% (1 min), lavado com água deionizada (1 min) incubado com nitrato de prata 0,1% (20 min; 4°C). A revelação das proteínas foi feita com uma solução de carbonato de sódio 2% com formaldeído a 0,15%. Para parar a revelação foi utilizado ácido acético 5%.

9. Análise Densitométrica

Todos os géis obtidos foram escaneados/fotografados e suas imagens foram analisadas densitometricamente. As análises da mobilidade eletroforética (Rf) e a quantificação da massa molecular relativa das bandas protéicas foram realizadas

mediante o programa computacional “gel perfect” (Bozzo e Retamal, 1991). O programa armazena as imagens em um formato TIF a 400dpi. O programa baseia-se no princípio da conversão dos diferentes tons de cinza em tons de cores, mediante um algoritmo matricial, atribuindo-se os valores de 0% ao fundo do gel (“background”) e 100% para pontos mais intensos. As análises dos géis 2D foram realizadas pelo programa Phoretix 2D (versão 2004) que quantifica o número e a concentração relativa das manchas de proteínas, bem como determina a massa molecular e o ponto isoelétrico em acordo com as referências utilizadas.

10. Análise de Proteínas por Espectrometria de Massas MALDI ToF-ToF

10.1 Digestão enzimática das proteínas dos géis 1D e 2D

Os spots selecionados para análise por espectrometria de massas foram retirados dos géis, com ajuda de uma ponteira para micropipetas cortada (correspondente ao tamanho das manchas), colocados em tubos de microcentrífugas livres de contaminantes e lavados com água deionizada. Os géis corados por prata foram descorados com uma solução 1:1 de tiosulfato de sódio 100 mM e ferricianeto de potássio 30 mM, trocada após 10 minutos. Logo, os fragmentos de gel foram lavados com água deionizada três vezes. Já os géis corados com azul de coomassie foram lavados com bicarbonato de amônio 25mM e acetonitrila (ACN) 50% (3x / 15 min). Após a lavagem, os pedaços de géis foram tratados com ACN 100% por 5 min e desidratados no Speed Vac Plus SC110A (Savant) por 30 minutos. As proteínas foram digeridas com tripsina 20 µg/mL em bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0 por 16-24 horas a 37°C. Para a extração dos peptídeos tripticos, foram adicionados ~30 µL (volume para cobrir o gel) de TFA 0,1% no tubo que foram mantidos sob agitação por 60 minutos. A solução contendo peptídeo foi colocada em um novo tubo e repetiu-se o processo. A amostra foi desalinizada e concentrada usando resina de fase reversa C-18 fixadas em ponteiras para micropipetas (ZipTips® C18 - Millipore/Eppendorf) e armazenada em freezer a - 20 °C para análises em espectrômetro de massas.

10.2 Espectrometria de massas e identificação das proteínas

Para as análises dos peptídeos foi utilizado um espectrômetro de massas MALDI ToF-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Time of Flight”) (4700 - Applied Biosystems) localizado no Instituto Oswaldo Cruz (FioCruz) e disponibilizado pela Rede Proteômica do Rio de Janeiro. Para a obtenção dos espectros de massas, 0,5 µl de cada amostra de peptídeos trípticos foram adicionados na placa de MALDI junto com 0,5 µl de matriz 1 alfa-ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico e co-cristalizados ao ar. Uma lista de massas (PMF - Peptide Mass Fingerprint) dos peptídeos trípticos foi gerada por MALDI-ToF-MS nas seguintes condições: faixa de massa (900 – 4000 Da), 1600 disparos de laser por espectro. O PMF gerado para cada amostra de peptídeos trípticos, após análise dos espectros e retiradas de massas contaminantes, foi confrontado com massas de peptídeos trípticos depositadas no banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando o programa Protein Prospector® (MS fit), que determina e classifica os resultados por homologia. Os parâmetros empregados foram os seguintes:

DNA frame translation: 3
Missed cleavages: up to 2
Cys modification : carbamidomethylation
Possible modifications: carbamidomethyl
oxidation (M)
phospho (ST)
pyro-glu (N-term Glu)
Minimum number of peptides required to match: 2
Mass tolerance: 50 ppm
Peptide masses are: monoisotopic

As amostras tripsinizadas também foram seqüenciadas por MALDI ToF-ToF no modo MS/MS. Foram utilizados 2400 disparos de laser / espectro no modo PSD (post source decay). Os espectros foram analisados usando o programa

computacional Mascot (Matrix Science) com o bando de dados NCBI. As seqüências obtidas também foram analisadas através do “blastp” (NCBI), para comparação com as seqüências de proteínas conhecidas e confirmação das identificações obtidas.

5 - RESULTADOS

5.1 - Análise proteômica das proteínas totais de espermatozóides epididimários

5.1.1 SDS-PAGE

A análise eletroforética em condições desnaturante (SDS-PAGE) das proteínas obtidas do homogeneizado total de espermatozóides epididimário de eqüinos, apresentou um perfil protéico contendo várias bandas de diferentes intensidades entre 110 e 10 kDa, após coloração do gel com azul de coomassie. Algumas delas mostraram mobilidade eletroforética e concentração relativa similar nos espermatozóides obtidos das regiões epididimárias de cabeça proximal, distal, corpo e cauda. Outras somente foram detectadas em espermatozóides maduros, existindo também bandas de maior intensidade nas células obtidas das regiões mais distais deste órgão (Fig. 3). A concentração relativa de cada banda em relação ao total de proteínas por canal foi determinada densitometricamente. As bandas majoritárias nas regiões de cabeça proximal, corpo e cauda apresentaram massas moleculares aproximadas de 63 e 44 kDa. A análise densitométrica dessas bandas revelou que há um aumento da concentração relativa da banda de 63 kDa enquanto a banda de 44 kDa se mantém estável nas quatro amostras analisadas. Outras bandas analisadas também sofreram alterações de concentração nas amostras obtidas das diferentes regiões do epidídimo, entre elas está uma banda maior de 200 kDa que diminui em direção a cauda do epidídimo, e outras duas na faixa de ~30 e 81 kDa que aumentam sua concentração na região da cauda epididimária (Fig. 3).

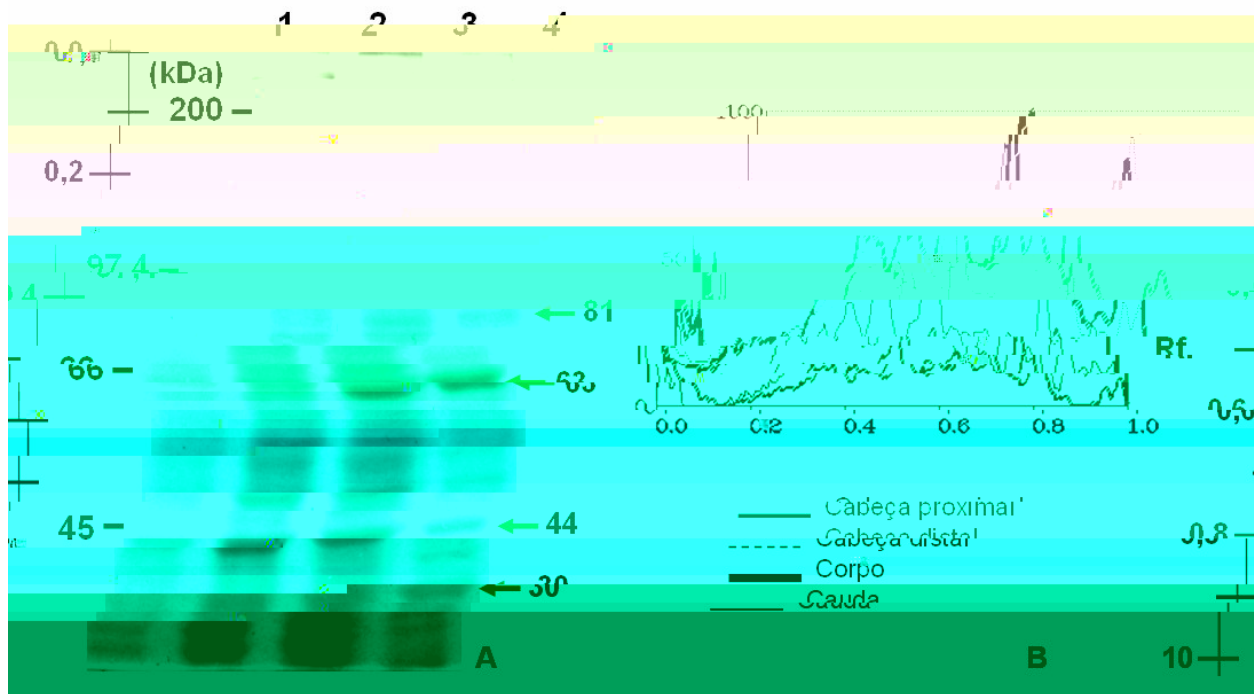


Figura 3: SDS-PAGE de proteínas de espermatozoides epididimários. A) Espermatozoides obtidos das regiões de cabeça proximal (1), cabeça distal (2), corpo (3) e cauda (4) do epidídimo. B) Densitograma correspondente ao gel A.

5.1.2 2D-PAGE / Espectrometria de massas MALDI ToF-ToF

O estudo inicial de separação e identificação das proteínas espermáticas, utilizando 2D-PAGE e espectrometria de massas foi realizado com o extrato total de espermatozoides epididimários. Usando um gradiente de pH imobilizado (IPG) de 3-10, foram observadas algumas diferenças entre as amostras obtidas das quatro regiões epididimárias (cabeça proximal, cabeça distal, corpo e cauda), entretanto o padrão de distribuição das cadeias polipeptídicas foi altamente conservado. Em todas as amostras os polipeptídeos se dispuseram, principalmente, entre o pH 5 e 7,5 e pH 9-10 dentro da faixa de massa molecular de 107 a 15 kDa. Dentre os "spots" revelados nos géis, pelo menos 13 regiões com manchas se repetem em todas as 4 amostras espermáticas analisadas. As maiores diferenças ocorreram na região de peptídeos e polipeptídeos até aproximadamente 43 kDa (pH5-6). Nessa

região foi observado o desaparecimento/redução de um “spot” (41 kDa) em espermatozóides maduros da cauda que estava fortemente corado na amostra obtida da cabeça proximal (Fig. 4A, D). Em espermatozóides da cabeça proximal foram encontradas aproximadamente 63 manchas de proteínas estando a maioria ao redor do pH 6 e na faixa entre 75 e 30 kDa. 46 “spots” foram selecionados para espectrometria de massas MALDI ToF-ToF no modo MS (PMF) e MS/MS (seqüenciamento), dessas, 12 foram parcialmente seqüenciadas e identificadas. O espectro PMF das amostras CBP3, CBP5, CBP8 e CBP11 se mostrou similar e três peptídeos trípticos ($m/z= 1471,94, 1600,7$ e $1742,01$) foram seqüenciados nestas amostras (Fig. 5). Foram obtidos resultados confiáveis apenas com a análise, no banco de dados, das seqüências obtidas pela espectrometria de massas MS/MS (Tabela 3). As proteínas encontradas pertencem ao grupo das proteínas estruturais de origem flagelar: proteínas das fibras densas externas 2. A análise espectrométrica das outras amostras de espermatozóides da cabeça proximal identificou as α e β -tubulinas, proteínas dissulfeto isomerase e uma enzima similar à NADPH flavina-oxidoreductase (Fig. 4A – Tabela 4).

Em espermatozóides da região de cabeça distal do epidídimo, a eletroforese bidimensional revelou ~53 “spots”, dos quais 46 foram analisados por espectrometria de massas MS e MS/MS, e desses apenas 9% foram seqüenciados e identificados com sucesso. As amostras apresentaram um espectro PMF similar que após o seqüenciamento (MS/MS) dos três peptídeos trípticos mais intensos ($m/z= 1600,7, 1609,7$ e $1685,8$) revelou homologia com as proteínas das fibras densas externas 2 localizadas no flagelo espermático (Fig. 6 – Tabela 3). Na separação eletroforética 2D-PAGE, a maior concentração de “spots” foi encontrada na região entre 78-35 kDa, e pH 5-7 (Fig. 4B).

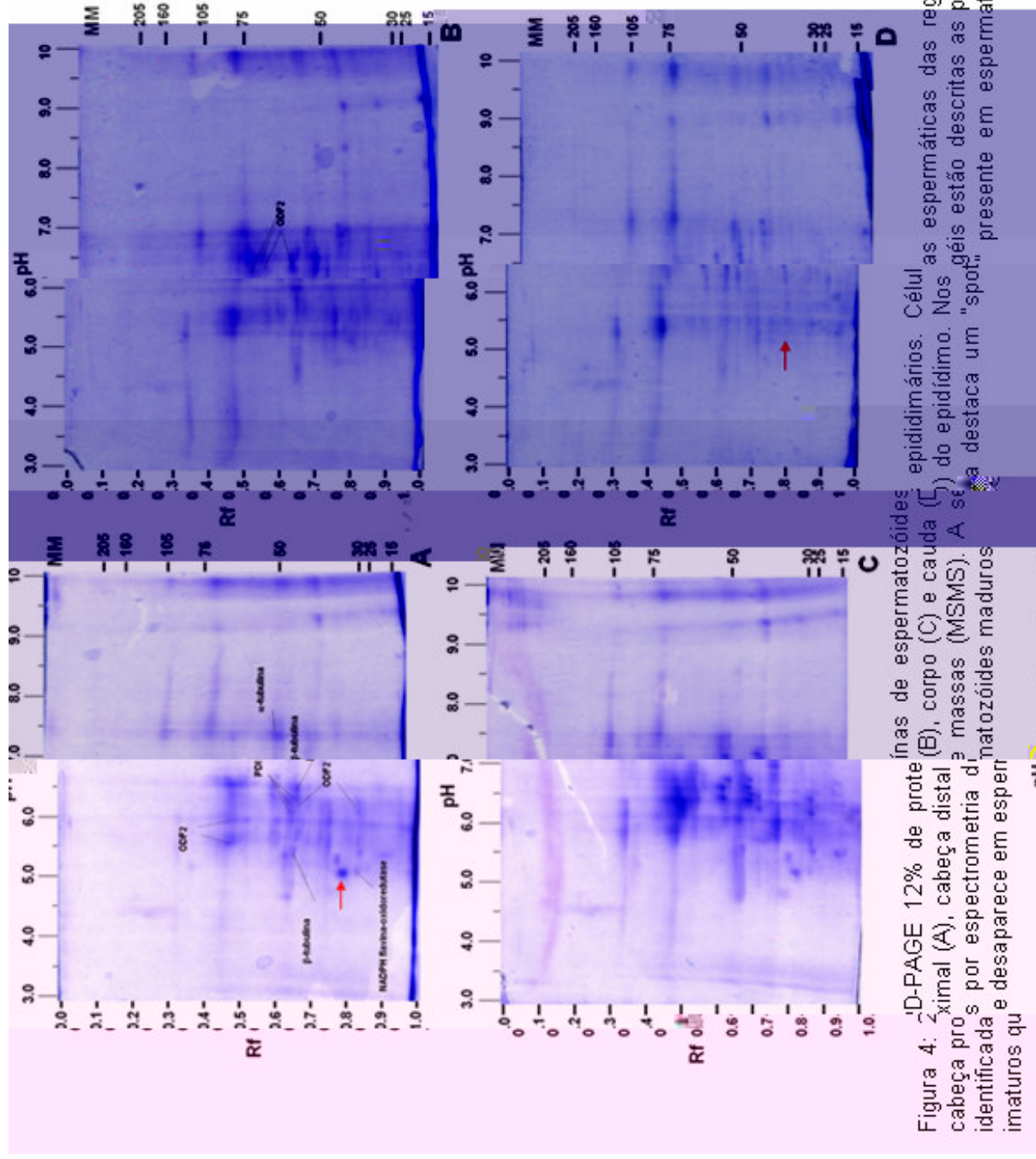


Figura 4: 2D-PAGE 12% de proteínas de espermatozoides imaturos (A), cabeça proximal (B), corpo (C) e cauda (D) do epidídimo. Nos géis estão descritas as proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS). A seta destaca um "spot" presente em espermatozoides imaturos que desaparece em espermatózoos maduros.

