



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA INTEGRADO DE DOUTORADO EM ZOOTECNIA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL E SECREÇÕES DO EPIDÍDIMO EM  
RUMINANTES: POTENCIAIS ASSOCIAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO SEXUAL,  
PARÂMETROS SEMINAIS E FUNÇÃO ESPERMÁTICA**

**CARLOS EDUARDO AZEVEDO SOUZA**

Médico Veterinário

**FORTALEZA – CE**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA INTEGRADO DE DOUTORADO EM ZOOTECNIA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL E SECREÇÕES DO EPIDÍDIMO EM  
RUMINANTES: POTENCIAIS ASSOCIAÇÕES COM O DESENVOLVIMENTO SEXUAL,  
PARÂMETROS SEMINAIS E FUNÇÃO ESPERMÁTICA**

**AUTOR: CARLOS EDUARDO AZEVEDO SOUZA**

**ORIENTADOR: PROF. ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE N. MOURA, PhD.**

Tese apresentada à  
Coordenação do Programa  
Integrado de Doutorado em  
Zootecnia, como requisito  
parcial para obtenção do título  
de Doutor em Zootecnia – Área  
de Concentração: Reprodução  
de Ruminantes.

FORTALEZA – CE

Março de 2007

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

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

---

CARLOS EDUARDO AZEVEDO SOUZA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe N. Moura  
ORIENTADOR

---

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo  
CONSELHEIRO (UECE/UFC)

---

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
CONSELHEIRO (UFC)

---

Dr. Diônes Oliveira Santos  
CONSELHEIRO (EMBRAPA-CNPC)

---

Dra. Ângela Maria Xavier Eloy  
CONSELHEIRA (EMBRAPA-CNPC)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. MATURAÇÃO EPIDIDIMAL .....	4
2.1.1. AQUISIÇÃO DA MOTILIDADE .....	6
2.1.2. ALTERAÇÕES NA SUPERFÍCIE ESPERMÁTICA QUE MODULAM A INTERAÇÃO ENTRE GAMETAS .....	10
2.1.3. PROTEÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES CONTRA OXIDAÇÃO .....	15
2.2. PROTEÍNAS ASSOCIADAS À FUNÇÃO ESPERMÁTICA .....	20
2.2.1. PROTEÍNAS LIGADORAS DE FOSFOLÍPÍDEOS (BSPs) .....	22
2.2.2. PROTEÍNAS LIGADORAS DE HEPARINA.....	25
2.2.3. PROSTAGLANDINA D SINTETASE .....	29
2.2.4. OSTEOPONTINA .....	32
2.2.5. FOSFOLIPASE A2 .....	35
3. ESTUDO 1: VARIAÇÕES NO PERFIL PROTÉICO DO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE OVINOS SANTA INÊS ..	37
3.1. INTRODUÇÃO.....	37
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.2.1. DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	39
3.2.2. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ANÁLISE DOS MAPAS PROTÉICOS .....	40
3.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
3.3. RESULTADOS.....	43
3.4. DISCUSSÃO.....	52
4. ESTUDO 2: PADRÃO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL BOVINO BSP A1/A2, BSP 30-kDa E OSTEOPONTINA A MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES EJACULADOS ANTES E APÓS INCUBAÇÃO COM FLUIDOS DO OVIDUTO .....	57
4.1. INTRODUÇÃO .....	57
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.2.1. DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	60

4.2.2.	COLETA DO FLUIDO DO OVIDUTO.....	60
4.2.3.	PREPARAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES E INCUBAÇÕES COM FLUIDO DE OVIDUTO .....	61
4.2.4.	IMUNOCITOQUÍMICA .....	64
4.2.5.	CAPTURA DAS IMAGENS UTILIZANDO MICROSCOPIA CONFOCAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
4.3.	RESULTADOS.....	67
4.4.	DISCUSSÃO.....	74
5.	ESTUDO 3: ANÁLISE PROTEÔMICA DO FLUIDO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOUROS HOLANDÊS ADULTOS.....	84
5.1.	INTRODUÇÃO.....	84
5.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	86
5.2.1.	DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	86
5.2.2.	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL .....	87
5.2.3.	DEPLEÇÃO DA ALBUMINA .....	88
5.2.4.	ANÁLISE COMPUTADORIZADA DAS IMAGENS .....	89
5.2.5.	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	90
5.2.5.1.	ESPECTROMETRIA DE MASSA (Q-ToF) – ANTES DA DEPLEÇÃO.....	90
5.2.5.2.	ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-ToF-ToF) – APÓS A DEPLEÇÃO.....	92
5.3.	RESULTADOS.....	94
5.4.	DISCUSSÃO.....	109
6.	CONCLUSÕES GERAIS .....	125
7.	REFERÊNCIAS.....	127

## 1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva, especialmente dos machos, é um fator essencial a ser considerado para viabilizar os sistemas de produção de ruminantes (MATOS et al., 1992). Inúmeros parâmetros têm sido utilizados em busca de indicadores confiáveis do potencial reprodutivo dos animais, incluindo medições da biometria testicular (OTT e MEMON, 1980; SMITH et al., 1989; YARNEY et al., 1990; SOUZA et al., 2001), avaliação de características de espermatozoides ejaculados, tais como motilidade e defeitos morfológicos (GODFREY et al., 1990; CORREIA et al., 1997) ou mesmo análise computadorizada do sêmen e testes avançados de função espermática, como a integridade acrossômica ou da cromatina (BUDWORTH et al., 1988; JANKAUSKAS et al., 2000ab). No entanto, apesar da avaliação destes parâmetros viabilizar a definição de critérios mínimos para a seleção e utilização de reprodutores, eles não apresentam relação significativa com a fertilidade dos animais (RODRIGUEZ-MARTINEZ e LARSSON, 1998; ZHANG et al., 1998; LARSON e MILLER, 2000). Isto se deve, pelo menos em parte, ao fato de a fertilização ser um processo complexo, envolvendo inúmeros fatores, de modo que estas análises não conseguem medir a habilidade dos espermatozoides de sofrer alterações funcionais críticas para o sucesso da fertilização (AMANN, 1989; AMANN e HAMMERSTEDT, 1993).

A busca por possíveis indicadores ganhou novo fôlego com achados recentes demonstrando uma relação entre proteínas presentes em fluidos do trato reprodutivo e a fertilidade de reprodutores (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994, 1996, 1998; PARENT

et al., 1999; SPROTT et al., 2000; BRAUNDMEIER e MILLER, 2001; MOURA et al., 2006ab, 2007a). Algumas dessas proteínas foram associadas a características tais como a motilidade (AMANN et al., 1987; DIAMANDIS et al., 1999), morfologia (DE KRETSEK e KERR, 1994) e capacidade de produção espermática (GILMONT et al., 1990; MÉTAYER et al., 2001), ou a habilidade de espermatozóides penetrarem oócitos *in vitro* (HENAULT et al., 1995; HENAULT e KILLIAN, 1996; MOURA et al., 2007b), mas os mecanismos precisos de ação da maioria destas proteínas são pouco conhecidos. O papel desempenhado por algumas proteínas, no entanto, vem sendo estudado em detalhes.

Sabe-se, por exemplo, que um grupo de proteínas secretadas pelas glândulas sexuais acessórias, conhecidas coletivamente como *Bovine Seminal Plasma Proteins* (BSPs), tem participação importante no processo de capacitação espermática (THÉRIEN et al., 1995, 1997, 2001; MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Outras parecem mediar as interações entre espermatozóide e oócito (GONÇALVES et al., 2006; HAO et al., 2006). No entanto, a quantidade de proteínas detectadas em secreções como o plasma seminal, fluido das glândulas sexuais acessórias ou da cauda do epidídimo associadas direta ou indiretamente a papéis específicos desempenhados no metabolismo dos gametas ou no processo de fertilização ainda é limitada (AMANN et al., 1993; DACHEUX et al., 2005, 2006). Em parte, isso se deve ao pouco conhecimento sobre as interações dessas proteínas entre si, e com os espermatozóides. Dessa forma, a descrição detalhada das variações na composição protéica dos fluidos do trato reprodutivo masculino, bem como das interações entre algumas dessas proteínas e os espermatozóides, poderia trazer valiosas informações sobre os mecanismos de ação dessas proteínas, e auxiliar na



compreensão dos fenômenos que envolvem as alterações sofridas pelos espermatozoides nas diversas etapas que antecedem a fertilização.