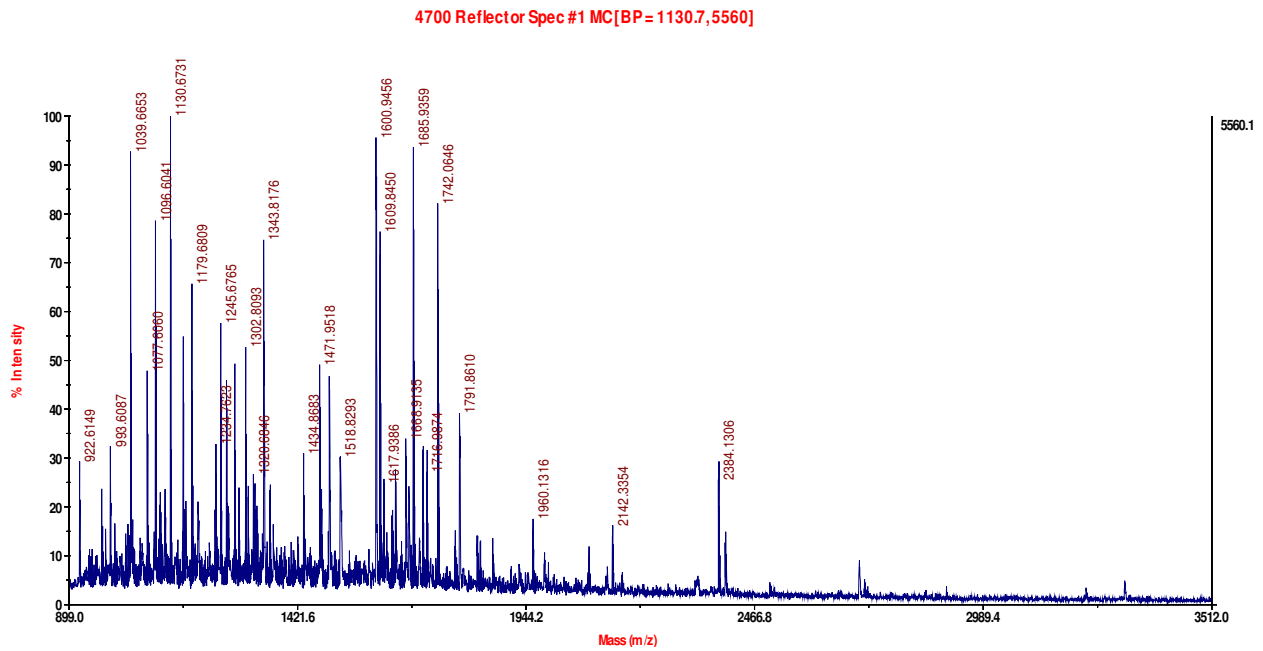


Figura 5: Espectro “peptide mass fingerprint” (PMF) da amostra CBP5 do extrato total de espermatoz3ides de cabea proximal do epid3idimo.

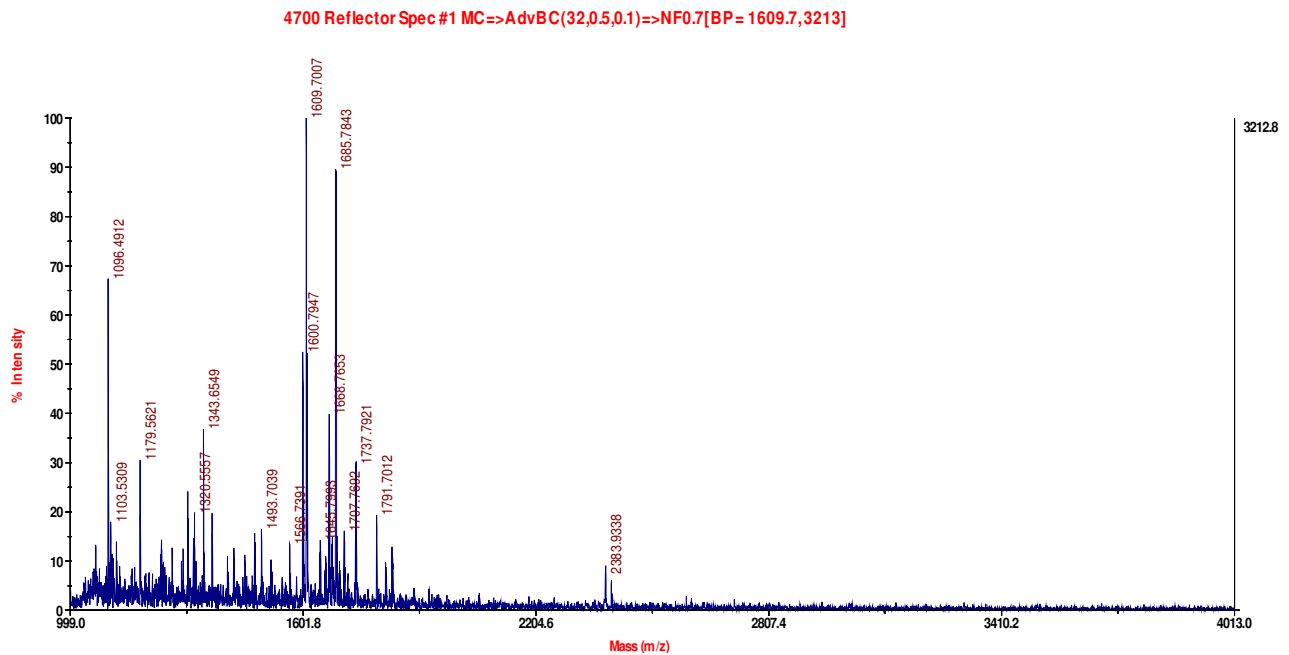


Figura 6: Espectro “peptide mass fingerprint” (PMF) da amostra CBD1 do extrato total de espermatoz3ides de cabea distal do epid3idimo.

Em espermatozoides do corpo epididimário, mais do que nas amostras

5.2 - Detecção de proteínas tióis (SH) de espermatozóides epididimários

5.2.1 SDS-PAGE

O tratamento dos espermatozóides com mBBr, reagente que detecta grupos SH, revelou diversas bandas protéicas fluorescentes (pelo menos 10 bandas) após uma eletroforese unidimensional desnaturante (Fig. 7). As bandas com massas moleculares próximas de 111, 88, 72, 61, 27 kDa e menores de 14 kDa foram as mais intensamente marcadas nas amostras obtidas das 3 regiões epididimárias avaliadas neste experimento (cabeça proximal, corpo e cauda). Quando tratados previamente com DTT, as proteínas dos espermatozóides da cauda epididimária apresentaram um forte aumento da marcação fluorescente (grupamentos tióis) se comparadas com as amostras obtidas da cabeça proximal do epidídimo, onde isso não ocorreu (Fig. 7, 8). Esse fenômeno ocorreu em peptídeos até 35 kDa, principalmente com as proteínas de 26-29 kDa que apresentaram redução clara da fluorescência em relação a quantidade de proteína, indicando um processo de oxidação (Fig. 8). A razão fluorescência/proteína para a banda de ~88 kDa sem tratamento com DTT se manteve alta em todas as 3 amostras, indicando que essa proteína é altamente sulfidrilada e que seus grupos SH permanecem na forma reduzida durante o tráfego epididimário (Fig. 8). Através da análise densitométrica das áreas fluorescentes foi possível verificar que após o tratamento dos espermatozóides com DTT o aumento da fluorescência foi 2 vezes maior nas bandas de maior mobilidade eletroforética (~30–10 kDa) (Fig. 9).

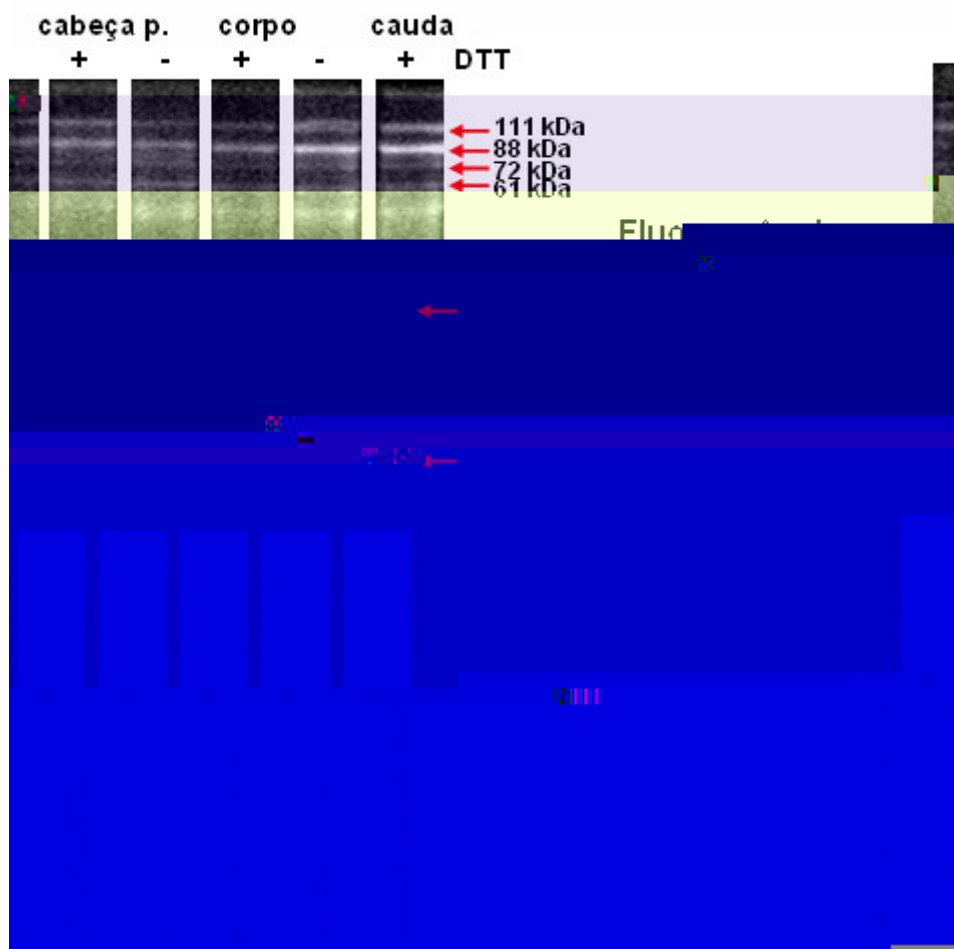


Figura 7: Eletroforese das proteínas de espermatozoides epididimários em géis de acrilamida 12% com SDS 0,1%. Células espermáticas obtidas das regiões de cabeça proximal, corpo e cauda epididimária, com (+) e sem (-) tratamento com DTT previamente à marcação de grupos SH.

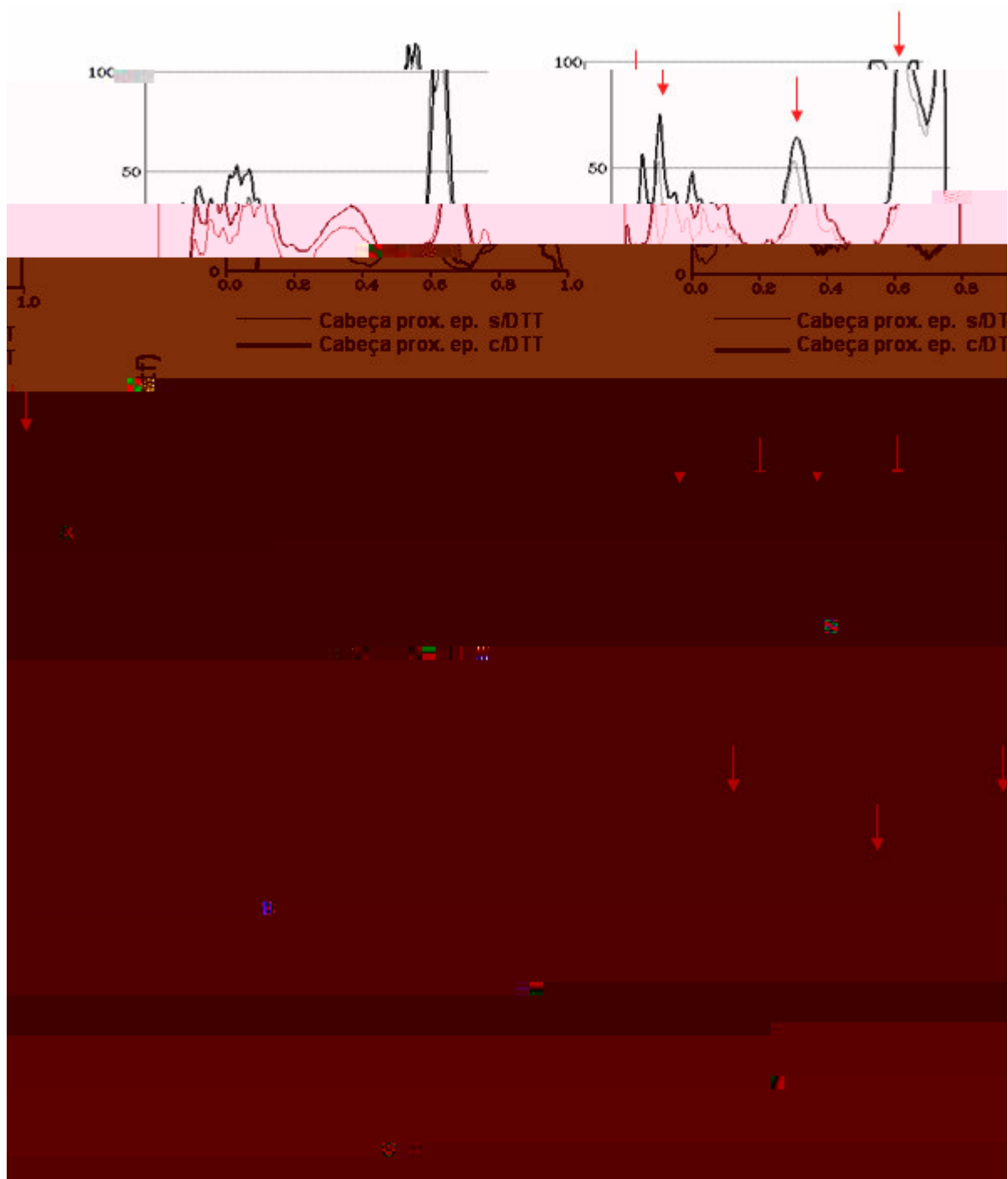


Figura 8: Análise densitométrica das proteínas coradas com azul de coomassie (A) de espermatozóides epididimários e sua marcação-SH fluorescente correspondente (B) com e sem pré-tratamento com DTT.

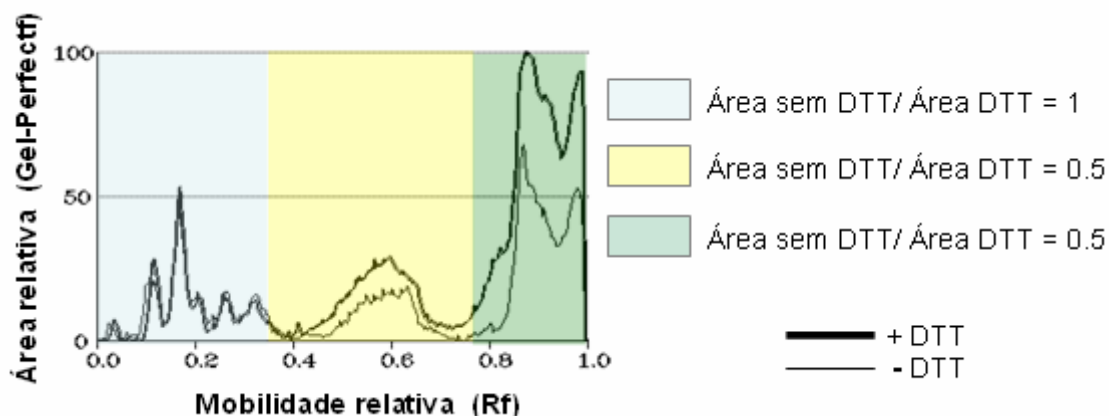


Figura 9: Perfil densitométrico da fluorescência (mBBR) das proteínas de espermatozoides da cauda e a proporcionalidade entre as áreas.