Nesse contexto, este trabalho se compõe de três estudos distintos, avaliando diferentes enfoques da composição das proteínas expressas nos fluidos reprodutivos de ruminantes. O primeiro estudo descreve as variações no perfil protéico do plasma seminal de ovinos Santa Inês nas fases de pré-puberdade e puberdade, buscando entender como essas modificações se relacionam com o desenvolvimento sexual dos animais. O segundo estudo se constitui de uma avaliação das proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo de touros Holandês maduros, utilizando uma abordagem proteômica. Por fim, a terceira parte busca mostrar detalhes da distribuição topográfica e intensidade de ligação das BSPs e da osteopontina à membrana de espermatozoides bovinos ejaculados e incubados com as secreções do oviduto, simulando *in vitro* a seqüência de fluidos a que os espermatozoides são expostos antes da fertilização. Estes estudos utilizaram touros selecionados quanto ao potencial reprodutivo, testados, e com fertilidade conhecida, utilizados para inseminação artificial de milhares de fêmeas, se constituindo num modelo único para o estudo dessas proteínas e suas potenciais associações com parâmetros reprodutivos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. MATURAÇÃO EPIDIDIMÁRIA

Ao serem liberados nos túbulos seminíferos ao final da espermatogênese em mamíferos, os espermatozoides ainda não estão aptos à fertilização (AMANN et al., 1993; SULLIVAN et al., 2005), esta capacidade é adquirida durante o trânsito pelo epidídimo (HORAN e BEDFORD, 1972; BLAQUIER et al., 1988; COOPER, 1990; YANAGIMACHI, 1994; GATTI et al., 2004). O trânsito epididimário dura aproximadamente 8 a 15 dias (AMANN, 1981) em ruminantes, e promove uma série de modificações nos espermatozoides que incluem, mas não estão restritas, a aquisição de motilidade (DACHEUX e PACQUIGNON, 1980; YEUNG et al., 1993), alterações morfológicas (JINDAL e PANDA, 1980; BONET et al., 1992; HOWES et al., 2001), modificações bioquímicas, como mudanças nos resíduos superficiais de carboidratos (VOGLMAYR et al., 1980; DACHEUX e VOGLMAYR, 1983; SKUDLAREK et al., 1993; ABASCAL et al., 1998), na composição lipídica da membrana (POULOS et al., 1973; WOLF e VOGLMAYR, 1984; ATREJA e ANAND, 1985), alterações nas proteínas membranares (AMANN et al., 1993; KOHN et al., 1998; GATTI et al., 2004; BAKER et al., 2005), aquisição de novas proteínas (DACHEUX e VOGLMAYR, 1983; HANCOCK et al., 1993; MIRANDA et al., 1995), ou mesmo alterações no DNA espermático (TULSIANI et al., 1994). Este conjunto de alterações é conhecido coletivamente como maturação espermática.

A maturação espermática ocorre como resultado de uma exposição seqüencial e sincronizada a diferentes componentes do fluido epididimário (VOGLMAYR et al., 1978), e não simplesmente uma reação aleatória a essas secreções. A maior parte dessas modificações sofridas pelos espermatozoides é induzida por proteínas presentes nesse fluido (COOPER, 1998; DACHEUX et al., 2003, 2005). Sendo que os espermatozoides têm capacidade de síntese protéica extremamente limitada, e que a maior parte das proteínas de origem testicular é reabsorvida nos segmentos iniciais do epidídimo (DJAKIEW et al., 1986; VEERAMACHANENI e AMANN, 1991; DACHEUX et al., 2005), é razoável imaginar que o epitélio epididimário é o responsável pela composição desse meio (FLICKINGER, 1983; SYNTIN et al., 1996; FOUCHÉCOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2005), em parte regulada por andrógenos (CASTELLÓN e HUIDOBRO, 1999; UMAR et al., 2003). Além disso, a composição protéica do fluido epididimal varia conforme a região do epidídimo (FOUCHÉCOURT et al., 2000; YUAN et al., 2006), sugerindo que diferentes regiões do órgão desempenham diferentes funções. Inúmeros estudos suportam esta hipótese, mostrando que as principais modificações sofridas pelos espermatozoides se dão nas regiões mais proximais, incluindo cabeça e corpo (COOPER, 1986; AMANN, 1987; AMANN et al., 1993), enquanto a cauda do epidídimo funcionaria principalmente para o armazenamento e proteção dos espermatozoides (HINTON et al., 1995, 1996). Os eventos envolvidos na maturação espermática podem ser agrupados funcionalmente na aquisição de motilidade, alterações na superfície espermática que levam a célula a interagir com o oócito e proteção dos espermatozoides durante seu armazenamento.

### 2.1.1. AQUISIÇÃO DA MOTILIDADE

Ao entrarem no epidídimo, provenientes dos testículos, os espermatozóides de mamíferos são completamente desprovidos de motilidade (BEDFORD, 1975; AMANN et al., 1974; CASCIERI et al., 1976). A motilidade progressiva dos espermatozóides é adquirida durante o trânsito epididimário, como parte da maturação espermática (ORGBIN-CRIST, 1967; AMANN et al., 1993). Os mecanismos precisos através do qual a motilidade se inicia ainda não foram completamente elucidados, mas acredita-se que envolvam alterações no pH intracitoplasmático, e nas concentrações intracelulares de AMPc (3'-5' monofosfato cíclico de adenosina) e cálcio (AMANN et al., 1982; TASH e MEANS, 1983), entre outros.

Desde os primeiros estudos sugerindo uma relação entre o AMPc e a motilidade espermática, realizados por GARBERS et al. (1973), seu mecanismo de ação tem sido alvo de uma série de estudos (TASH e MEANS, 1983). AMANN et al. (1982) observaram que a concentração de AMPc no citoplasma espermático aumentava significativa e progressivamente entre a cabeça e a cauda do epidídimo, mas não encontraram uma correlação significativa entre as concentrações de AMPc e a percentagem de espermatozóides móveis ( $r = 0,14$ ), levantando a hipótese de que a atuação do AMPc seja indireta, ou de que outros fatores seriam necessários para que as células espermáticas adquirissem motilidade. A única função conhecida intracelular do AMPc é induzir a fosforilação protéica, modulando a ação de proteína quinases (ROSEN et al., 1975). Sua concentração intracitoplasmática é regulada por um equilíbrio em sua síntese, pela

enzima adenilato-ciclase e sua degradação por fosfodiesterases (TASH e MANN, 1973; TASH, 1976). Nesse contexto, uma das abordagens para se tentar induzir a motilidade em espermatozoides imaturos, foi o uso de inibidores de fosfodiesterases e outras substâncias capazes de aumentar a quantidade intracelular de AMPc (JAISWAL e MAJUMDER, 1998). No entanto, apesar de estes compostos estimularem a motilidade progressiva em espermatozoides maduros, da cauda do epidídimo, este efeito não foi observado em espermatozoides imaturos, da cabeça do epidídimo (VIJAYARAGHAVAN et al., 1985; JAISWAL e MAJUMDER, 1998).

Mais um indício surgiu com trabalhos mostrando que a incubação de espermatozoides da cabeça do epidídimo em fluido da cauda estimula significativamente a motilidade espermática (CORNWALL et al., 1986). Este estímulo foi atribuído a presença de uma proteína denominada proteína da motilidade progressiva (FMP; *Forward Motility Protein*; ACOTT e HOSKINS, 1978; BRANDT et al., 1978; ACOTT et al., 1983). A incubação com a FMP, na presença ou ausência de inibidores de fosfodiesterases, tais como a teofilina, promove aumento na concentração intra-espermática de AMPc. No entanto, a teofilina sozinha é incapaz de induzir motilidade progressiva (JAISWAL e MAJUMDER, 1998), sugerindo que, além de elevar os níveis de AMPc, a FMP deve atuar em outros aspectos da maturação espermática.

Além disso, alguns estudos demonstraram que a adição de bicarbonato intensifica ainda mais o estímulo de motilidade induzido pela FMP (HOSKINS et al., 1983), e que, em sua presença, os níveis de teofilina e outros inibidores necessários para induzir a motilidade eram dramaticamente reduzidos (VIJAYARAGHAVAN et al., 1985). A

observação de que o pH intra-espermático aumenta ao longo do trânsito epididimal (VIJAYARAGHAVAN et al., 1985), e a observação de que o bicarbonato promove uma alcalinização celular (BORON et al., 1979) são sugestivas de que o bicarbonato estimularia a motilidade aumentando o pH espermático. De fato, uma alcalinização no pH intra-espermático, induzida pela incubação em meio básico, estimula a motilidade de espermatozoides imaturos (JAISWAL e MAJUMDER, 1998), mas não promove aumentos significativos na motilidade de células maduras, da cauda do epidídimo, que já apresentam pH mais alcalino (GATTI et al., 1993), sugerindo que a alcalinização celular é importante para o início da motilidade, mas não para sua manutenção em espermatozoides maduros. No entanto, JAISWAL e MAJUMDER (1998) mostraram que o efeito estimulatório do bicarbonato pode ser reproduzido sem mudanças de pH celular. Além disso, o bicarbonato possui a propriedade de estimular a produção de AMPc (OKAMURA et al., 1985; JAISWAL e MAJUMDER, 1998).

Menos claro é o papel do cálcio na motilidade espermática. Enquanto alguns estudos mostram que os espermatozoides de várias espécies são irresponsivos a este íon, ou mesmo demonstram efeitos inibitórios sobre a motilidade (YOUNG e NELSON, 1974; McGRADY et al., 1974), em outras, ele parece estimular a motilidade (McGRADY et al., 1974; TASH e MEANS, 1983). Espermatozoides bovinos imaturos obtidos da cabeça do epidídimo apresentam uma maior capacidade de acumular cálcio, em comparação com células da cauda (HOSKINS et al., 1983; VIJAYARAGHAVAN e HOSKINS, 1988; VIJAYARAGHAVAN et al., 1989), onde ele parece modular a conversão da motilidade espermática em motilidade progressiva (PETERSON e FREUND, 1976; SERRES e KANN,

1984) induzindo um aumento nos níveis intracelulares de AMPc (WADE et al., 2003). O mecanismo de absorção de cálcio pelos espermatozoides ainda não está totalmente esclarecido, mas parece envolver uma  $\beta$ -defensina epididimal, a qual promove a formação de canais de cálcio na membrana (ZHOU et al., 2004).

A ação estimulatória do AMPc sobre proteína quinases, promovendo a fosforilação protéica já é um mecanismo conhecido (ROSEN et al., 1975), e uma série de proteínas parece ser fosforilada durante a maturação epididimária (BRANDT e HOSKINS, 1980). No entanto, até há pouco tempo, nenhuma proteína regulada por fosforilação associada à motilidade espermática havia sido identificada. Recentemente, observou-se que a atividade de uma enzima epididimal, glicogênio sintetase quinase 3 (GSK-3) estava aumentada em espermatozoides da cabeça do epidídimo em comparação com células da cauda (VIJAYARAGHAVAN et al., 1986; SMITH et al., 1999) e que sua atividade parece ser regulada por fosforilação (HUGHES et al., 1993) no resíduo de tirosina 214, varia diretamente com a motilidade espermática em espermatozoides bovinos (VIJAYARAGHAVAN et al., 2000). Além disso, o nível de fosforilação em resíduos de serina parece acompanhar progressivamente a motilidade espermática, adquirida durante o trânsito entre a cabeça e a cauda do epidídimo (SOMANATH et al., 2004). No entanto, estes achados baseiam-se em correlações entre diferentes parâmetros, e uma relação de efeito e causa ainda não foi determinada.

Além disso, parece que o início da motilidade espermática parece ser acompanhado por uma redução nos níveis de zinco dentro da peça intermediária (CALVIN, 1981; HENKEL et al., 2003). Este íon é adicionado ao espermatozóide ainda no testículo

para estabilizar as proteínas que compõem o sistema motor espermático, protegendo-o contra a oxidação (BACCETTI et al., 1976).

Parece que a proposição de um modelo para descrever a aquisição da motilidade espermática no epidídimo deve incluir alterações no pH, e nas concentrações intra-espermáticas de cálcio, AMPc e bicarbonato, os quais atuam na regulação de um conjunto de quinases e fosfatases, alterando a fosforilação de componentes celulares. No entanto, uma vez que não foram detectadas relações diretas entre esses fatores e a motilidade espermática, é mais provável que estas substâncias tenham de atingir concentrações mínimas efetivas (AMANN et al., 1993). Além disso, os mecanismos envolvidos nesse processo parecem ser complexos, e envolver outros fatores, tais como o zinco e a FMP. A identidade da FMP ainda não é conhecida, o que limita a proposição de hipóteses sobre seu papel no processo.

### **2.1.2. ALTERAÇÕES NA SUPERFÍCIE ESPERMÁTICA QUE MODULAM A INTERAÇÃO ENTRE GAMETAS**

Uma das características mais marcantes adquiridas pelos espermatozoides durante a maturação espermática é a capacidade de ligação à zona pelúcida e fertilização (AMANN et al., 1993). Esta propriedade se desenvolve como produto de aquisição de novas proteínas do fluido epididimal (COOPER et al., 1998) ou modificação de proteínas já existentes (BAKER et al., 2005; DACHEUX et al., 2006), criando sítios de ligação para estruturas oocitárias ou expondo sítios já existentes (SULLIVAN et al., 2005). A zona



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

Apoiando esses achados, MORI et al. (1997) mostraram que a exposição de oócitos intactos a algumas glicosidases alterou a capacidade de interação com espermatozóides em ratos. Quando expostos à  $\beta$ -galactosidase, o número médio de espermatozóides ligados à zona pelúcida reduziu-se significativamente, mas nenhuma alteração no número de espermatozóides foi observada após a exposição à  $\alpha$ -galactosidase, sugerindo que resíduos de  $\beta$ -galactose possam afetar a capacidade de fertilização. Este mesmo grupo (MORI et al., 1989) mostrou ainda que o tratamento de oócitos com uma lectina que se liga a N-acetilglicosamina bloqueou a ligação com os espermatozóides. Da mesma forma, a exposição de espermatozóides a açúcares tais como a fucose, manose, galactose ou N-acetilglicosamina (MORI et al., 1989; OEHNINGER et al., 1990; MIRANDA et al., 1997), sugerindo que os espermatozóides possuem receptores de membrana para esses carboidratos (BARBIERI et al., 1994).

O epidídimo possui uma série de glicosidases que atuam na maturação epididimal (DACHEUX e VOGLMAYR, 1983). Por um lado, elas atuam modificando glicoproteínas presentes na membrana espermática (SRIVASTAVA e OLSON, 1991; SKUDLAREK et al., 1992, 1993), ativando-as ou inativando-as. Por outro lado, algumas dessas proteínas podem se ligar à membrana espermática, atuando como sítios de ligação de carboidratos. Sabendo-se que o fluido da cauda do epidídimo é rico em  $\beta$ -galactosidases (SKUDLAREK et al., 1993), e que a remoção de resíduos de  $\beta$ -galactose da zona pelúcida bloqueia a ligação

dos espermatozoides (MORI et al., 1997), é possível que esta enzima possa ligar-se aos espermatozoides durante a maturação epididimal, funcionando como lectina (CHENG et al., 1994; TULSIANI et al., 1995).

Da mesma forma, a  $\alpha$ -L-fucosidase presente no fluido epididimal liga-se à membrana espermática em ratos (HANCOCK et al., 1993; ABASCAL et al., 1998) e em humanos (ALHADEFF et al., 1999). Além disso, uma série de estudos em diversas espécies têm mostrado que a exposição de espermatozoides à fucose inibem a interação espermatozoide-oócito (HUANG et al., 1982; LUCAS et al., 1994; DE CEREZO et al., 1996), e o tratamento de oócitos com  $\alpha$ -fucosidase reduz o número de gametas ligados (BLITHE, 1993). A N-acetilglicosaminidase é outra enzima glicolítica que possui a propriedade de se ligar à membrana espermática no epidídimo (CHAPMAN e KILLIAN, 1984; MIRANDA et al., 1995). Achados mostrando que o tratamento de oócitos com N-acetilglicosaminidase reduz em mais de 60% o número de espermatozoides ligados à zona pelúcida apóiam a hipótese de que essa enzima se participa diretamente na interação entre gametas (MIRANDA et al., 1997). Ao que parece, algumas dessas enzimas, funcionando como lectinas, desempenham uma função importante no processo de fertilização, podendo, pelo menos em parte, explicar sua relação com os índices de fertilidade em bovinos (MOURA et al., 2006b).