Também foi verificada a presença de proteínas tíois positivas na fração nuclear espermática. Foi detectada, em géis uréia-ácido, uma banda de mobilidade eletroforética 0,94. Eletroforese 2D do gel ácido no meio de um gel desnaturante, com e sem tampão de amostra contendo SDS, mostrou que essa proteína migra para o pólo positivo na primeira situação, e para o pólo negativo sem o detergente (dados não mostrados). Esse resultado indica que as proteínas presentes no gel ácido são carregadas positivamente (básicas) e o SDS, impondo sua carga negativa, anula as cargas intrínsecas das proteínas. Estudos preliminares mostram que esta banda tem 48% de identidade com a protamina 2 de *E. caballus* (dados não mostrados).

5.2.2 2D-PAGE (O'Farrel, 1975)

Para a detecção de marcação fluorescente de proteínas tíois com mBBR após eletroforese bidimensional, foi realizada a focalização isoeétrica das proteínas, utilizando um gradiente de anfólitos de pH 3-10, segundo O'Farrel, (1975). A utilização desta técnica modificada posteriormente por Gorg et al. (1980) e Bjellqvist et al. (1982) não preservou a marcação fluorescente após a eletroforese bidimensional. Nosso resultado mostrou a preservação da marcação dos grupamentos tíois após a focalização (1D) e eletroforese desnaturante (2D) (Fig. 10).

Apesar de não ter formado o gradiente de pH desejado (3-10), foi possível observar uma marcação fluorescente intensa com ponto isoelétrico 6,5, no gel de focalização (Fig. 10A). No gel SDS, visualizado sob luz UV, foram encontradas algumas marcações de diferentes intensidades e pesos moleculares principalmente na região entre 75-105 kDa (Fig. 10B). Quando corados por impregnação por prata não se observou uma marcação importante de proteínas nas regiões típicamente positivas (Fig. 10C). Devido às limitações impostas por esta técnica, a detecção de grupos SH foi realizada apenas por eletroforese desnaturante unidimensional (Laemmli, 1970).

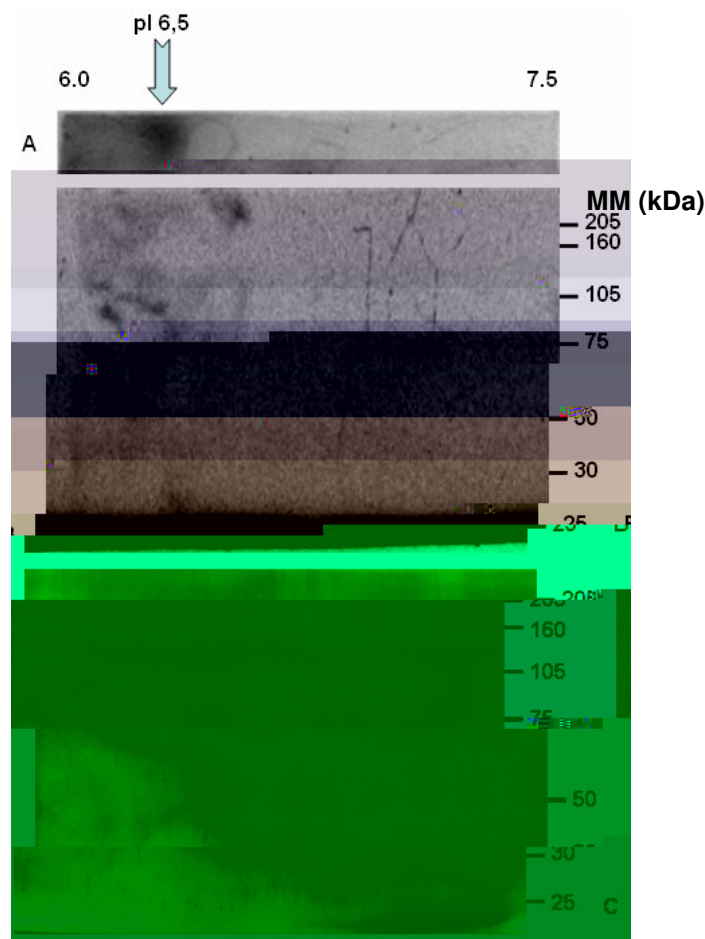


Figura 10: 2D-PAGE (O'Farrel, 1975) com focalização isoelétrica manual de proteínas de espermatozoides da cauda epididimária. (A) Fluorescência (imagem invertida) do gel de focalização (1D). B) Fluorescência (imagem invertida) do gel desnaturante (2D). C) Gel 2D corado por prata.

5.3 - Análise das proteínas das frações de cabeça e flagelo espermáticos

5.3.1 Detecção e purificação de proteínas tióis de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Devido a predominância de proteínas de origem flagelar encontradas na análise 2D do extrato total do espermatozóide epididimário foi realizado o mapeamento (SDS-

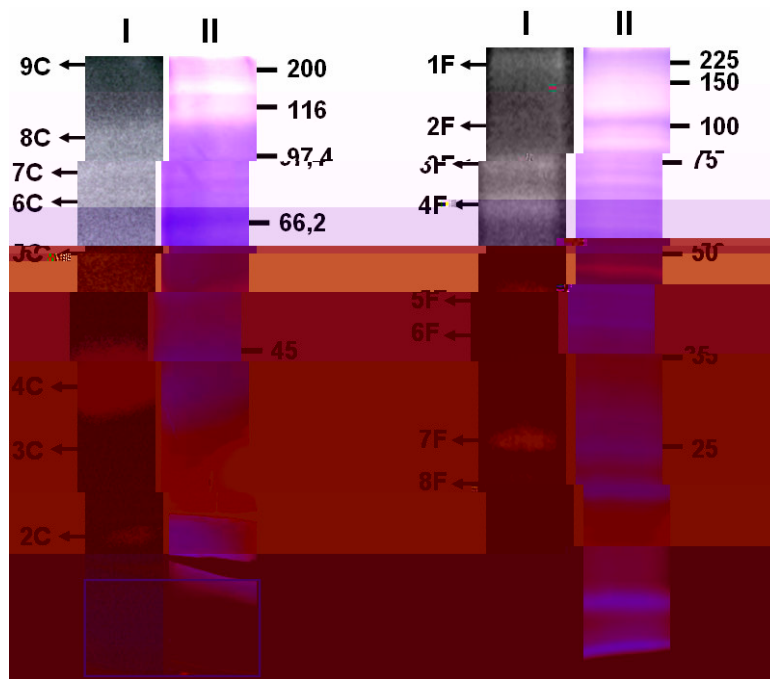


Figura 11: Eletroforese desnaturante das proteínas de espermatozóides da cauda epididimária em géis de acrilamida 12%. A) Frações de cabeça e (B) flagelo espermáticos. I – Marcação-SH fluorescente (mBBBr); II - Proteínas (azul de coomassie). As bandas tióis-positivas (C - cabeças; F - flagelos) foram purificadas.

Banda	MM 1D (kDa)	MM Purificada (kDa)
1C	15,5	13,5
2C	19,5	56
3C	25,5	84,6
4C	31	66,2
5C	51	129
6C	67	108
7C	76	63
8C	96,5	79
9C	225	225

Tabela 1: Bandas tíois positivas da amostra de cabeças de espermatozóides da cauda epididimária com suas respectivas massas moleculares na primeira dimensão e após sua purificação.

Após a segunda eletroforese, as bandas tíois positivas mantiveram a marcação SH, porém algumas bandas apresentaram alteração em suas mobilidades eletroforéticas e conseqüentemente em suas massas moleculares (Figura 12 - Tabela 1). O aumento das massas moleculares após a purificação provavelmente se deve a união de componentes presentes na mesma banda pela oxidação de seus grupos SH. As 9 proteínas purificadas, obtidas das cabeças dos espermatozóides, foram preparadas para espectrometria de massas, mas apenas a 6C foi parcialmente seqüenciada e identificada com sucesso, como uma α -tubulina (Fig.13 - Tabela 3).

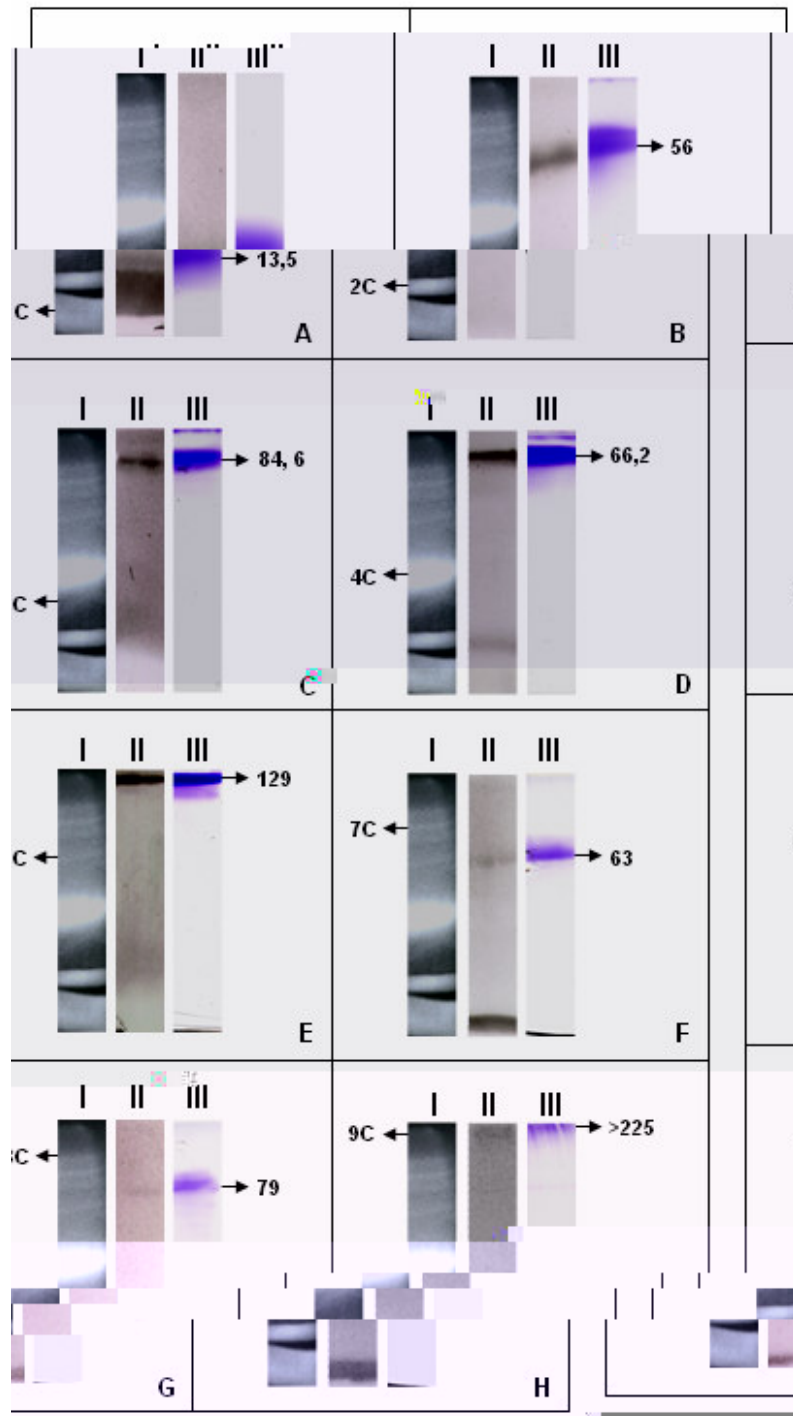


Figura 12: Purificação e detecção de proteínas tióis da região da cabeça espermática. I- fluorescência da amostra bruta em SDS-PAGE 12% (A-H); II- imagem invertida da fluorescência das bandas isoladas em SDS-PAGE 15% (A-E) e 12% (F-H). III- igual a (II), corado com azul de coomassie.

Figura 13: Purificação e identificação da proteína de 67 kDa da cabeça espermática.
A) Purificação da banda 6C. I- fluorescência da amostra bruta em gel de

2). Todas foram preparadas para a análise no espectrômetro de massas MALDI ToF-ToF MS e MS/MS.

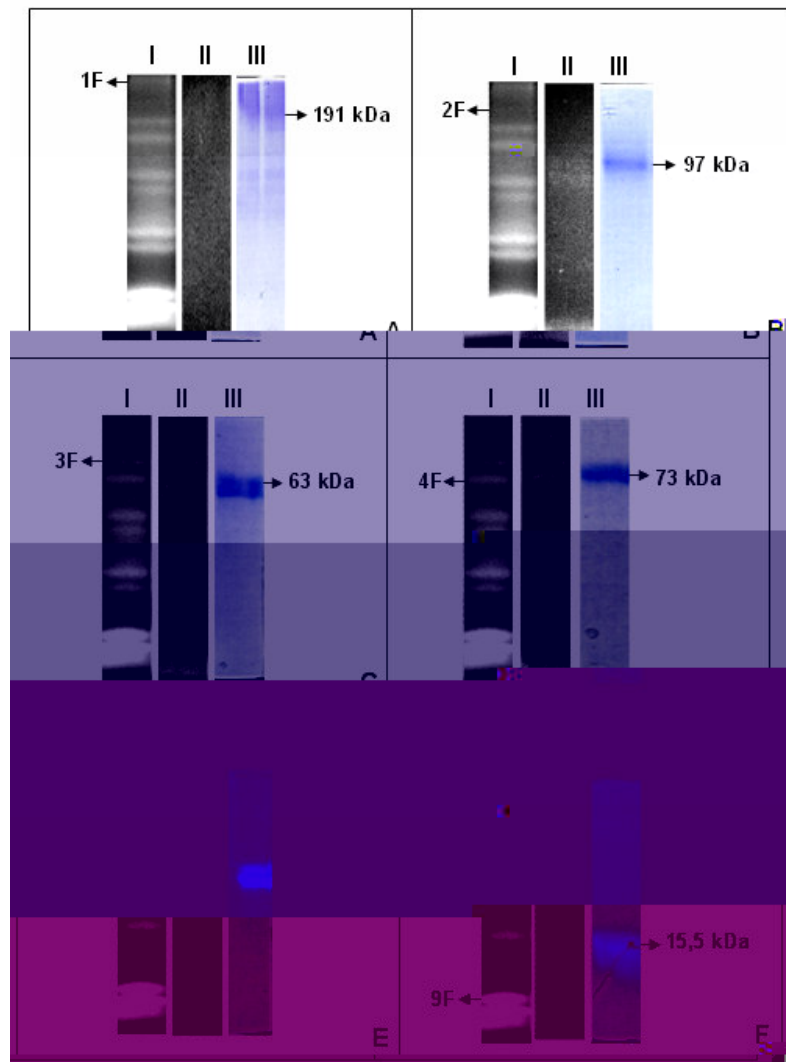


Figura 14: Purificação e detecção de proteínas tióis dos flagelos espermáticos. I- fluorescência da amostra bruta em SDS-PAGE 12% (A-F); II- fluorescência das bandas isoladas em SDS-PAGE 10% (A,B), 12% (C,D,E) e 15% (F). III- igual a (II), corado com azul de coomassie.

Banda	MM 1D (kDa)	MM Purificada (kDa)
1F	206	191
2F	107	97
3F	76	63
4F	63	73
5F	43	43
6F	38	38
7F	25	23,6
8F	22,5	22
9F	17	15,5
10F	15,5	12,5

Tabela 2: Bandas tíois positivas da amostra de flagelos de espermatozóides obtidos da região da cauda epididimária com suas respectivas massas moleculares na primeira dimensão e após sua purificação.

Apesar de não ter identificado nenhuma proteína, a análise das bandas 1F, 2F, 3F, 4F e 9F apresentou um bom espectro de massas de peptídeos trípticos (PMF) e um bom espectro de seqüenciamento (MS/MS) para cada amostra. Segundo essas análises, as bandas 1F, 3F e 4F parecem conter as mesmas proteínas, uma vez que apresentaram um espectro PMF similar. A amostra 6F foi identificada como uma gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (Fig. 15), e na banda 7F foram encontradas uma triose fosfato isomerase e uma proteína de canal aniônico dependente de voltagem (Fig. 16 – Tabela 3). Ainda foram identificadas uma glutationa S-transferase e uma α -globina na amostras 8F e 10F, respectivamente (Figuras 17 e 18 – Tabela 3). As massas moleculares teóricas e experimentais dessas proteínas estão expostas na tabela 4.