Outra proteína epididimal envolvida na interação entre gametas é a osteopontina (LUEDTKE et al., 2002). Estudos recentes demonstraram que a intensidade do *spot* correspondente a esta proteína no plasma seminal e no fluido das glândulas sexuais acessórias está associada à fertilidade em bovinos (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al.,

1997; MOURA et al., 2005) e em eqüinos (BRANDON et al., 1999). A osteopontina pode ser encontrada na forma solúvel, ou associada à membrana celular (PATARCA et al., 1993) e parece estar envolvida em diversas atividades, incluindo adesão celular, remodelamento de membranas, alterações no cito-esqueleto e modulação imunológica (DENHARDT et al., 1995, 2001; MAZZALI et al., 2002; DENHARDT, 2004). É uma proteína ácida, rica em ácidos aspártico e glutâmico (SORENSEN e PETERSEN, 1994), isolada inicialmente de tecido ósseo bovino (FRANZEN e HEINEGARD, 1985). No trato reprodutivo masculino, essa proteína é expressa nas células epiteliais das ampolas e glândulas vesiculares, em espermátides alongadas nos testículos, além do epidídimo e espermatozóides epididimários (SIITERI et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que a OPN também se liga à membrana de espermatozóides bovinos ejaculados (ERIKSON e KILLIAN, 2004). Considerando que a osteopontina (OPN) é uma molécula que atua na adesão celular, acredita-se que ela pode estar envolvida diretamente na interação entre espermatozóide e oócito.

Estruturalmente, a OPN apresenta uma seqüência RGD conservada, a qual apresenta capacidade de ligação a integrinas (BUTLER, 1995). Dado que integrinas já foram detectadas na membrana espermática (FUSI et al., 1996; REDDY et al., 2003), é possível que elas constituam o sítio de ligação para a OPN nos espermatozóides. Uma hipótese aceita para a mediação da OPN na fertilização (MOURA, 2005), é o de que, durante a ejaculação, osteopontina proveniente do fluido das glândulas sexuais acessórias (RODRIGUEZ et al., 2000) se ligue à membrana espermática através de integrinas, e que o complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D'CRUZ,

1996). Além disso, o fluido do oviduto bovino é rico em osteopontina (GABLER et al., 2003) e é possível que moléculas de OPN presentes nesse fluido também se liguem à membrana espermática. Contudo, a osteopontina também se liga ao receptor CD44, através de um domínio distinto da seqüência RGD, também envolvido na interação intercelular (WEBER et al., 1996). Este receptor está presente tanto na membrana espermática (BAINS et al., 2002) quanto na oocitária (SCHOENFELDER e EINSPANIER, 2003), e também está envolvida na adesão celular (CICHY e PURÉ, 2003).

Trabalhos recentes com fertilização *in vitro* em bovinos trazem evidências que apóiam a hipótese da participação da OPN no processo de fertilização, e mostram efeitos benéficos dessa proteína sobre o desenvolvimento embrionário inicial. A incubação de oócitos bovinos em fluido do oviduto/folicular adicionado de anticorpos contra a isoforma de 36 kDa da OPN isolada do leite reduz significativamente a capacidade dos espermatozoides de se ligarem à zona pelúcida, em comparação com o meio sem os anticorpos (GONÇALVES et al., 2004). Além disso, a adição desta proteína (36 kDa) no meio de cultivo de embriões promove um aumento da taxa de clivagem observada no dia 4 e de formação de blastocistos nos dias 8 e 11 (GONÇALVES et al., 2003), e em embriões cujo gene da OPN foi inativado através de *knock-out*, seu desenvolvimento se mostrou bastante prejudicado (WEINTRAUB et al., 2004). É provável que, além de atuar no processo de interação de gametas durante a fertilização, a OPN desencadeie cascatas de sinalização intracelulares que favorecem o desenvolvimento embrionário, explicando, pelo menos em parte, sua associação com os índices de fertilidade dos reprodutores.

### **2.1.3. PROTEÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES CONTRA OXIDAÇÃO**

Outra função do epidídimo, além de promover a maturação espermática é a proteção dos espermatozóides maduros durante seu armazenamento na cauda epididimária, até a ejaculação (HINTON et al., 1996). Uma proteção inicial a estes espermatozóides é provida pela barreira hemato-epididimal, a qual é efetiva contra danos causados por macromoléculas e pelo sistema imunológico (POLLANEN e COOPER, 1994). Esta barreira é formada por uma série de junções intercelulares epiteliais, compostas, entre outras, por zonas de oclusão e de adesão (SUZUKI e NAGANO, 1978; HOFFER e HINTON, 1984; BYERS et al., 1992).

No entanto, outra fonte potencial de danos aos espermatozóides é o estresse oxidativo (HINTON et al., 1995), que se constitui numa série de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio (ROS; HALLIWELL, 1991), devido a um desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação por sistemas antioxidantes (SIKKA et al., 1995). As espécies reativas de oxigênio são produzidas, em parte, pelos espermatozóides, e desempenham inúmeras funções ligadas à fisiologia reprodutiva, incluindo a capacitação e hiper-ativação espermática e fusão entre gametas (DE LAMIRANDE et al., 1998; AITKEN et al., 2004). Contudo, se produzidos em excesso, as ROS podem causar uma série de danos ao trato reprodutivo e à função espermática, culminando em infertilidade (JONES e MANN, 1977; RAO et al., 1989; AGARWAL e SALEH, 2002; NICHI et al., 2006). Os espermatozóides, especialmente os maduros, são especialmente vulneráveis aos ataques por radicais livres, tais como o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido, devido ao

elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados na membrana (PARKS e HAMMERSTEDT, 1985; LENZI et al., 2000). Uma boa parte das ROS produzidas no lúmen epididimal se deve à retenção da gota citoplasmática proximal, concentrando uma série de enzimas, e também à intensa taxa de respiração celular, produto da elevada concentração espermática (GOMEZ et al., 1996; SAID et al., 2005).

Para combater a ação de ROS sobre os espermatozoides, o epidídimo dispõe de um arsenal de enzimas antioxidantes, presentes em diferentes quantidades, de acordo com a região do epidídimo, atuando sobre diferentes substratos (HINTON et al., 1996). Dentre elas, já foram identificadas glutathione S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e gama-glutamyl-transpeptidase (ALVAREZ e STOREY, 1983; JEULIN et al., 1989; FOUCHÉCOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2006). Um dos sistemas mais importantes de defesa contra danos oxidativos no epidídimo parece envolver o tripeptídeo glutathione (MEISTER e ANDERSON, 1983).

A glutathione é produzida e está presente no lúmen epididimal e nos espermatozoides (LI, 1975; AGARWAL e VANHA-PERTTULA, 1988; AGARWAL et al., 1989) na sua forma oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) e suas concentrações são mais elevadas no corpo e cauda do epidídimo (HINTON, 1990; HINTON et al., 1996). A glutathione é utilizada como substrato redutor por dois tipos principais de enzimas, a glutathione S-transferase e a glutathione peroxidase. As glutathione transferases promovem a conjugação da glutathione com uma série de compostos tóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (BECKETT e HAYES, 1993), tornando-as menos danosas e mais solúveis, o que facilita sua excreção (WILCE e PARKER, 1994). A atividade da glutathione S-transferase parece ser maior no

corpo do epidídimo (HALES et al., 1980; VERI et al., 1993). Outra enzima que utiliza a glutatona como substrato é a glutatona peroxidase (GSHPx). Esta enzima também está presente no epidídimo e espermatozóides em diversas espécies (LI, 1975; PERRY et al., 1992; DACHEUX et al., 2005). A GSHPx utiliza os hidrogênios de duas moléculas de GSH para conversão de peróxido de hidrogênio em água, produzindo uma molécula de glutatona oxidada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Esta enzima é abundante no fluido da cauda epididimária, e também pode se ligar à membrana dos espermatozóides (JIMENEZ et al., 1990). A glutatona reduzida deve ser regenerada a partir das moléculas de glutatona oxidada, para servir de substrato para a contínua inativação de moléculas nocivas. Esta regeneração é promovida principalmente pela glutatona redutase, que está presente em espermatozóides (LI, 1975; CORNWALL et al., 1988) e no epidídimo (KANEKO et al., 2002), mas também indiretamente, pela gama-glutamil-transpeptidase (HANIGAN e PITOT, 1985). Esta enzima é bastante ativa no epidídimo (AGARWAL et al., 1989; HINTON et al., 1991), apresentando atividade andrógeno-dependente (AGARWAL e VANHAPERTTULA, 1989).

Outras enzimas antioxidantes também estão presentes no epidídimo, tais como o sistema superóxido-dismutase/catalase, que é bastante ativo, principalmente na cauda do epidídimo. A superóxido-dismutase está presente em espermatozóides epididimais (HOLLAND e STOREY, 1981; ALVAREZ et al., 1987; BAUMBER e BALL, 2005), e é responsável pela dismutação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, protegendo os fosfolípidos da membrana contra a formação e ataque de peróxidos. No entanto, o peróxido de hidrogênio pode interagir com íons ferrosos ou

ânions superóxido (AGARWAL e PRABAKARAN, 2005), gerando radicais livres. Nesse caso, a catalase, ativa no sistema reprodutivo de algumas espécies atua na conversão do peróxido de hidrogênio em água (JEULIN et al., 1989; ZINI e SCHLEGEL, 1997; BALL et al., 2000). No entanto, dado que a expressão da catalase no epidídimo é relativamente baixa, comparada a outras enzimas (VERNET et al., 2004), parece que a degradação de peróxido de hidrogênio é exercida preferencialmente pela glutathiona peroxidase.

Considerando que íons de ferro também podem interagir com o peróxido de hidrogênio e outros íons promovendo a formação de peróxidos (AGARWAL e PRABAKARAN, 2005), o epidídimo também precisa se proteger contra o excesso de ferro livre. A lactoferrina é uma proteína que tem a propriedade de se ligar ao ferro, e está presente em diversos fluidos corporais incluindo leite, lágrima, fluido amniótico e plasma seminal (MASSON e HEREMANS, 1971; GACHON et al., 1982; NIEMELA et al., 1989; ARAÚJO, 2000), onde participa como agente antimicrobiano e na regulação da expressão gênica (FURMANSKI, 1995; NOZAKI et al., 2002; GATTI et al., 2004; DACHEUX et al., 2005), além de atuar no transporte e estocagem de ferro durante a lactação (SORRENTINO et al., 1999). A lactoferrina é um dos principais componentes do fluido epididimal (FOUCHÉCOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2006), chegando a compor mais de 40% do total de proteínas em algumas regiões. Esta proteína liga-se aos espermatozoides durante o trânsito epididimário (JIN et al., 1997) ou durante a ejaculação (THALER et al., 1990). Em ovinos, esta proteína apresenta um efeito benéfico, dose-dependente, sobre a motilidade espermática, percentagem de espermatozoides móveis e batimento flagelar *in vitro*, e sua adição a diluidores permite uma melhor conservação do sêmen (ARAÚJO, 2000). É



provável que estes efeitos estejam relacionados à sua capacidade de sequestrar ferro iônico, prevenindo a formação de peróxidos lipídicos, danosos à membrana espermática (WAKABAYASHI et al., 1999).

## 2.2. PROTEÍNAS ASSOCIADAS À FUNÇÃO ESPERMÁTICA

A busca por marcadores da fertilidade em machos, especialmente em ruminantes, tem motivado uma série de estudos, uma vez que a disponibilidade de reprodutores testados e com elevado potencial reprodutivo é crítica para a eficiência produtiva e reprodutiva. Parâmetros amplamente utilizados para a avaliação andrológica de reprodutores, como a determinação da motilidade e morfologia espermática e concentração de células no ejaculado são bastante úteis para o descarte de animais com problemas reprodutivos, mas de validade limitada para a estimação da fertilidade (GRAHAM et al., 1980; CORREA et al., 1997; RODRÍGUEZ-MARTINEZ e LARSSON, 1998; BRAHMKSHTRI et al., 1999). Mesmo quando se utiliza parâmetros objetivos para avaliação do sêmen, como a análise computadorizada da motilidade espermática e testes funcionais, como a integridade acrossômica e da cromatina, embora apresentem alguma relação com os resultados de não retorno das fêmeas, as associações são pouco significativas (BUDWORTH et al., 1982; KJAESTAD et al., 1993; JANKAUSKAS et al., 2000ab).

Possivelmente isso se deve pela capacidade limitada destes testes, em termos de avaliação das transformações funcionais sofridas pelos espermatozoides durante a maturação e capacitação espermática, necessárias para que eles apresentem capacidade de fertilizar oócitos (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993). Na indústria da inseminação artificial bovina, onde os reprodutores são selecionados com base em parâmetros produtivos e critérios de qualidade seminal, os animais apresentam sêmen de qualidade

elevada, e as diferenças entre indivíduos são muito pequenas. Ainda assim, é possível encontrar diferenças de até 25% na fertilidade entre diferentes touros, que não se refletem nas análises seminais de rotina (LARSON e MILLER, 2000). A observação de diferenças de fertilidade dessa magnitude tem estimulado a busca por marcadores moleculares no plasma seminal e em outros fluidos do trato reprodutivo (BRAUNDMEIER e MILLER, 2001; MOURA et al., 2007a), que auxiliem na seleção dos reprodutores mais férteis, complementando as análises já existentes.

O plasma seminal é composto por secreções de diversas partes do trato reprodutivo, incluindo testículos e epidídimos, e glândulas sexuais acessórias (YANAGIMACHI, 1994). A possibilidade de proteínas presentes no plasma seminal funcionarem como marcadores da fertilidade dos animais veio à tona, a partir dos achados mostrando que algumas delas estavam associadas significativamente às taxas de fertilização *in vitro* em bovinos (HENAULT et al., 1995; HENAULT e KILLIAN, 1996), e mesmo aos índices de não retorno ao estro associados a reprodutores bovinos (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994, 1996; PARENT et al., 1999; SPROTT et al., 2000) e eqüinos (BRANDON et al., 1999). Apesar da importância desses achados, apenas algumas poucas dessas proteínas foram identificadas, incluindo a osteopontina (CANCEL et al., 1997), prostaglandina D sintetase (GERENA et al., 1998) e proteínas ligadoras de heparina, como o inibidor tissular de metaloproteinases 2 (TIMP-2; McCAULEY et al., 2001). Um conhecimento mais detalhado dessas proteínas poderia contribuir para melhorar a compreensão dos fenômenos fisiológicos ligados à função espermática e fertilidade, bem

como viabilizar o uso destas proteínas como marcadores moleculares ou aditivos no processo de industrialização do sêmen.

### **2.2.1. PROTEÍNAS LIGADORAS DE FOSFOLIPÍDEOS (BSPs)**

Ao serem ejaculados, os espermatozóides ainda não estão plenamente aptos para fertilizarem os oócitos (CHANG, 1951), adquirindo esta habilidade durante um período denominado de capacitação (AUSTIN, 1952). A capacitação espermática é um processo complexo, que envolve várias etapas (YANAGIMACHI, 1994), incluindo alterações estruturais na membrana plasmática, com alterações na composição lipídica (YANAGIMACHI, 1994; CROSS, 1998) e na sua permeabilidade, que levam a mudanças no ambiente intracitoplasmático, incluindo aumento no conteúdo de cálcio, no pH intracelular e na fosforilação da tirosina (HANDROW et al., 1989; PARRISH et al., 1994; DE LAMIRANDE et al., 1997; VISCONTI e KOPF, 1998, CROSS, 1998). Estes eventos levam à etapa final da capacitação, conhecida como hiper-ativação espermática (SUAREZ, 1996). A capacitação se inicia no momento da ejaculação, mas completa-se apenas no trato reprodutivo feminino, onde fatores capacitantes, como a lipoproteína de alta densidade (HDL) e galactosaminoglicanos (GAGs), como a heparina, presentes no fluido folicular e do oviduto interagem com os gametas masculinos (HANDROW et al., 1982; LENZ et al., 1982; PARRISH et al., 1989; EHRENWALD et al., 1990; MARTINEZ e MORROS, 1996).

A perda seletiva de colesterol e alguns fosfolipídeos, resultando em uma redução na proporção colesterol:fosfolipídeos é uma das principais etapas da capacitação (EHRENWALD et al., 1988; THÉRIEN et al., 1998). O plasma seminal de inúmeras espécies

contém proteínas ligadoras de fosfolipídeos, coletivamente denominadas de BSPs (*Bovine Seminal Proteins*, uma vez que foram isoladas em bovinos) que são secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas, e atuam na capacitação espermática (MANJUNATH et al., 1988; DESNOYERS et al., 1994; SALOIS et al., 1999; VILLEMURE et al., 2003; BOISVERT et al., 2004; BERGERON et al., 2005; LUSIGNAN et al., 2007).

Estas proteínas compõem a maior parte do fluido das glândulas sexuais acessórias e do plasma seminal (MANJUNATH et al., 1987; NAUC e MANJUNATH, 2000; MOURA et al., 2006b) e, em bovinos, elas são denominadas BSP A1/A2, BSP A3 e BSP 30-kDa (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Estas proteínas são estruturalmente relacionadas, compostas de peptídeos de cadeia única, acídicas, com massas moleculares variando de 15-16 kDa (BSP A1/A2 e A3) a 28-30 kDa (BSP 30-kDa), apresentando dois domínios do tipo II, semelhantes aos da fibronectina (ESCH et al., 1983; CALVETE et al., 1996), os quais lhes conferem a capacidade de se ligarem a fosfolipídeos (MOREAU et al., 1998) e à heparina (CHANDONNET et al., 1990).