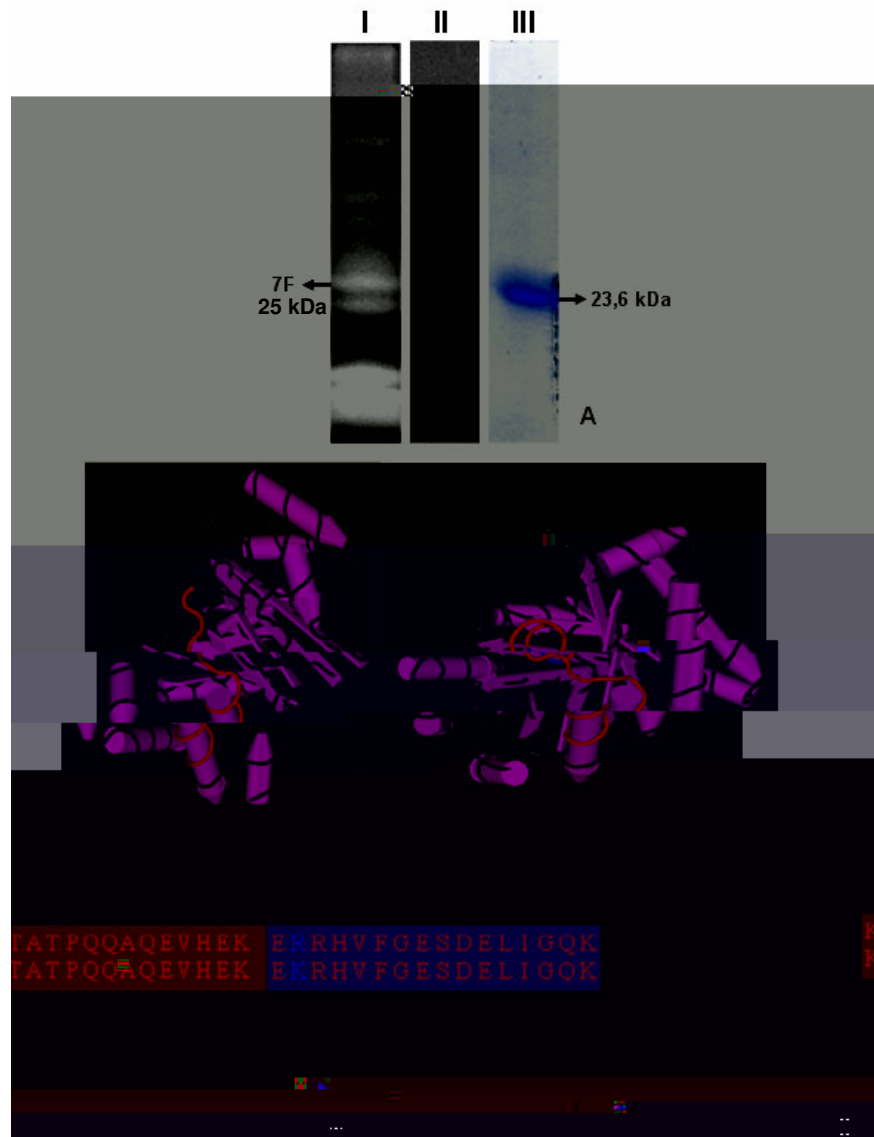


Figura 16: Purificação e identificação da proteína de 25 kDa do flagelo espermático. A) Purificação da banda 7F. I - fluorescência da amostra bruta em gel de poli-acrilamida 12%; II - fluorescência da banda purificada em gel de poli-acrilamida 12% desnaturante. III - igual a (II), corado com azul de coomassie. B) A estrutura tridimensional da TPI (gi|66360365|pdb|1WYI|A). C) Alinhamento das seqüências aminoacídicas depositadas no banco de dados com as seqüências de dois peptídeos obtidas por espectrometria de massas MSMS referente à região destacada em (B). D) Segunda proteína identificada na banda 7F.

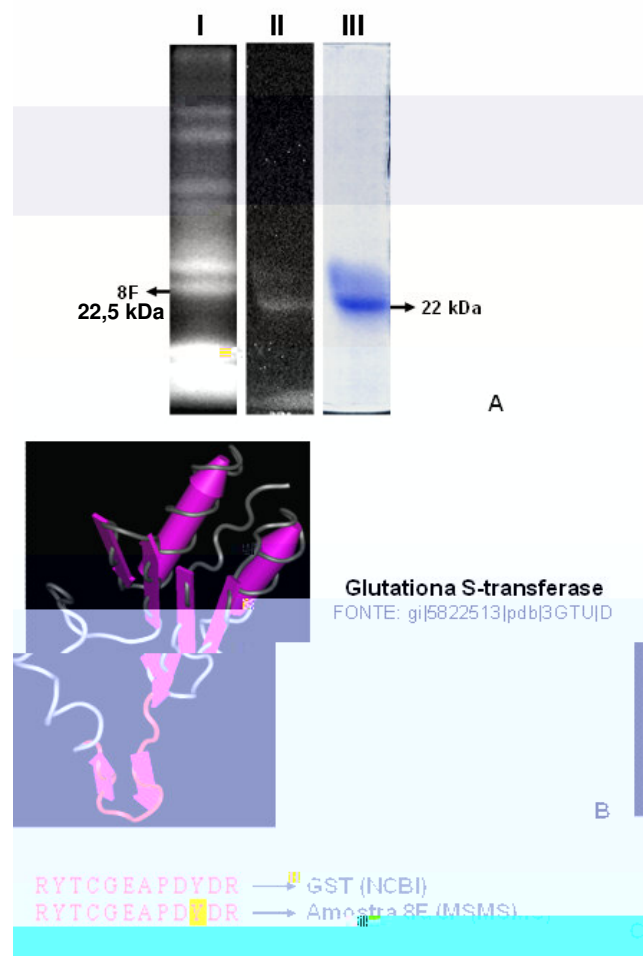


Figura 17: Purificação e identificação da proteína de 22,5 kDa do flagelo espermático. A) Purificação da banda 8F. I - fluorescência da amostra bruta em gel de poliacrilamida 12%; II - fluorescência da banda purificada em gel de poliacrilamida 12% desnaturante. III - igual a (II), corado com azul de coomassie. B) A estrutura tridimensional da GST (gi|5822513|pdb|3GTU|D). C) Alinhamento da seqüência aminoacídica depositada no banco de dados com a seqüência de um peptídeo obtida por espectrometria de massas MSMS.

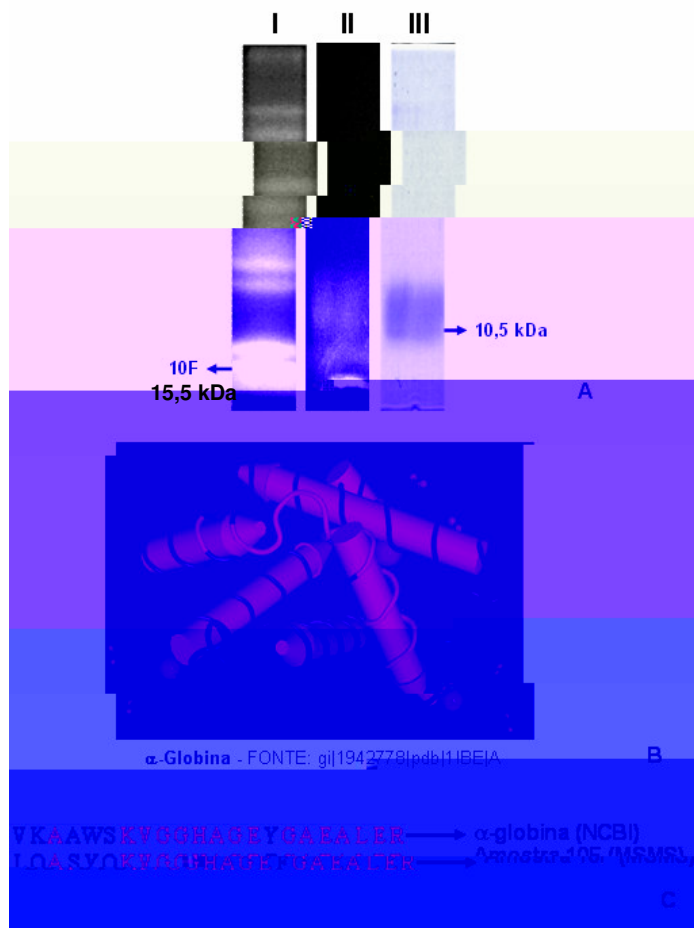


Figura 18: A) Banda 10F em (I), (II) e (III). I - fluorescência da amostra bruta em gel de poli-acrilamida 12%; II - fluorescência da banda purificada em gel de poli-acrilamida 15%. III - igual a (II), corado com azul de coomassie. B) A estrutura tridimensional da proteína identificada. C) Alinhamento da seqüência aminoacídica depositada no banco de dados com a seqüência de um peptídeo obtida por espectrometria de massas MSMS.

5.3.2 2D-PAGE

Os espermatozóides maduros, obtidos da região da cauda do epidídimo, divididos em cabeça e flagelo, também foram analisados, através de 2D-PAGE e espectrometria de massas.

As proteínas das cabeças espermáticas apresentaram uma distribuição diferente das amostras de flagelo após a eletroforese bidimensional, assim como em SDS-PAGE. Para obter melhor resolução e separação dos “spots”, foi utilizado um gradiente de pH mais estreito (IGP 4-7), na focalização isoelétrica das proteínas. Os géis obtidos a partir do homogeneizado das cabeças espermáticas apresentaram um menor número e concentração de manchas quando comparados com os géis de proteínas dos flagelos dos espermatozóides. No primeiro, foram observadas aproximadamente 24 spots estando sua grande maioria localizada entre os pHs 5-7 e 55-21 kDa (Fig. 19A). Um pequeno grupo de proteínas de pI 4,0-4,3 e 16,5-15 kDa também foi detectado. Já na amostra flagelar, foram detectados em torno de 29 “spots” entre os quais se observaram 2 formações principais em trilhos: uma de maior massa molecular (52 kDa) e a segunda, na linha de 24 kDa (Fig. 19B). No primeiro trilho, as manchas estavam distribuídas entre os pHs 5,0-5,5 e no segundo, os 7 spots apresentaram pIs entre 5 e 7. As proteínas flagelares, comparadas as obtidas da fração de cabeças de espermatozóides, tiveram uma distribuição mais ampla em relação ao ponto isoelétrico (4,5 - 7) e massa molecular (66-15 kDa), como pode ser observado na figura 23.

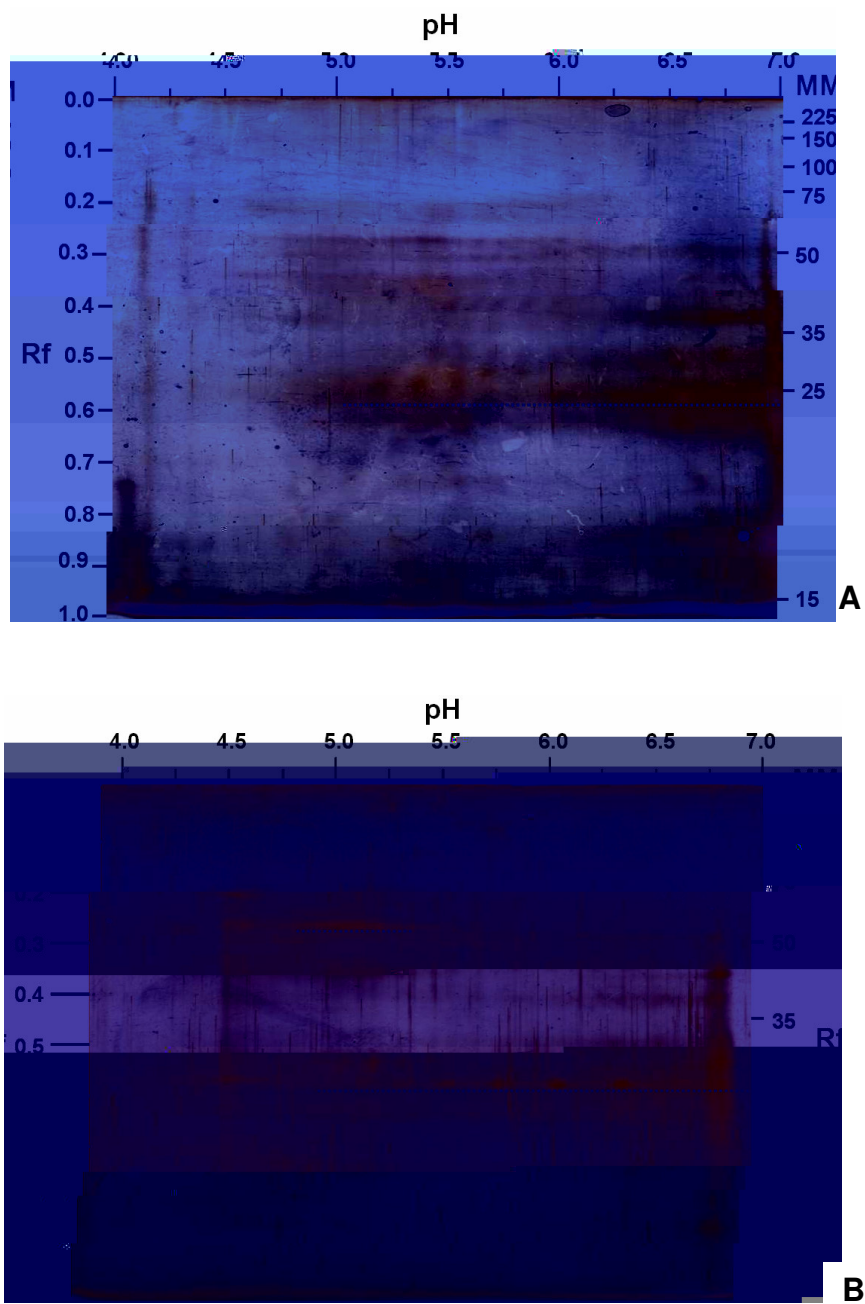


Figura 19: 2D-PAGE de proteínas da fração das cabeças (A) e flagelos (B) de espermatozóides da cauda epididimária.

5.4 - Análise proteômica das frações enriquecidas em membranas espermáticas

5.4.1 SDS-PAGE

Visando caracterizar e identificar as proteínas pertencentes à superfície dos espermatozoides, as cabeças das células espermáticas foram processadas com o objetivo de se obter uma fração enriquecida em membranas. As proteínas solubilizadas em Triton X-100 (MP1-MP2) e SDS (MP3) foram submetidas às técnicas eletroforéticas 1D e 2D. O perfil eletroforético unidimensional entre as amostras MP1, MP2 e MP3 foi bastante semelhante, tanto em géis de poliacrilamida 10% ou 15% (Fig. 20). Aproximadamente 90 µg de proteínas, de cada amostra, foram carregados

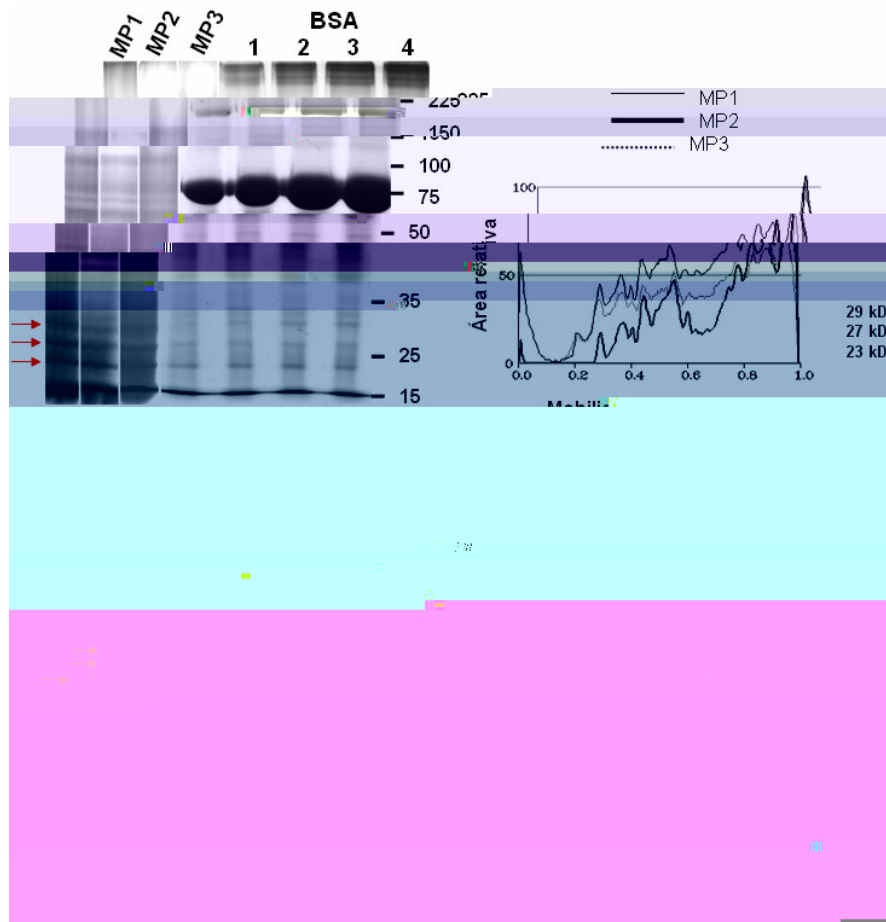


Figura 20: Eletroforese desnaturante de frações enriquecidas em membranas espermáticas. SDS-PAGE 10% (A1) e 15% (A2) e os densitogramas respectivos (B1 e B2). BSA (1) 10 μ g BSA; (2) 20 μ g BSA; (3) 30 μ g BSA; (4) 40 μ g de BSA por canal.