Uma série de estudos têm mostrado que as BSPs ligam-se aos espermatozóides no momento da ejaculação, interagindo com fosfolipídeos contendo colina, abundantes em sua membrana plasmática (DESNOYERS e MANJUNATH, 1992; MANJUNATH et al., 1993; MOREAU et al., 1998), promovendo a remoção de fosfolipídeos (THÉRIEN et al., 1999; TANNERT et al., 2006) e colesterol (THÉRIEN et al., 1998; MOREAU et al., 1999; MOREAU e MANJUNATH, 2000), o que resulta numa redução considerável na proporção entre colesterol:fosfolipídeos, um dos passos iniciais da capacitação espermática. Além disso, essas proteínas permanecem ligadas à membrana espermática durante seu trajeto no

trato reprodutivo feminino. Posteriormente, ao atingirem o oviduto, essas proteínas auxiliam na interação entre os espermatozóides e o epitélio do oviduto (GWATHMEY et al., 2003, 2006), bem como foram sítios de ligação para a heparina e HDL na membrana espermática (THÉRIEN et al., 1995, 1997), os quais, de forma independente (LANE et al., 1999), completariam o processo de capacitação espermática.

A ligação das BSPs à membrana espermática aumenta o número de sítios de ligação para a heparina e outros galactosaminoglicanos (THÉRIEN et al., 2005) os quais passam a reagir com os espermatozóides (MILLER et al., 1990). Concomitantemente, os espermatozóides também interagem com a lipoproteína de alta densidade (HDL), estimulando uma segunda remoção de colesterol, reduzindo ainda mais a relação colesterol:fosfolipídeos, o que desestabiliza a membrana espermática e inicia vias de transdução de sinais que regulam a expressão de receptores para glicoproteínas da zona pelúcida, entre outros, tornando os espermatozóides aptos a sofrer a reação acrossômica (BENOFF et al., 1993; THÉRIEN et al., 1998). Os processos mediados pelas BSPs que resultam na capacitação espermática sugerem que diferenças detectadas em suas concentrações nos fluidos reprodutivos podem influenciar a fertilidade. Embora correlações significativas entre a concentração de BSPs no plasma seminal e a fertilidade ainda não tenha sido estabelecida (NAUC e MANJUNATH, 2000), achados recentes demonstram que a concentração destas proteínas (BSP A1/A2, BSP A3 e BSP 30-kDa) no fluido das glândulas acessórias de touros de alta fertilidade estão relacionadas a uma maior capacidade de penetração de oócitos homólogos por espermatozóides epididimais de touros de baixa fertilidade (MOURA et al., 2007a), e também a resultados de fertilidade

*in vivo*, medida pela taxa de não retorno ao estro, após inseminação artificial das fêmeas com sêmen congelado (MOURA et al., 2006a). Estes resultados sugerem que estas proteínas são candidatos em potencial a funcionarem como marcadores para a fertilidade em bovinos.

### **2.2.2. PROTEÍNAS LIGADORAS DE HEPARINA**

A heparina é um açúcar pertencente ao grupo dos galactosaminoglicanos (GAG), abundante no trato reprodutivo feminino (LEE et al., 1985), sendo um dos indutores da capacitação espermática em bovinos (HANDROW et al., 1982; MILLER e HUNTER, 1986; THÉRIEN et al., 1995), interagindo com os espermatozóides por meio de proteínas ligadas à membrana plasmática (CHANDONNET et al., 1990; NASS et al., 1990; THÉRIEN et al., 1995).

Uma série de proteínas com capacidade de se ligar à heparina (HBP) são secretadas no trato reprodutivo masculino, principalmente pelas glândulas vesiculares, mas também pela próstata e glândulas bulbo-uretrais (MILLER et al., 1990), mas não no epidídimo (McCAULEY et al., 1996), e cuja expressão é regulada por andrógenos (NASS et al., 1990).

Utilizando ensaios de ligação a heparina marcada radioativamente, MARKS e AX (1985) observaram que espermatozóides oriundos de touros de alta fertilidade possuem maior afinidade por esse açúcar que aqueles oriundos de touros de baixa fertilidade,

apesar de os dois grupos apresentarem quantidades equivalentes de sítios de ligação para heparina na membrana espermática. Estes resultados sugerem que a afinidade, e não a quantidade de sítios de ligação para a heparina na membrana estaria relacionada ao potencial reprodutivo dos espermatozóides. De fato, cinco famílias de HBP foram identificadas no trato reprodutivo de bovinos (MILLER et al., 1990) com diferentes afinidades pela heparina. Dentre elas, o complexo HBP-B5, formado por múltiplas proteínas com massas moleculares de 14-18, 24 e 31 kDa (MILLER et al., 1990) é o que apresenta maior afinidade por esse açúcar (BELLIN et al., 1994).

Buscando compreender melhor se esse complexo protéico de fato poderia servir para estimar a fertilidade dos machos, um experimento foi conduzido, utilizando touros andrológicamente equivalentes, tanto em termos de desenvolvimento testicular quanto de qualidade seminal. Os animais foram mantidos com as fêmeas por um período de 2 meses, e as taxas de prenhez foram determinadas 60 dias após o final da estação de cobertura. Os resultados mostraram que touros que apresentavam o complexo HBP-B5 ligado à membrana espermática, mas não detectável no plasma seminal apresentaram fertilidade 17% maior que aqueles com outros perfis (BELLIN et al., 1994). Uma hipótese é que os espermatozóides desses animais apresentem maior capacidade de se ligar ao complexo HBP-B5 presente no plasma seminal, conferindo a essas células melhor habilidade de capacitação. De fato, quando reprodutores de capacidade andrológica e seminal semelhante são agrupados com base no conteúdo de HBP na membrana espermática, pode-se detectar diferenças de até 40% nas taxas de prenhez (BELLIN et al., 1996).



Um dos componentes desse complexo HBP-B5, com massa molecular de 31 kDa e secretado pelas glândulas vesiculares e próstata foi denominado antígeno associado à fertilidade (*Fertility-Associated Antigen* – FAA; BELLIN et al., 1998; McCAULEY et al., 1999). Um estudo utilizando touros de diferentes raças, com idêntica capacidade de serviço expostos a novilhas em estro mostraram que, independentemente da raça ou idade, touros com uma quantidade detectável de FAA ligado à membrana espermática apresentaram fertilidade 9% maior que aqueles cuja ligação do FAA com a membrana plasmática não pôde ser verificada (BELLIN et al., 1998). Além disso, fêmeas inseminadas com sêmen contendo FAA ligado aos espermatozóides apresentaram fertilidade 16% maior ao primeiro serviço que aquelas inseminadas com espermatozóides FAA negativos (SPROTT et al., 2000). Adicionalmente, a adição de FAA recombinante a amostras de sêmen processadas rotineiramente para inseminação artificial melhorou significativamente a percentagem de acrossomos intactos (87% vs. 68,7%) e a fertilidade, expressa pelas taxas de não retorno ao estro medidas 60 dias após a inseminação (39% vs. 32%; AX et al., dados não publicados). Estes benefícios foram mais aparentes em touros sub-férteis, do que naqueles animais de fertilidade normal. Dado que espermatozóides de animais sub-férteis não apresentam quantidades detectáveis de FAA na membrana plasmática, é possível que o FAA recombinante adicionado às amostras estabilize a membrana plasmática e acrossômica dos espermatozóides, e aumente o número de sítios de ligação de heparina, afetando positivamente a capacitação espermática, explicando seus efeitos benéficos sobre a fertilidade dos animais.

Outro componente do complexo HBP-B5 também tem sido relacionado à fertilidade dos animais. A mobilidade eletroforética do HBP-24 (24 kDa) e a homologia da seqüência de aminoácidos permitiu a identificação deste proteína como sendo o inibidor tecidual das metaloproteinases 2 (TIMP-2; CALVETE et al., 1996; McCAULEY et al., 2001). Assim como o FAA, touros mais férteis puderam ser discriminados entre os demais se baseando na presença da HBP-24 ligada aos espermatozoides (BELLIN et al., 1996, 1998). O TIMP-2 é sintetizado no testículo e está presente no fluido epididimal em ovinos (MÉTAYER et al., 2002) e nas glândulas sexuais acessórias em bovinos (MOURA et al., 2007a), e atua modulando a função de enzimas como a *matrix metalloproteinase 2* (MMP2). A MMP2 é sintetizada pelas células de Sertoli (ROBINSON et al., 2001) e atua no remodelamento da matriz extracelular durante a espermatogênese. Metaloproteinases fazem parte do conteúdo acrossômico, e atuam facilitando a fusão entre os gametas (DÍAZ-PEREZ e MEIZEL, 1992; CORREA et al., 2000). Dado que o TIMP-2 se liga à membrana espermática (McCAULEY et al., 2001), é possível que sua relação com os índices de fertilidade se devam à sua atuação modulando a ação dessas metaloproteinases durante a fertilização.