5.4.2 2D-PAGE / Espectrometria de massas MALDI ToF-ToF

Após a segunda dimensão, foram observadas ~17 manchas bem coradas entre aproximadamente 40 reveladas com azul de coomassie (Fig. 21). Nos géis contendo a mesma amostra (Figura 21A-B), as proteínas se distribuíram principalmente entre os pHs 4,0-5,5 e massas moleculares de 60-23 kDa. Dois “spots” de 25kDa (pI 4,1 e 4,5) se destacaram pela sua alta concentração relativa em todas as repetições realizadas. Eles fazem parte de uma seqüência de ~6 proteínas dispostas em trilhos

de isoformas (Fig. 21B). No total, 9 manchas foram selecionadas para análise por MALDI ToF-ToF, pelo critério de concentração de proteínas, entre elas as duas majoritárias de 25 kDa. O resultado da espectrometria de massas (MSMS) identificou essas duas proteínas como isoformas da triosefosfato isomerase (Fig. 21 – Tabela 3).

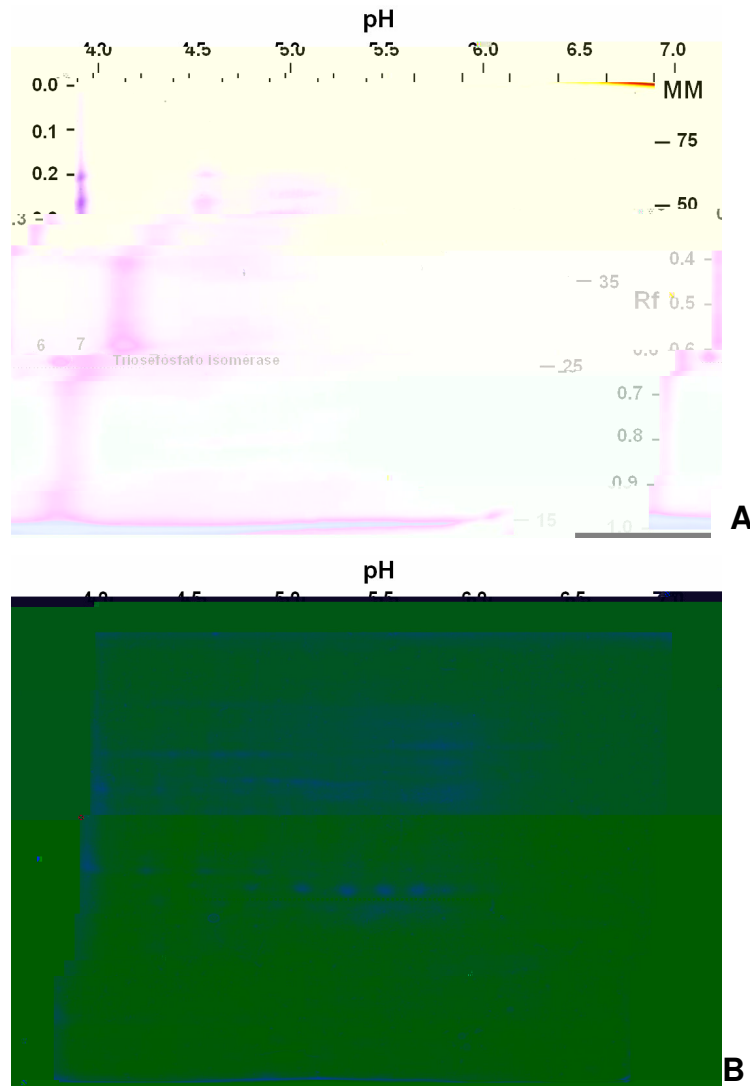


Figura 21: 2D-PAGE de proteínas de frações enriquecidas em membranas espermáticas não delipidadas (A) e após o processo de delipidação (B). Proteínas identificadas por espectrometria de massas em (A).

A eletroforese 2D da amostra enriquecida em membrana que foi previamente delipidada com metanol/acetona apresentou algumas mudanças em relação aos pontos isoeletricos das proteínas. O número e concentração das manchas foram similares tanto em MP1 como em MP2, porém a distribuição das proteínas tendeu para a região menos ácida do gel (pH 5-6) (Fig. 21B). Também, houve um ganho de resolução/separação dos “spots” em relação à amostra não delipidada.

Amostra	Proteína identificada	Seqüência aminoacídica dos peptídeos trípticos (MALDI ToF-ToF - MSMS)
CBP1	Provável NADPH flavina oxidoreutase	EQVIVLQK
CBP9, 6C	α -Tubulina	AVFVDLEPTVVDEVR
CBP2, CBP7, CBP10	β -Tubulina	FPGQLNADLR
CBP3, CBP5, CBP8, CBP11, CBD1, CBD2, CBD3, CBD4	Proteína das fibras densas externas 2	KNIDLTAIISDLR TRLEADEVAAQLER DKGDLELEIIVLNDR LAECQDQLQGYER QTAEYSAFKLENER
CBP4, CBP6, CBP12	Proteína dissulfeto isomerase	VDATEESDLAQQYGV ILFIFIDSDHTDNQR
6F	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	LTGMAFR YDSTHGR LAQPAPYSAIK LISWYDNEYGYSHR
7F, M6, M7	Triose fosfato isomerase	FFVGGNWK RHVFGESDELIGQK TATPQQAQEVHEK
7F	Canal aniônico dependente de voltagem	LSQNNFALGYK VNNASLIGLGYTQTLRPGV
8F	Glutathiona S-transferase	FSWFAGEK ITQSNAILR YTCGEAPDYDR
10F	α -Globina	DFTPELQASYQK VGGHAGEFGAEALER

Tabela 3: Seqüência de aminoácidos dos peptídeos trípticos obtidas a partir da espectrometria de massas MALDI ToF-ToF (MSMS), e as proteínas identificadas pela análise no banco de dados NCBI.

Amostra	Proteína	MM teor.	pl teor.	MM exp.	pl exp.	Nº acesso NCBI
<i>Metabolismo primário</i>						
CBP1	NADPH flavina oxidoreductase	7,900	9,52	36,400	5,1	AAAY52204
6F	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	44,596	8,57	38,000	-	NP_055179
7F	Triose fosfato isomerase	26,712	6,9	23,600	-	BAD96358
M6	Triose fosfato isomerase	26,712	6,9	25,100	4,15	NP_001013607
M7	Triose fosfato isomerase	26,712	6,9	25,100	4,5	NP_001013607
<i>Estrutura celular</i>						
CBP2	β -tubulina	57,420	4,78	50,300	5,44	NP_651606
CBP7	β -tubulina	57,420	4,78	49,840	6,51	NP_651606
CBP10	β -tubulina	57,420	4,78	50,000	7,35	NP_651606
CBP9	α -tubulina	57,433	5,00	50,780	7,36	NP_524575
6C	α -tubulina	57,433	5,00	108,000	-	NP_524575
CBP3	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	65,000	5,64	AAH78857
CBP5	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	49,680	6,27	AAH78857
CBP8	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	35,680	6,11	AAH78857
CBP11	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	66,340	5,96	AAH78857
CBP1	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	70,600	6,29	AAH78857
CBP2	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	65,400	6,53	AAH78857
CBP3	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	63,800	6,31	AAH78857
CBP4	Proteína da fibra densa externa 2	73,358	7,21	55,300	6,33	AAH78857
<i>Processamento de proteínas</i>						
CBP4	Proteína dissulfeto isomerase	57,143	4,79	51,000	6,32	PDIA1_MOUSE
CBP6	Proteína dissulfeto isomerase	57,143	4,79	49,680	6,39	PDIA1_MOUSE
CBP12	Proteína dissulfeto isomerase	57,143	4,79	50,310	6,10	PDIA1_MOUSE
<i>Detoxificação celular</i>						
8F	Glutationa S-transferase	23,232	5,63	22,000	-	XP_967405
<i>Transporte de moléculas</i>						
7F	Componente de canal aniônico dependente de voltagem 3	30,883	8,96	23,600	-	AAH69336
10F	α -globulina	15,229	8,74	10,500	-	O9XSE9

Tabela 3: Proteínas identificadas por espectrometria de massas MALDI TOF (MSMS), com suas respectivas massas moleculares e pontos isotópicos experimentais e teóricos (calculadas com a ferramenta disponível no "website" ExPASy), separadas por seu papel na célula. Número de acesso do banco de dados onde estão depositadas as identificações. CBP – espermatozóides de cabeça proximal; CBD – cabeça distal; F – flagelo espermático; C – cabeça espermática; M – fração enriquecida em membranas.

5.5 - Estudo dos estados de agregação das proteínas espermáticas

5.5.1 Eletroforese bidimensional nativo-desnaturante

As eletroforeses das proteínas espermáticas em condições nativas mostraram várias bandas protéicas, entre as quais 3 bandas majoritárias se destacaram (R_f 0,02, 0,39, 0,68) (Fig. 22A). Eletroforeses bidimensionais de proteínas de espermatozóides (da região de corpo epididimário) em gel nativo seguido do desnaturante tiveram como objetivo determinar as massas moleculares (em presença de SDS) dessas proteínas e verificar a presença de outros componentes nas mesmas bandas. A banda de R_f 0,02, após a segunda dimensão no gel desnaturante (corado por prata), revelou algumas manchas com diferentes mobilidades eletroforéticas. A análise densitométrica dessa região detectou dois componentes principais com massas moleculares de aproximadamente 87 kDa e 189 kDa (Fig. 22B). A segunda banda de mobilidade eletroforética intermediária (R_f 0,39) no gel nativo revelou uma proteína de 70 kDa e outra menor de aproximadamente 30 kDa. A banda mais intensa (R_f 0,68) do gel nativo, quando submetida a uma eletroforese desnaturante apresentou uma massa de 73 kDa. A análise densitométrica mostrou a existência de outro pico na mesma direção, porém com maior migração no gel 2D, podendo se tratar de uma proteína com pequena massa molecular presente na mesma banda (Fig. 22B). Uma vez obtidas as massas moleculares desnaturadas das proteínas majoritárias no gel nativo, verificamos supostos estados de agregação entre essas macromoléculas, e seus pesos moleculares nativos.

5.5.2 Re-eletroforese de bandas nativas em géis nativos poro transverso e determinação das massas moleculares nativas das proteínas

As bandas eletroforéticas majoritárias de R_f 0,39 e 0,68 foram submetidas a uma segunda eletroforese também em condições nativas num gel com gradiente de concentração de acrilamida (6%-18%) transversal (poro transverso) (Fig. 23). A banda de R_f 0,39 (banda A), quando submetida à eletroforese 2D em gel nativo poro transverso, revelou duas bandas muito próximas, uma mais intensa e

outra mais fraca que se cruzavam ao longo da faixa de acrilamida de 7 a 16% (Fig.

Os gráficos de Ferguson foram desenhados a partir do logaritmo dos valores de mobilidade eletroforética da proteína [$100 \times \log (100 \times R_f)$] *versus* a concentração de acrilamida. Os coeficientes angulares das retas geradas foram utilizados para inferir a massa molecular baseado nas retas obtidas a partir dos experimentos realizados com proteínas de massas conhecidas (padrão). Desta forma, foi demonstrado que as duas bandas que se cruzavam, encontradas no gel 2D oriundas da banda A (R_f 0.39), apresentaram massa molecular nativa de 66 e 94 kDa. Já a análise da banda B (R_f 0.68), mostrou que a proteína principal tem uma massa molecular nativa de 66 kDa (Fig. 24).

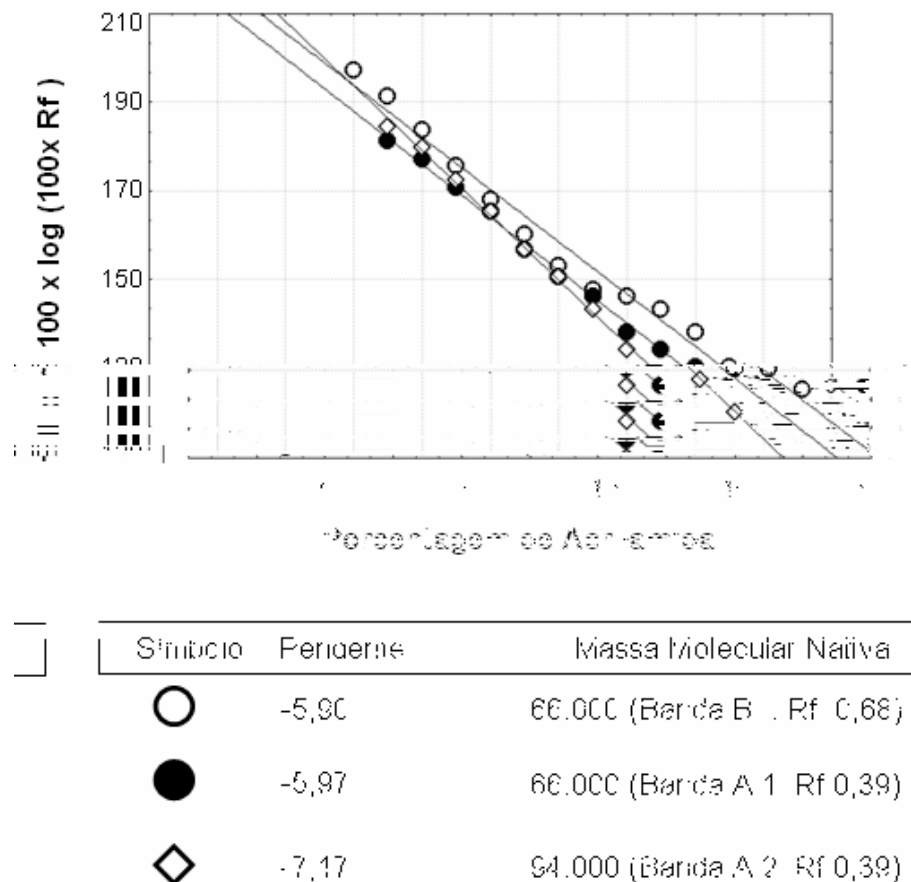


Figura 24: Gráficos de Ferguson. Proteínas em gel nativo de espermatozoides epididimários de corpo (R_f 0,39 e 0,68).

5.5.3 Participação das pontes dissulfeto na migração das proteínas espermáticas em géis bidimensionais SDS-SDS

Para verificar a participação de ligações dissulfeto nos prováveis agregados moleculares, as proteínas espermáticas da cauda do epidídimo foram separadas em uma eletroforese bidimensional desnaturante (SDS-SDS), tanto na presença como na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol. Após a coloração, com azul de coomassie, do gel 2D contendo as proteínas tratadas com β -mercaptoetanol, foram revelados pontos fora da reta esperada, indicando que a redução de pontes S-S alterou o padrão de migração de algumas proteínas (Fig. 25). As análises densitométricas dos géis com as amostras tratadas com β -ME revelaram que as proteínas principais que tiveram seu padrão de migração alterado apresentaram massas moleculares próximas de 71 kDa. Também foi detectada uma mancha de 24 kDa abaixo da proteína de 71 kDa indicando que estas proteínas teriam migrados juntas na primeira dimensão ligadas por pontes dissulfetos (Fig. 26). Este resultado também sugere que essas proteínas poderiam ser estabilizadas por ligações S-S internas e que sua redução alteraria o volume molecular e, conseqüentemente, sua migração eletroforética.

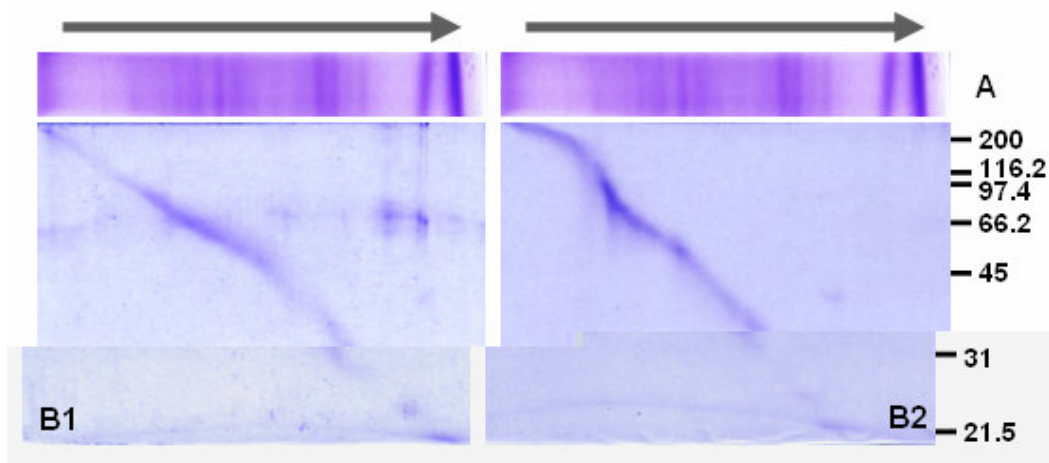


Figura 25: Eletroforese Bidimensional SDS-SDS de proteínas de espermatozóides da cauda epididimária. A) Primeira dimensão (SDS-PAGE 12%) sem β -mercaptoetanol; B) Segunda dimensão (SDS-PAGE 12%) na presença (1) e na ausência (2) do agente redutor.

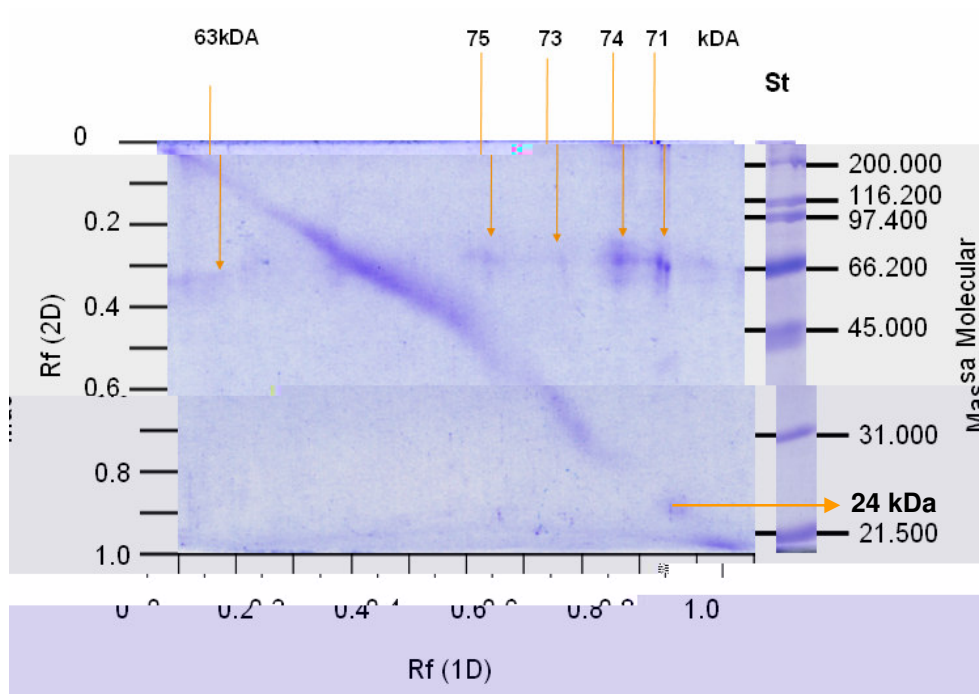


Figura 26: Gel Bidimensional SDS-SDS de proteínas de espermatozóides da cauda epididimária com β -mercaptoetanol. Em destaque as massas moleculares das manchas que migraram fora da reta.

6 - DISCUSSÃO

As diferenças observadas entre os perfis protéicos de espermatozóides coletados das diferentes regiões do epidídimo corroboram dados prévios que indicam alterações da estrutura macromolecular do gameta durante o processo de maturação espermática (López e de Souza, 1991; Retamal et al., 2000a). Clivagem e remodelação de proteínas integrais da membrana espermática são alguns mecanismos responsáveis pelas modificações seqüenciais que experimenta a membrana do espermatozóide durante o percurso epididimário (Dacheux et al., 2003; Tulsiani, 2003).

As diferenças entre as proteínas de espermatozóides obtidos das diferentes regiões epididimárias também abrangem o padrão tiól – dissulfeto dessas moléculas. Verificou-se um conteúdo menor de grupos tióis em proteínas de espermatozóides da cauda comparados com as proteínas obtidas dos espermatozóides da cabeça epididimária. Este resultado sugere a oxidação desses grupamentos SH durante a passagem do gameta pelo epidídimo, o que já foi observado em outras espécies (Shalgi et al., 1989). Uma situação similar foi observada nos grupos SH presentes nas protaminas do núcleo espermático. Resultados prévios mostraram que espermatozóides epididimários da região da cauda são mais resistentes a descondensação nuclear do que os da cabeça epididimária, quando tratados com agentes redutores de pontes S-S (Dias, 2004; Dias et al, 2006). Esta estabilização adquirida confere ao núcleo uma maior resistência durante seu percurso pelas vias seminais e no trato reprodutivo da fêmea e facilita a penetração do espermatozóide à zona pelúcida (Bedford e Calvin, 1974; Dias, 2004). Os estudos de marcação de grupos SH em proteínas espermáticas detectaram grande quantidade de grupamentos tióis nas bandas com massas moleculares aproximadas a 111, 88, 72, 61, 51, 27 e 13-7 kDa. Dados obtidos a partir do tratamento dos espermatozóides com DTT, nos permitem sugerir que as proteínas de 29 e 14 kDa tiveram seus grupos tióis oxidados em pontes S-S durante a passagem do gameta pelo epidídimo. É provável que a proporção de dímeros em

relação aos monômeros que, como observado em espermatozoides coletados do corpo epididimário, já é grande, aumente ainda mais em espermatozoides maduros da cauda do epidídimo por ligações dissulfetos inter-moleculares. Como foi detectado na análise densitométrica, a área fluorescente das proteínas de espermatozoides da cauda epididimária praticamente dobra após o tratamento com DTT (Figura 9). Esse resultado nos leva a sugerir que aproximadamente 50% dos grupos SH das proteínas espermáticas são oxidados principalmente durante a passagem dos espermatozoides do corpo para a cauda do epidídimo.

Os experimentos de detecção de proteínas-SH em cabeça e flagelo dos espermatozoides revelaram diversas bandas fortemente marcadas. Assim como no homogeneizado de espermatozoides, as proteínas flagelares apresentaram uma fluorescência mais intensa na região de menor massa molecular (17-12 kDa) (Fig. 11). Já na amostra de proteínas da cabeça, a marcação mais forte ocorreu na proteína de 29 kDa. Esses dados, juntamente com a semelhança entre o perfil protéico de espermatozoides inteiros e flagelares, indicam que em um extrato espermático, essas proteínas representam a maioria das proteínas totais.

A variação de massa molecular (mobilidade eletroforética) encontrada em algumas proteínas após sua purificação em géis de poliacrilamida desnaturantes ocorreu, tanto nas amostras de cabeça, como nas de flagelo. Uma vez que essas proteínas purificadas são ricas em grupamentos SH, provavelmente ocorreu a formação de complexos entre elas pela oxidação dos tióis em pontes dissulfeto. Na amostra de cabeça espermática, a banda 2C apresentou 19,5 kDa na primeira dimensão e 56 kDa na segunda, o que seria explicado com o surgimento de um trímero. A mesma hipótese poderia ser considerada para a banda 3C, já a condição de dímeros seria encontrada nas amostras 4C, 5C e 6C. Teoricamente, as condições eletroforéticas (em presença de SDS e β -mercaptoetanol) foram as mesmas, porém o uso do agente redutor poderia não ser suficiente para manter o estado reduzido dos grupos SH das proteínas em questão após a re-eletroforese. As α -tubulinas,

identificada na amostra 6C, apresentam as características de se ligarem entre si ou a moléculas semelhantes (β -tubulina) na polimerização dos microtúbulos.

As tubulinas são moléculas abundantes no flagelo espermático onde formam os microtúbulos do axonema. Porém nossas análises proteômicas encontraram uma α -tubulina na amostra de cabeças espermáticas. Em concordância com esse resultado, Dvorakova et al. (2005) demonstraram a presença das três proteínas principais do citoesqueleto, actina, tubulina e espectrina, na cabeça do espermatozóide. Foi também demonstrado mudanças na localização de proteínas do citoesqueleto durante a reação acrossomal, principalmente no acrossoma apical com posteriores mudanças no segmento equatorial e região pós-acrossomal. Essas observações apóiam a idéia de que as proteínas do citoesqueleto, como estruturas altamente dinâmicas, participariam nos processos pré-fertilização (Dvorakova et al., 2005).

Todas as identificações de proteínas presentes neste estudo foram obtidas por espectrometria de massas MALDI ToF-ToF (MS/MS) através do sequenciamento dos peptídeos, garantindo grande confiabilidade e acurácia.

Na amostra de flagelo foram encontradas proteínas do metabolismo primário (Ex.: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase S), detoxificação celular (glutathiona S-transferase) e proteína envolvidas no transporte de moléculas (canal aniônico dependente de voltagem 3), além de uma α -globina na banda 10F. É provável que a α -globina pertença às células vermelhas sanguíneas, que eventualmente contaminavam a amostra na obtenção dos espermatozóides do epidídimo.

A localização das enzimas glicolíticas, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (banda 6F) e da triose fosfato isomerase (banda 7F), na fração flagelar está em acordo com a presença da bainha mitocondrial na peça intermediária. A concentração das etapas da respiração celular na mesma região do espermatozóide otimizaria o processo de geração de energia.

A triosefosfato isomerase (TPI) é uma enzima expressa ubiquamente que catalisa a interconversão de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldeído-3-fosfato na via glicolítica geradora de energia. Defeitos herdados no gene *TPI* são

[REDACTED]

os tecidos resultando no bloqueio metabólico da glicólise, com acúmulo de DHAP

[REDACTED]

A gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPD) oxida o gliceraldeído 3-fosfato, produzido pela triosefosfato isomerase, gerando 1,3 bisfosfoglicerato e dois NADH_2 . Estudos imunohistoquímicos encontraram a GAPD2 (homólogo da *GAPDS* em camundongos) na peça principal do flagelo de espermatozoides humanos, assim como a GAPDS em espermatozoides de camundongos e ratos. [GAPD2.95646\(i\)-8.44863\(s\(ã\)14.96](#)

espectrometria de massas MALDI ToF-ToF. Esses resultados estão em acordo com o observado em nossos experimentos, onde foram identificadas pela mesma metodologia duas isoformas da TPI (pI 4,1 e 4,5) de ~25 kDa em amostras enriquecidas em membranas espermáticas. A exposição do espermatozóide capacitado aos anticorpos anti-P36 não tiveram nenhum efeito no reconhecimento primário, mas inibiram a ligação secundária à zona pelúcida e a reação acrosomal induzida por Ca^{2+} ionóforo. (Auer et al., 2004).

A análise da amostra 7F por espectrometria de massas também revelou outra proteína distinta da TPI, um canal aniônico dependente de voltagem 3 (VDAC 3). Em géis desnaturantes unidimensionais, é comum diferentes macromoléculas com massas moleculares próximas co-migrarem na mesma banda, já que a separação só considera o tamanho molecular das proteínas. Discutiremos adiante o possível papel dessa proteína identificada na fisiologia do espermatozóide. A presença da mesma proteína em mais de uma banda eletroforética também é possível, uma vez que os estados de agregação de uma proteína possibilitam diferentes tamanhos moleculares à mesma. Dessa forma, as bandas 1F, 3F e 4F poderiam conter a mesma proteína como sugerido pelos nossos resultados.

As alterações/danos celulares causados por espécies oxigênio reativas (ROS) e principalmente o papel das enzimas antioxidantes na proteção da célula também tem sido foco de interesse na pesquisa com sêmen eqüino.

Por exemplo, a etiologia do câncer testicular, que está fortemente relacionado com mutações na linha germinal, é induzida por radicais livres. Um incremento dos níveis de espécies reativas de oxigênio nas secreções do trato reprodutor masculino ou da vagina pode induzir estresse oxidativo ao espermatozóide e subsequentemente diminuição da motilidade, aumento de patologias espermáticas e menor capacidade de interação com a zona pelúcida do ovócito (Carlsen et al., 1992; Potts et al., 2000). Entretanto tem-se sugerido que a geração de pequenas e controladas quantidades de ROS modula funções fisiológicas do espermatozóide tais como a capacitação, que compreende uma série

de transformações metabólicas e membranares que estas células sofrem no trato reprodutor feminino (De Lamirande e Gagnon, 1998, 2003).

A glutational S-transferase (GST), identificada na amostra 8F por MALDI TOF, consiste em um grupo de isoenzimas que conjugam a glutational a compostos eletrofílicos, potencialmente carcinógenos, tornando-os menos tóxicos e mais facilmente excretáveis pelo organismo. Além do câncer, sua ação detoxificante é importante na proteção contra estresse oxidativo e outras doenças degenerativas, incluindo aquelas associadas com o envelhecimento (Babbitt, 2000).

A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo glutational-SH (GSH) é catalisada, na sua fase inicial, pela GST que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e outras macromoléculas (Dybing et al., 2002; Malmezat et al., 2000). Hayes et al. (2005) mencionam que as GSTs do citoplasma dos mamíferos são todas diméricas com subunidades de 199-244 aminoácidos. Baseado na semelhança da cadeia de aminoácidos, sete classes de GST citosólicas são reconhecidas e denominadas Alpha (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Theta (θ), Omega (Ω) e Zeta (ζ).

Na superfície do espermatozóide, a glutational S-transferase (GSTs) existe como proteína ligadora de ovócitos mas seu papel detoxificador nesta célula ainda não é conhecido. Usando modelos de disfunção espermática induzidos por H_2O_2 e 4-hidroxinonenal, Hemachand e Shaha (2003) demonstraram que as GSTs da superfície espermática são capazes de usar glutational reduzida extracelular para inibir a perda de competência funcional dos espermatozoides de caprinos. Homens férteis tiveram níveis de glutational significativamente maiores quando comparados com homens subférteis. No fluido seminal, a presença da glutational S-transferase A1-1 e P1-1 sugerem um papel protetor contra danos oxidativos no espermatozóide, enquanto a glutational deva atuar na fertilidade masculina (Raijmakers et al., 2003).