Proteínas com afinidade pela heparina (HAP) também estão presente em grande quantidade no plasma seminal caprino (LA FALCI et al., 2002). Estes autores observaram que uma HAP de 178 kDa estava presente no plasma seminal apenas durante a estação sexual, enquanto outra, de 119 kDa era muito mais abundante durante a estação não sexual. A incubação de espermatozoides ejaculados na presença da HAP de 119 kDa causou perda total de motilidade dentro de 5 minutos, com importantes danos ao

acrossomo. O mecanismo preciso através do qual essa proteína inibe a motilidade espermática ainda não foi determinado, mas o seu conhecimento permitiria melhorar a compreensão sobre como o plasma seminal modula a função espermática.

### 2.2.3. PROSTAGLANDINA D SINTETASE

Uma das proteínas associadas à fertilidade identificadas inicialmente por KILLIAN et al. (1993) foi posteriormente identificada por *western blotting* e sequenciamento N-terminal como sendo a prostaglandina D sintetase (GERENA et al., 1998). A prostaglandina D sintetase (PGDS) atua enzimaticamente catalisando a isomerização de prostaglandina H<sub>2</sub> em prostaglandina D<sub>2</sub> (URADE et al., 1985), e existe em duas formas distintas, uma dependente e outra independente da glutatona (URADE et al., 1987; URADE e HAYAISHI, 2000a). A isoforma identificada no plasma seminal bovino apresenta uma massa molecular de 26 kDa (KILLIAN et al., 1993) e pertence ao grupo GSH-independente, que, além de atuar enzimaticamente, é membro de uma família de proteínas transportadoras de substâncias hidrofóbicas conhecidas como lipocalinas (PERVAIZ e BREW, 1987).

Alguns autores têm sugerido que a PGDS GSH-independente apresentaria múltipla atividade, mediando a conversão de prostaglandina D<sub>2</sub> no meio intracelular, e funcionando como lipocalina quando presente no meio extracelular e fluidos corporais (TANAKA et al., 1997; URADE e HAYAISHI, 2000b). No testículo, a PGDS está presente nas células de Sertoli e Leydig e nas células germinativas em bovinos (RODRÍGUEZ et al.,

2000a). Contudo, sua expressão só foi detectada em túbulos seminíferos contendo espermátides alongadas, nos estágios finais da espermatogênese (RODRÍGUEZ et al., 2000a; GERENA et al., 2000). Utilizando técnicas de *northern blotting* e hibridização *in situ*, a expressão de PGDS foi observada em células epiteliais da cabeça, corpo e cauda do epidídimo bovino (RODRÍGUEZ et al., 2000a), sendo mais abundante nas células principais da cabeça (GERENA et al., 2000). Em roedores, sua expressão no testículo aumenta com a maturidade sexual, em torno de 40 vezes, e parece acompanhar o aparecimento dos primeiros espermatozóides (SAMMY et al., 2000). Já em ovinos, a PGDS já é expressa no testículo e epidídimo durante o desenvolvimento fetal (FOUCHÉCOURT et al., 2003). No entanto, a proteína só é detectada no epidídimo durante a puberdade (por volta de 5 meses), em diferentes isoformas com massa molecular de 30 kDa e pIs variando de 4,2 a 5,5 e convertendo-se em isoformas de 27 kDa e pIs 4,5 a 6,5 à medida que o animal amadurece (FOUCHÉCOURT et al., 2003). Esta proteína é um dos principais componentes do fluido epididimal de ovinos e eqüinos (FOUCHÉCOURT et al., 1999, 2000) e sua expressão é regulada por andrógenos (FOUCHÉCOURT et al., 1999). Dado que, em ovinos, a PGDS não está envolvida na síntese de prostaglandinas (FOUCHÉCOURT et al., 2002), sua relação com a fertilidade dos animais parece estar relacionada à sua capacidade de transportar substâncias hidrofóbicas, incluindo testosterona e retinóides entre os diversos compartimentos do trato reprodutivo (SAMMY et al., 2000; FOUCHÉCOURT et al., 2002). Apesar de ser mais abundante em touros de alta fertilidade (KILLIAN et al., 1993; FOUCHÉCOURT et al., 2002), a PGDS está presente em quantidades variáveis em animais com diversos níveis de fertilidade (FOUCHÉCOURT et al., 2002), o que sugere que esta

proteína seja benéfica, mas não crucial para a fertilidade. Além disso, achados recentes mostraram que diferentes isoformas de PGDS presentes no fluido da cauda do epidídimo, com massa molecular entre 24 e 27 kDa e pIs indo de 5,8 a 6,3 foram detectadas de forma mais intensa em touros de baixa fertilidade, em comparação com touros mais férteis (MOURA et al., 2006b). Nos espermatozoides, a PGDS se liga à região apical do acrossomo, e deixa de ser detectada após a reação acrossômica (GERENA et al., 2000). Embora se acredite que sua relação com a fertilidade está relacionada a seu papel de lipocalina, o exato mecanismo de ação desta proteína ainda não foi elucidado. Ainda que sua relação com a fertilidade pareça ambígua em bovinos, é importante notar que apenas uma isoforma da proteína está presente no plasma seminal, associada positivamente com a fertilidade, e diferindo das isoformas presentes na cauda do epidídimo, relacionada negativamente. É provável que durante a ejaculação as formas epididimais sejam modificadas de alguma forma, alterando-as funcionalmente.

#### 2.2.4. OSTEOPONTINA

A osteopontina, uma das proteínas associadas à fertilidade presentes no plasma seminal de touros (KILLIAN et al., 1993) foi inicialmente isolada da matriz óssea bovina (FRANZEN e HEINEGARD, 1985) e está presente em diversos tecidos e fluidos biológicos em diferentes isoformas (SENGER et al., 1989; CANCEL et al., 1997). Nos fluidos do trato reprodutivo bovino foram encontradas isoformas de osteopontina variando de 14 a 70 kDa (CANCEL et al., 1997, 1999; ERIKSON et al., 2003), possivelmente resultado de modificações pós-traducionais, tais como clivagem, glicosilação e fosforilação (PATARCA et al., 1993; SORENSEN et al., 1995; MOURA, 2005). A osteopontina detectada no plasma seminal bovino é acídica, com massa molecular de 55 kDa e sua intensidade em géis bidimensionais é cerca de 2,6 vezes maior em touros de alta fertilidade, em comparação com reprodutores de fertilidade abaixo da média (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997). BRANDON et al. (1999) também relatam que a osteopontina também está relacionada à fertilidade em garanhões. Em ovinos, a OPN foi detectada no plasma seminal de animais jovens utilizando *western blots*, com duas isoformas de 14 e 50 kDa, mas não se sabe se ela está associada a parâmetros seminais ou fertilidade nesta espécie (SOUZA et al., 2004). Achados recentes sugerem que a osteopontina presente no plasma seminal bovino seja oriunda do fluido das glândulas sexuais acessórias (CANCEL et al., 1999), sendo que sua intensidade em mapas protéicos do fluido das glândulas acessórias também está associada à fertilidade dos touros (MOURA et al., 2005).

A osteopontina (OPN) é expressa nos testículos, principalmente em túbulos contendo espermátides alongadas (SIITERI et al., 1995; RODRÍGUEZ et al., 2000b; LUEDTKE et al., 2002), sugerindo que, tal como a PGDS, sua expressão seja regulada pelo ciclo das células germinativas. A OPN também é expressa no epidídimo, e a proteína detectada tanto no fluido quanto ligada aos espermatozóides (SIITERI et al., 1995; CANCEL et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2000b). Em suínos, polimorfismos no gene da OPN também foram associados positivamente à motilidade espermática e número de crias nascidas vivas (LIN et al., 2006).

Sendo a OPN uma molécula de adesão, é possível que sua associação com a fertilidade se deva à capacidade de mediar a ligação dos espermatozóides aos oócitos. Estruturalmente a OPN apresenta uma seqüência RGD conservada, a qual tradicionalmente está associada à interação com integrinas (BUTLER, 1995). Em humanos, a clivagem da OPN aumenta sua afinidade pelas integrinas, o que melhora sua capacidade de mediar a adesão celular (HELLUIN et al., 2000; DENHARDT et al., 2001). Além das integrinas, a osteopontina também interage com o receptor CD44, mediando a adesão celular de forma independente do domínio RGD (WEBER et al., 1996). Resultados de sequenciamento mostram que a OPN humana também apresenta sítios de ligação para heparina (DENHARDT et al., 2001), o que sugere que ela poderia atuar na capacitação espermática, mas ainda faltam resultados experimentais para confirmar esta hipótese.