Com os ensaios de 2D-PAGE das proteínas totais dos espermatozoides epididimários, utilizando um IPG 3-10, foram separados aproximadamente 60

manchas nas 4 amostras. Exceto algumas diferenças na concentração relativa, pontos isoelétricos e desaparecimento e/ou surgimento de algumas manchas, os perfis protéicos dos espermatozóides obtidos da cabeça proximal, distal, corpo e cauda do epidídimo, se mostrou basicamente igual. O mesmo foi encontrado nas análises eletroforéticas unidimensionais. A análise em géis 2D resolve melhor os componentes de um determinado “pool” de proteínas o que, conseqüentemente determina com mais precisão as diferenças entre amostras. Através dessa técnica foram detectadas grande variedade de trilhos de manchas com diferentes pIs provavelmente por serem isoformas da mesma proteína. Esse comportamento tem sido descrito para algumas enzimas encontradas no sêmen de eqüinos, como por exemplo, a α -manosidade (Dias, 2002; Dacheaux et al., 2003; Faria, 2005).

Entre as proteínas totais espermáticas obtidas, as análises por MALDI-ToF MS/MS identificaram algumas proteínas associadas ao citoesqueleto (proteínas da fibra densa externa 2 e α / β -tubulinas), proteínas disulfeto isomerase e uma proteína homóloga da NADPH flavina-oxidoreductase.

Em nossa análise, os componentes mais abundantemente encontrados nas amostras de espermatozóides obtidos tanto da cabeça proximal como da cabeça

analisada por sequenciamento de peptídeos após proteólise restrita. As seqüências de peptídeos foram identificadas como VDAC2 e 3. VDACs (canais aniônicos dependente de voltagem) ou porinas eucarióticas são um grupo de proteínas primeiramente identificados na membrana externa da mitocôndria que são capazes de formar poros hidrofílicos em membranas. VDAC1, 2 e 3 foram detectados por anticorpos específicos em extratos de proteínas de espermatozóides bovinos, enquanto VDAC2 e 3 foram encontrados como proteínas solubilizadas derivadas da purificação de ODFs bovinos. Microscopia de imunofluorescência dos espermatozóides revelou que anti-VDAC2 e 3 se ligam ao flagelo espermático, em particular as ODF.

Tem sido proposto uma outra função para os VDACs no flagelo espermático, uma vez que as ODF não são estruturas membranosas e não são envoltos pelas mesmas. Devido a ODF estar intimamente associada com o axonema que contém a cadeia leve da dineína (Tctex) e microtúbulos, VDAC poderiam exercer um papel na regulação da motilidade espermática ou integridade estrutural do flagelo espermático através de interações com proteínas Tctex ou proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (Hinsch, et al., 2004). Sampson et al. (2001) tem demonstrado que a falta de VDAC3 em camundongos leva a defeitos no axonema, produzindo espermatozóides imóveis e por conseqüência inférteis. Cientistas vêm apoiando a hipótese de que VDACs estariam transportando ATP da mitocôndria para as ATPases dineína mais distais na peça principal e/ou protegendo o ATP da hidrólise prematura. Devido a sua proximidade da região do axonema que demanda energia, a ODF poderia servir como uma bateria para armazenamento que constantemente supre o axonema com energia e imediatamente provê altos níveis de ATP quando é necessário (Hinsch, et al., 2004).

Considerando que os componentes das fibras densas externas do flagelo, principalmente a ODF2, são ricos em pontes dissulfeto e zinco (Calvin et al., 1975; Calvin e Bleau, 1974), poderíamos sugerir que os mesmos corresponderiam ao perfil das proteínas associadas à polipeptídeos por ligações S-S detectadas em

nossos experimentos. Futuros experimentos se fazem necessários para averiguar esta hipótese.

Muitas proteínas dependem de pontes dissulfeto, intra / inter-molecular, para seu correto funcionamento. A formação de pontes S-S nativas é um processo complexo. As ligações dissulfeto podem não apenas serem formadas (oxidação), mas também ligações incorretas devem ser quebradas (redução) ou rearranjadas (isomerização) (Ellgaard e Ruddock, 2005). As proteínas dissulfeto isomerase, membros da superfamília das tioredoxinas, podem catalizar a oxidação tiól-dissulfeto, redução e isomerização que pode acontecer diretamente através do rearranjo intramolecular dos dissulfetos ou através de ciclos de redução e oxidação (Schwaller et al., 2003).

Estudos usando anticorpos em secções de testículos de rato mostraram a localização específica das isoformas das dissulfeto isomerase no acrossoma em desenvolvimento das espermátides. A proteína foi transferida do aparelho de Golgi para a vesícula acrossômica, no final da fase Golgi, onde se mantiveram até o final da fase de maturação da espermátides. Além do acrossoma, a PDI apareceu no núcleo das espermátides durante a fase de maturação e foi localizada no núcleo do espermatozóide epididimário (Ohtani et al., 1993). Uma vez que a PDI também cataliza a oxidação de grupos tióis (Kemink et al., 1996), sua presença no núcleo de espermatozóide epididimários poderia ter alguma relação com a formação de pontes dissulfeto intra e inter-protaminas adjacentes durante a maturação espermática no epidídimo.

Para a visualização da marcação das proteínas-SH espermáticas após a eletroforese bidimensional, foi realizado um experimento 2D-PAGE segundo o autor (O'Farrel, 1975) sem as modificações posteriores feitas por Gorg et al. (1980) e Bjellqvist et al. (1982). Na técnica original era construído um gel de focalização onde o gradiente de pH era gerado através dos anfólitos adicionados, polimerizados com a matriz de acrilamida (ver em Materiais e Métodos). A focalização isoeletrica foi realizada a 100V por aproximadamente 5h, preservando a marcação tiól que era

perdida durante o mesmo processo de eletrofocalização sob alta voltagem (28.000 V/h) no sistema de focalização IPGphor® .

Entretanto na nossa primeira tentativa o gradiente de pH gerado (6-7,5) não correspondeu ao esperado (3-10), provavelmente devido ao tempo insuficiente de focalização. Ainda assim, foi observado a marcação de grupos SH na região correspondente ao pI 6,5 e massas moleculares 100-60 kDa, embora a coloração do gel por prata não tivesse revelado nenhuma mancha importante na mesma região.

de cabeça proximal quando comparados com os de cauda apresentaram uma menor quantidade/concentração de spots (proteínas na região de 30-15 kDa) onde se encontra a TPI. A NADPH flavina oxidoreductase (36 kDa), enzima envolvida no ciclo das pentoses, foi encontrada em espermatozóides imaturos numa mancha de intensidade razoável, portanto não seria um ponto de bloqueio da produção energética. A TPI, como proteína de superfície ligadora de zona pelúcida/oócito (Auer et al., 2004), poderia promover também a aproximação dos gametas ligando-se a um substrato na superfície ovocitária. O VDAC, encontrado em espermatozóides maduros, tem sido visto como um ligador, transportador e armazenador de ATP mitocondrial para as necessidades da dineína ATPase nas regiões mais distais da peça principal (Hinsh et al., 2004). Esta proteína associada às ODFs para desempenhar tal função foi encontrada na banda purificada 7F, junto da TPI. Esses dados em conjunto sugerem que estas enzimas/proteínas poderiam estar regionalizadas no flagelo do espermatozóide, e/ou associadas entre si, provavelmente regulando o padrão de motilidade do gameta.

Nossos resultados de eletroforeses bidimensionais (Nativo-Nativo PT / SDS-Nativo / SDS-SDS) também sugerem que algumas proteínas espermáticas estariam sob a forma de agregados / complexos no estado natural. Entre elas estariam as proteínas majoritárias dos espermatozóides, como a de 70 kDa, que estabeleceriam interações moleculares com componentes menores (ex.: 24 kDa), principalmente pontes S-S. Essa proteína, em condições nativas, se apresentaria sob duas formas: um monômero e um heterodímero de ~94 kDa. Esse dado foi obtido através da determinação das massas moleculares nativas em géis poro transversal (PT). A re-eletroforese da banda do gel nativo de Rf 0,39 no gel nativo PT, que em géis SDS 2D aparentou 70 kDa, revelou uma majoritária de 94 kDa e outra menos abundante de 66 kDa. Esses dados nos levam a sugerir que essas proteínas de 70 e 66 kDa seriam as mesmas proteínas e que a banda de maior massa (94 kDa) poderia representar um agregado protéico (ex.: 66/70 + 24 kDa).

7 - CONCLUSÕES

1) Espermatozoides de eqüinos possuem uma grande variedade de constituintes protéicos os quais apresentam diferenças nas suas características eletroforéticas e concentração rapa

5) Os resultados das eletroforeses bidimensionais (2D-PAGE) de proteínas de espermatozóides epididimários revelaram várias manchas e trilhos de proteínas de diferentes intensidades e distribuição (pH 5.0-7.5 e massa molecular 107-15 kDa). A maioria das manchas apresentou mobilidade eletroforética e concentração relativa similares nos espermatozóides das diferentes regiões epididimárias. As proteínas da cabeça, flagelo e fração enriquecida em membranas se distribuíram principalmente entre o pH 5-7; 4,5-7 e 4-5,5 e massas moleculares 55-21, 66-15 e 60-23 kDa, respectivamente. Muitas proteínas pareceram ser polimórficas se dispondo em trilhos de diferentes pontos isoelétricos (pIs).

6) As análises de espectrometria de massas das proteínas purificadas da cabeça e flagelo de espermatozóides bem como das proteínas separadas 2D-PAGE permitiram identificar as enzimas NADPH flavina oxidoreductase, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (G3PDH), triose fosfato isomerase (TPI), proteína dissulfeto isomerase (PDI), glutathione S-transferase (GST). Foram também detectadas as proteínas estruturais α -tubulina, β -tubulina, proteína da fibra densa externa 2 (ODF2) e um canal aniônico dependente de voltagem 3 (VDCA3).

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, R.J.; Paterson, M.; Fisher, H.; Buckingham, D.W.; van Duin, M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.* 108: 2017-2025.
- Ationu, A.; Humphries, A. (1998). The feasibility of replacement therapy for inherited disorder of glycolysis: triosephosphate isomerase deficiency. *Int. J. Mol. Med.* 2: 701-704. Review.
- Auer, J.; Camoin, L.; Courtot, A.M.; Hotellier, F.; De Almeida, M. (2004). Evidence that P36, is a human sperm acrossomal antigen involved in the fertilization process is triosephosphate isomerase. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 515-523.
- Babbitt, P.C. (2000). Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. *Proc. Nat. Acad. Sci. Washington.* 97(19): 10293-10300.
- Baccetti, B.; Pallini, V.; Burrini, A.G. (1973). The accessory fibres of the sperm tail. 1. Structure and chemical composition of the bull 'coarse fibres'. *J. submicroscop. Cytol.* 5: 237-256.
- Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 93: 298-305.
- Baltz, J.M.; Williams, P.O.; Cone, R.A. (1990). Dense fibres protect mammalian sperm against damage. *Biol. Reprod.* 43: 485-491.
- Bedford, J.M.; Calvin, H.I. (1974). The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.* 188, 137-156.

- Bedford, J.M. (1994). The status and the state of the human epididymis. *Hum. Reprod.* 9 (11), 2187-2199.
- Berube, B.; Sullivan, R. (1994). Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol. Reprod.* 51, 1255-1263.
- Berube, B.; Lefievre, L.; Coutu, L.; Sullivan, R. (1996). Regulation of the epididymal synthesis of P26h, a hamster sperm protein. *J. Androl.* 17, 104-110.
- Bjellqvist, B.; Ek K; Righetti, P.G.; Gianazza, E.; Gorg, A.; Westermeier, R.; Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods. Sep;* 6(4), 317-339.
- Bone, W.; Jones, A.R.; Morin, C.; Nieschlag, E.; Cooper, T.G. (2001). Susceptibility of glycolytic enzyme activity and motility of spermatozoa from rat, Mouse, and human to inhibition by proven and putative chlorinated antifertility compounds in vitro. *J. Androl.* 22: 464-470.
- Bork, P.; Beckmann, G. (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J. Mol. Biol.* 231(2):539-45.
- Boue, F.; Berube, B.; De Lamirande, E.; Gagnon, C.; Sullivan, R. (1994). Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol. Reprod.* 51, 557-587.
- Boue, F.; Blais, J.; Sullivan, R. (1996). Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54, 1009-1017.

- Boue, F.; Sullivan, R. (1996). Cases of human infertility are associated with the absence of P34H na epididymal sperm antigen. *Biol. Reprod.* 54, 1018-1024.
- Bozzo, S.; Retamal, C. (1991). Geles unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Arch. Biol. Med. Exp.* 24, R181.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burkin, H.; Miller, D.J. (2000). Zona pellucida protein binding ability of porcine sperm during epididymal maturation and the acrossome reaction. *Dev. Biol.* 222, 99-109.
- Busso, D.; Cohen, D.J.; Da Ros, V.; Fissore, R.; Cuasnicu, P.S. (2003). Studies on the participation of epididymal sperm protein DE/CRISP-1 in egg activation. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 49(3):407-12.
- Calvete, J.J.; Campanero-Rhodes, M.A.; Raida, M.; Sanz, L. (1999). Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Lett.* 444(2-3):260-4.
- Calvete, J.J.; Raida, M.; Gentzel, M.; Urbanke, C.; Sanz, L.; Topfer-Petersen, E. (1997). Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.* 407(2):201-6.
- Calvete, J.J.; Reinert, M.; Sanz, L.; Töpfer-Petersen, E. (1995). Effect of glycosilation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *J. Chromatogr.* 711 (1), 167-173.

- Calvin, H.I.; Bleau, G. (1974). Zinc-thiol complexes in keratin-like structures of rat spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 86, 280-284.
- Calvin, H.I.; Hwang, F.H.F.; Wohlrab, H. (1975). Localization of zinc in a dense fiber-connecting piece fraction of rat sperm tails analogous chemically to hair keratin. *Biol. Reprod.* 13, 228-239.
- Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305: 609-613. Review.
- Collard, M.W.; Griswold, M.D. (1987). Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat sertoli cells. *Biochemistry.* 26, 3297-3303.
- Cooper, T.G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 119-136.
- Cooper, T.G.; Hamilton, D.W. (1977). Observations on destruction of spermatozoa in the cauda epididymidis and proximal vas deferens of non-seasonal male mammals. *Am. J. Anat.* May; 149(1), 93-110.
- Cornwall, G.A.; Orgebin-Crist, M.C.; Hann, S.R. (1992). The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. *Mol. Endocrinol.* 6: 1653-1664.
- Cornwall, G.A.; Hann, S.R. (1995). Specialized gene expression in the epididymis. *J. Androl.* 16(5), 379-383. Review..
- Cuasnicu, P.S.; Ellerman, D.A.; Cohen, D.J.; Busso, D.; Morgenfeld, M.M.; Da Ros, V.G. (2001). Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch. Med. Res.* 32(6):614-8. Review.

- Da Ros, V.G.; Munuce, M.J.; Cohen, D.J.; Marin-Briggiler, C.I.; Busso, D.; Visconti, P.E.; Cuasnicu, P.S. (2004). Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biol. Reprod.* 70(5):1325-32.
- Dacheux, J.L.; Paquignon, M.; Lanneau, M. (1984). Sequential analysis of the epididymal sperm maturation process in the boar. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 438: 526-529.
- Dacheux, J.L.; Gatti, J.L.; Dacheux, F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61, 7-17.
- Davies Morel, M.C.G. (1999). *Equine artificial insemination*. CBAI publishing. London, UK.
- De Lamirande, E.; Gagnon, C. (1998). Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human sperm capacitation and superoxide production. *Free Radic. Biol. Med.* V25, n7, 803-817.
- De Lamirande, E.; Gagnon, C. (2003). Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic. Biol. Med.* 35(10): 1271-1285.
- Dias, A.J.B. (2002). *Detecção e caracterização de glicosidases no epidídimo e sêmen de eqüinos*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF. 58p.
- Dias, A.J.B.; Maia, A.M.S.; Retamal, C.; López, M.L. (2004). Identification and partial characterization of alpha1,4-glucosidase activity in equine epididymal fluid and seminal plasma. *Theriogenology.* 61: 1545-1558.

- Dias, G.M. (2004). Características nucleares de espermatozóides imaturos e maduros de *Equus caballus*. Monografia defendida na Universidade Estadual do Norte Fluminense para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Dias, G.M.; Retamal, C.A.; Tobella, L.; Arnholdt, A.; López, M.L. (2006). Nuclear status of stallion immature and mature spermatozoa. *Theriogenology*. 66: 354-365.
- Donkor, F.F.; Mönnich, M.; Czirr, E.; Hollemann, T.; Hoyer-Fender, S. (2004). Outer dense fibre protein 2 (ODF2) is a self-interacting centrosomal protein with affinity for microtubules. *J. Cell Sci.* 117: 4643-4651.
- Dvorakova, K.; Moore, H.D.; Sebkova, N.; Palecek, J. (2005). Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*. 130: 61-69.
- Dybing, E.; Doe, J.; Groten, J.; Kleiner, J.; O'Brien, J.; Renwick, A.G.; Schlatter, J.; Steinberg, P.; Tritscher, A.; Wlaker, R.; Younes, M. (2002). Hazard characterization of chemicals in food and diet. *Food Chem. Toxic.* 40: 237-282.
- Eccleston, E.D.; White, T.W.; Howard, J.B.; Hamilton, D.W. (1994). Characterization of a cell surface glycoprotein associated with maturation of rat spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 37(1), 110-119.
- Eddy, E.M.; O'Brain, D.A. (1994). The spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. and Neil J.D. eds., Raven Press Ltd., New York, 2nd ed., 29-77.

- Ekhlesi-Hundrieser, M.; Schafer, B.; Kirchhoff, C.; Hess, O.; Bellair, S.; Muller, P.; Topfer-Petersen, E. (2005a). Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 70(1):45-57.
- Ekhlesi-Hundrieser, M.; Gohr, K.; Wagner, A.; Tsoлова, M.; Petrunkina, A.; Topfer-Petersen, E. (2005b). Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol. Reprod.* 73(3):536-45.
- Ekhlesi-Hundrieser, M.; Sinowatz, F.; Greiser De Wilke, I.; Waberski, D.; Topfer-Petersen, E. (2002). Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Mol. Reprod. Dev.* 61(1):32-41.
- Ellerman, D.A.; Da Ros, V.G.; Cohen, D.J.; Busso, D.; Morgenfeld, M.M.; Cuasnicu, P.S. (2002). Expression and structure-function analysis of de, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. *Biol. Reprod.* 67(4):1225-31.
- Ellgaard, L.; Ruddock, L.W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO reports.* 6: 28-32. Review.
- Ellis, D.J.; Shadan, S.; James, P.S.; Henderson, R.M. Edwardson, J.M.; Hutchings, A.; Jones R. (2002). Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 138: 187-198.

- Esther, Jr; C.R.; Howard, T.E.; Marino, E.M.; Goddard, J.M.; Capecchi, M.R.; Bernstein, K.E. (1996). Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology and reduced male fertility. *Lab. Invest.* 74, 953-965.
- Evans, J.P. (1999). Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front. Bioscience* 4: D114-131.
- Evans, J.P. (2001). Fertilin beta and other Adams as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* 23: 628-639.
- Faria, L.M. (2005). Análise da atividade glicosidásica no sêmen de garanhões em função do potencial fertilizante. Monografia defendida na Universidade estadual do Norte Fluminense para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Frenette, G.; Sullivan, R. (2001). Protasome-like particles are involved in the transfer of p25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 115-121.
- Frenette, G.; Lessard, C.; Sullivan, R. (2002). Selected proteins of "protasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol. Reprod.* 67, 308-313.
- Fournier-Delpech, S.; Thibault, C. (1993). Acquisition of sperm fertilizing ability. Epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: *Reproduction in mammals and man*. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter (eds.) Ellipses. Paris. 257-278.

- Gatti, J.L.; Druart, X.; Guerin, Y.; Dacheux, F.; Dacheux, J.L. (1999). A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE) evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol. Reprod.* 60: 937-945.
- Gatti, J.L.; Belghazi, M.; Métayer, S.; Dacheux, F.; Dacheux, J.L. (2003). Proteomic analysis of epididymal fluid exosome-like vesicles (epididymosomes). In: 28th Annual Meeting of the American Society of Andrology, Phoenix, Arizona, p. 36.
- Gatti, J.L.; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Métayer, S.; Thimon, V.; Dacheux, J.L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reprod. Sci.* 82-83, 321-339.
- Gorg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E, Righetti PG. (1980) Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers. *J Biochem Biophys Methods* 3(5): 273-84.
- Griswold, M.D.; Roberts, K.; Bishop, P. (1986). Purification and characterization of a sulfated glycoprotein secreted by Sertoli cells. *Biochemistry.* 25, 7265-7277.
- Harper, M.J.K. (1994). Gamete and zygote transport. In: *Physiology of Reproduction.* E. Knobil & J.D. Neill. Raven Press. Ltda. N.Y. p. 123-188.
- Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; Jowsey, I. (2005). Glutathione transferases. *Annual Rev. Pharm. Toxic.* 45: 51-88.
- Hemachand, T.; Shaha, C. (2003). Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Lett.* 538: 14-18.

- Hinsch, K-D.; De Pinto, V.; Aires, V.A.; Schneider, X.; Messina, A.; Hinsch, E. (2004). Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J. Biol. Chem.* 279: 15281-15288.
- Hinton, B.T.; Palladino, M.A. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* Jan 1:30(1) 67-81. Review..
- Hinton, B.T.; Palladino, M.A.; Rudolph, D.; Ladus, J. (1995). The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.* 7: 731-745.
- Hinton, B.T.; Palladino, M.A.; Rudolph, D.; Lan, Z.J.; Labus, J.C. (1996). The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Curr. Top. Dev. Biol.* 33, 61-102.
- Holstein, A.F. (1978). Spermatophagy in the seminiferous tubules and excurrent ducts of the testis in Rhesus monkey and in man. *Andrologia.* 10(5): 331-352.
- Hoshiba, H.; Sinowatz, F. (1998). Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anat. Histol. Embryol.* 27: 351-353.
- Howes, E.A.; Hurst, S.; Laslop, A.; Jones, R. (1998). Cellular distribution and molecular heterogeneity of mac393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 673-681.
- Hunnicut, G.R.; Koppel, D.E.; Myles, D.G. (1997). Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev. Biol.* 1: 191(1), 146-159.

- Kemmink, J.; Darby, N.D.; Dijkstra, K.; Nilges, M.; Creighton, T.E. (1996). Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 35: 7684-7691.
- Kirchhoff, C.; Osterhoff, C.; Pera, I.; Schroter, S. (1998). Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia*. 30, 225-232.
- Krisfalusi M, Miki K, Magyar PL, O'Brien DA. (2006). Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 75: 270-278.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T⁴. *Nature Lond.* 227, 680-685.
- Leeb, T.; Sieme, H.; Töpfer-Petersen, E. (2005). Genetic markers for stallion fertility—lessons from humans and mice. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 21-29. Review.
- Légaré, C.; Berube, B.; Boue, F.; Lefièvre, L.; Morales, C.R.; El-Alfy, M.; Sullivan, R. (1998). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 225-233.
- López, M.L.; De Souza, W.; Bustos, E. (1987). Cytochemical analysis of the anionic sites on the membrane of the stallion spermatozoa during the epididymal transit. *Gamete Res.* 18, 319-332.
- López, M.L.; de Souza, W. (1991). Distribution of filipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Mol Reprod Dev.* Feb; 28(2), 158-168.

- López, M.L.; Bustos Obregón, E. (1995). Spermatophagy in the stallion epididymis: a scanning and transmission electron microscopy study. *Acta Anat.* 153, 181-188.
- López, M.L. (1996). Contribuição ao estudo do processo de maturação espermática em eqüinos (*Equus caballus*). Tese de Doutorado. UFRJ. Brasil.
- Malmezat, D.; Breuille, P.; Capitan, P.; Miranda, P.; Obled, C. (2000). Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutr.* 130: 1239-1246.
- Manjunath, P.; Therien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53(1-2):109-19.
- Métayer, S.; Dacheux, F.; Guerin, Y.; Dacheux, J.L.; Gatti, J.L. (2001). Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of germinal angiotensin I-converting enzyme. *Biol. Reprod.* 65, 1332-1339.
- Métayer, S.; Dacheux, F.; Dacheux, J.L.; Gatti, J.L. (2002b). Germinal angiotensin I-converting enzyme is totally shed from the rodent sperm membrane during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 67, 1763-1767.
- Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M., O'Brien, D.A. (2004). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *PNAS.* 101: 16501-16506.
- Müller, P.; Erlemann, K.R.; Muller, K.; Calvete, J.J.; Topfer-Petersen, E.; Marienfeld, K.; Herrmann, A. (1998). Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur. Biophys. J.* 27(1):33-41.

- Nagdas, S.K.; Winfrey, V.P.; Olson, G.E. (2006). Identification of a Hamster Sperm 26-Kilodalton Dehydrogenase/Reductase That Is Exclusively Localized to the Mitochondria of the Flagellum. *Biol. Reprod.*
- Nishimura, H.; Cho, C.; Branciforte, D.R.; Myles, D.G.; Primakoff, P. (2001). Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev. Biol.* 233, 204-213.
- O'Bryan, M.K.; Murphy, B.F.; Liu, D.Y.; Clarke, G.N.; Baker, H.W. (1994). The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Hum. Reprod.* 9, 1490-1496.
- O'Farrel, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ohtani, H.; Wakui, H.; Ishino, T.; Komatsuda, A.; Miura, A.B. (1993). An isoform of protein disulfide isomerase is expressed in the developing acrosome of spermatids during rat spermiogenesis and is transported into the nucleus of mature spermatids and epididymal spermatozoa.
- Okamura, N.; Dacheux, F.; Venien, A.; Onoe, S.; Huet, J.C.; Dacheux, J.L. (1992). Localization of a maturation-dependent epididymal sperm surface antigen recognized by a monoclonal antibody raised against a 135-kilodalton protein in porcine epididymal fluid. *Biol. Reprod.* 47: 1040-1052.
- Okamura, N.; Tamba, M.; Liao, H.J.; Onoe, S.; Sugita, Y.; Dacheux, F.; Dacheux, J.L. (1995). Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from porcine corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific alpha-mannosidase. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 141-148.

Oko, R. (1988). Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 39, 169-182.

Panyim, S.; Chalkley, R. (1969). High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Bioch. and Bioph.* 130: 337-346.

Potts, R.J.; Notarianni, L.J.; Jefferies, T.M. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res.* 447: 249-256.

Raijmakers, M.T.; Roelofs, H.M.; Steegers, E.A.; Steegers-Theunissen R, R.P.; Mulder, T.P.; Knapen, M.F.; Wong, W.Y.; Peters, W.H. (2003). Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa.

Reinert, M.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Topfer-Petersen, E. (1997). Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia.* 29(4):179-86.

Reinert, M.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Mann, K.; Töpfer-Petersen, E. (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur. J. Biochem.* 242: 636-640.

Reisner, A.H. (1984). Gel protein stains: a rapid procedure. *Methods Enzymol.* 104: 439-441.

- Retamal, C.; Babul, J. (1988). Determination of the molecular weight of proteins by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient of crosslinked polyacrylamide in the absence of denaturing agents. *Anal. Biochem.* 175: 544-547.
- Retamal, C. (1999). Caracterização e purificação de proteínas epididimárias de eqüino (*Equus caballus*) tese (Doutorado em Biociências) Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, R.J. Brasil.
- Retamal, C.A.; Thiebault, P.; Alves, E.W. (1999). Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Biochem.* 268: 15-20.
- Retamal, C.; Urzua, J.; Lorca, C.; Lopez, M.L.; Alves, E.W. (2000a). Changes in the plasma membrane proteins of stallion spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* Apr; 32(2), 229-239.
- Retamal, C.; Urzua, J.; Alves, E.W.; Lopez, M.L. (2000b) Cytochemical and electrophoretic study of stallion epididymal glycoproteins. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32(1), 117-130
- Robaire, B.; Hermo, L. (1988). The physiology of Reproduction. In Knobil, & J.D. Neil (eds). New York, Raven Press, vol.1.
- Robaire, B.; Viger, R.S. (1995) Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.* 52, 226-236.
- Roberts, K.P.; Ensrud, K.M.; Hamilton, D.W. (2002). A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biol. Reprod.* 67: 525-533.

- Robitaille, G.; Sullivan, R.; Bleau, G. (1991). Identification of epididymal proteins associated with hamster sperm. *J. Exp. Zool.* 258: 69-74.
- Romero, A.; Romao, M.J.; Varela, P.F.; Kolln, I.; Dias, J.M.; Carvalho, A.L.; Sanz, L.; Topfer-Petersen, E.; Calvete, J.J. (1997). The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.* 4(10):783-8.
- Saalmann, A.; Munz, S.; Ellerbrock, K.; Ivell, R.; Kirchhoff, C. (2001). Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Mol. Reprod. Dev.* 58(1):88-100.
- Saez, F.; Frenette, G.; Sullivan, R. (2003). Epididymosomes and prostasomes: their roles in post-testicular maturation of the sperm cells. *J. Androl.* 24: 149-154.
- Sampson, M.J.; Decker, W.K.; Beaudet, A.L. Ruitenbeek, W.; Armstrong, D.; Hicks, M.J.; Craigen, W.J. (2001). Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem.* 276: 39206-39212.
- Schambony, A.; Hess, O.; Gentzel, M.; Topfer-Petersen, E. (1998b). Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53:67-72.
- Schwaller, M.; Wilkinson, B.; Gilbert, H.F. (2003). Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* 278: 7154-7159.
- Seligman, J.; Zipser, Y.; Kosower, N.S. (2004). Tyrosine phosphorylation, thiol status, and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 71(3):1009-15.

- Shalgi, R.; Seligman, J.; Kosower, N.S. (1989). Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol. Reprod.* 40, 1037-1045.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68(5):850-858.
- Sullivan, R.; Bleau, G. (1985). Interaction between isolated components from mammalian sperm protein. *Gamete Res.* 12, 101-116.
- Sullivan, R.; Robitaille, G. (1989). The heterogeneity of epididymal spermatozoa in the hamster. *Gamete Res.* 24, 229-236.
- Sullivan, R.; Saez, F.; Girouard, J.; Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 1-10.
- Suzuki-Toyota, F.; Ito, C.; Toyama, Y.; Maekawa, M.; Yao, R.; Noda, T.; Toshimori, K. (2004). The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice. *Arch. Histol. Cytol.* 67(4):361-71.
- Sylvester, S.R.; Morales, C.; Oko, R.; Griswold, M.D. (1991). Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol. Reprod.* 45, 195-207.
- Tash, J.S. (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil. Cytoskel.* 14: 332-339.
- Tash, J.S.; Bracho, G.E. (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *J. Androl.* 15: 505-509.

- Tanaka, K. (1998). Proteasomes-structure and biology. *J. Biochem.* 123, 195-204.
- Tipler, C.P.; Hutchon, S.P.; Hendil, K.; Tanaka, K.; Fishel, S.; Mayer, R.J. (1997). Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 1053-1060.
- Töpfer-Petersen, E.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Kirchhoff, C.; Leeb, T.; Sieme, H. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 159-170.
- Töpfer-Petersen, E. (1999a). Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum. Reprod. Update.* 5(4): 314-29. Review.
- Töpfer-Petersen, E. (1999b). Molecules on the sperm's route to fertilization. *J. Exp. Zool.* 285(3): 259-66. Review.
- Töpfer-Petersen, E.; Romero, A.; Varela, P.F.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Dostalova, Z.; Sanz, L.; Calvete, J.J. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30(4-5): 217-24. Review.
- Tulsiani, D.R. (2003). Glycan modifying enzymes in the luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microsc. Res. Tech.* 61: 18-27.
- Voglmayr, J.K.; Sawyer Jr., R.F.; Dacheux, J.L. (1985). Glycoproteins: a variable factor in surface transformation of ram spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 33: 165-176.
- Weissenberg, R.; Yossefi, S.; Oschry, Y.; Madgar, I.; Lewin, L.M. (1994). Investigations of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *Int. J. Androl.* 17: 256-261.

Welch, J.E.; Brown, P.L.; O'Brien, D.A.; Magyar, P.L.; Bunch, D.O.; Mori, C.; Eddy, E.M. (2000). Human glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. *J. Andol.* 21: 328-336.

Yanagimachi, R. (1994). *Mammalian Fertilization. Em: The Physiology of Reproduction. Second Edition.* Raven Press, Ltd. N.Y. 189-317.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)