Inúmeros tipos celulares no testículo apresentam integrinas na membrana plasmática, incluindo células de Sertoli, peritubulares e basais, além de espermátides (SALANOVA et al., 1995; GIEBEL et al., 1997; SHINOHARA et al., 1999), sugerindo que a

OPN pode mediar a adesão intercelular ou a migração das células germinativas durante o ciclo espermatogênico (MOURA, 2005). Nos espermatozóides, ela foi detectada na cabeça, peça intermediária e cauda em roedores (SIITERI et al. 1995) e bovinos (ERIKSON et al., 2003; ERIKSON e KILLIAN, 2004), mas com menor intensidade na cauda, em comparação com as demais regiões da célula espermática. Estudos com fertilização *in vitro* em bovinos, mostraram que a exposição de oócitos bovinos a anticorpos anti-OPN isolada do leite (36 kDa) reduziu significativamente o número de espermatozóides ligados (88% vs. 32%; GONÇALVES et al., 2004). Resultado idêntico foi obtido quando espermatozóides ejaculados foram incubados com o mesmo anticorpo (88% vs. 50%; GONÇALVES et al., 2007). Da mesma forma, incubação de espermatozóides e oócitos com anticorpos anti-integrinas reduziu significativamente o número de espermatozóides ligados (73% vs. 35%) e a taxa de fertilização (82% vs. 40%; GONÇALVES et al., 2007). Além disso, a adição de osteopontina ao meio de cultivo melhora significativamente as taxas de clivagem embrionária no dia 4 e o desenvolvimento de blastocistos nos dias 8 e 11 (GONÇALVES et al., 2003). Por outro lado, em camundongos cujo gene que codifica a OPN foi inativado através de *knock-out*, o desenvolvimento embrionário foi prejudicado (WEINTRAUB et al., 2004).

Considerando que tanto espermatozóides (FUSI et al., 1996; REDDY et al., 2003) quanto oócitos (D'CRUZ, 1996) possuem integrinas ligadas à membrana plasmática, o envolvimento das integrinas no processo de fertilização (BRONSON e FUSI, 1990; ALMEIDA et al., 1995) e os resultados com fertilização *in vitro* em bovinos (GONÇALVES et al., 2003, 2004, 2007) e suínos (HAO et al., 2006), e dada a presença de osteopontina nos fluidos do



oviduto (GABLER et al., 2003; HAO et al., 2006), é possível sugerir um modelo para explicar os efeitos benéficos da OPN sobre a fertilidade. O modelo mais provável para a atuação da osteopontina durante a fertilização sugere que a OPN se ligaria a integrinas e CD44 presentes na membrana espermática durante a ejaculação, e permaneceria ligada à membrana espermática durante o trajeto no trato reprodutivo feminino. Além disso, a OPN presente no oviduto também interagiria com integrinas presentes na membrana oocitária. Uma vez que os espermatozóides atingissem o oviduto, mais moléculas de osteopontina poderiam se ligar à membrana espermática. Uma vez que a OPN também é capaz de se ligar a outras moléculas de osteopontina (KAARTINEN et al., 1999), as moléculas de OPN interagiriam com integrinas e outras moléculas de osteopontina presentes na membrana dos oócitos, favorecendo a fertilização.

#### **2.2.5. FOSFOLIPASE A2**

Fosfolipases A2 são proteínas de baixa massa molecular (14 a 60 kDa), membros de uma família de fosfolipases que catalisam a remoção de ácidos graxos em posições específicas (CHAMINADE et al., 1999), promovendo a conversão de fosfolipídeos em lisolipídeos. No trato reprodutivo de ruminantes, essas enzimas estão nos espermatozóides e no plasma seminal (RONKKO et al., 1991; ATREJA e GANDHI, 1992; ROLDAN e FRAGGIO, 1993; RIFFO e PARRAGA, 1996; SOUBEYRAND et al., 1997). A fosfolipase A2 (PLA2) tem sido envolvida na modificação de lipídeos na membrana espermática, como parte do processo de maturação epididimária (RONKKO, 1992; UPPRETI et al., 1994). Recentemente, MOURA et al. (2006a) observaram que isoformas de

PLA2 presentes no fluido das glândulas sexuais acessórias apresentavam maior intensidade nos géis protéicos de touros de alta fertilidade, em comparação com animais com índices de não retorno mais baixos.

O mecanismo preciso pelo qual a PLA2 é mais prevalente em animais de alta fertilidade ainda é questão de especulação, mas sabe-se que a fosfolipase A2 presente no plasma seminal exerce função antimicrobiana (WEINRAUCH et al., 1996; BOURGEON et al., 2004). Além disso, em camundongos cuja expressão do gene codificante da PLA2 $\beta$  foi bloqueado através de *knock-out*, os espermatozóides apresentaram problemas de motilidade e redução de sua capacidade fertilizante (BAO et al., 2004). Adicionalmente, a PLA2 liga-se à membrana espermática (BREITBART e SPUNGIN, 1997) e está presente em quantidade considerável no oviduto bovino (GRIPPO et al., 1994). Considerando-se ainda que esta enzima produz lipídeos fusogênicos, tais como lisolipídeos e ácidos graxos livres, os quais desestabilizam a bicamada lipídica de membranas biológicas (ROLDAN e FRAGGIO, 1993), é provável que esta enzima favoreça a fertilidade dos animais promovendo uma desorganização das membranas espermáticas e induzindo a reação acrossômica quando os espermatozóides atingem o oviduto (LEPAGE e ROBERTS, 1995). Por outro lado, um excesso de atividade de fosfolipase A2, conforme se pode observar no plasma seminal caprino durante a estação não sexual (LA FALCI et al., 2002) poderia produzir lisolipídeos em excesso, os quais causariam danos à membrana plasmática, especialmente quando os espermatozóides fossem conservados em meios ricos em fosfolipídeos (DOUARD et al., 2005).

### **3. ESTUDO 1: VARIAÇÕES NO PERFIL PROTÉICO DO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR E PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE CARNEIROS SANTA INÊS**

#### **3.1. INTRODUÇÃO**

A região Nordeste concentra quase a metade do contingente populacional ovino do Brasil, estimado em cerca de 16 milhões de cabeças e composto por animais predominantemente deslanados, utilizados para a produção de carne e pele. Dentre os inúmeros tipos de ovinos existentes na região, a raça Santa Inês vem apresentando um acentuado desenvolvimento devido ao seu porte, qualidade de carcaça e da pele (OLIVEIRA e LIMA, 1994). Apenas há alguns anos, começou-se a produzir dados mais consistentes acerca do desenvolvimento sexual de cordeiros Santa Inês (MOURA et al., 1999; SOUZA et al., 2000), os quais enfatizam que o crescimento testicular destes animais está fortemente associado ao desenvolvimento corporal e peniano em animais jovens. Carneiros desta raça iniciam a produção dos primeiros espermatozóides por volta de 23 semanas (sem.) de vida, e atingem a puberdade, em média, às 28 sem. (SOUZA et al., 2001). Mesmo iniciando a produção espermática bastante cedo, a percentagem de espermatozóides móveis mostrou variações pouco significativas e graduais até cerca de 23 sem., com alterações mais acentuadas após esta fase. Já a motilidade progressiva só começou a desenvolver-se mais intensamente após 25 sem. e valores acima de 70% de espermatozóides móveis foram observados a partir de 30 sem. Demonstrou-se ainda que

a concentração espermática apresentou valores elevados somente às 42 sem. de idade (SOUZA et al., 2003).

Estes achados mostram que, apesar de células móveis poderem ser observadas ainda nas primeiras semanas de vida, a capacidade de se mover progressivamente só desenvolve-se mais tarde. Este fato sugere que o epidídimo e outras estruturas do trato reprodutivo masculino influenciam aspectos da função espermática mais intensamente apenas por volta de 30 sem., antes da concentração de testosterona na circulação periférica atingir níveis máximos (SOUZA et al., 2003). Esta capacidade do epidídimo de viabilizar o desenvolvimento da motilidade espermática já em idades jovens depende de alterações na composição protéica de suas secreções (BAKER et al., 2005). De fato, proteínas secretadas nos fluidos do trato reprodutivo masculino, em especial no plasma seminal, estão associadas a inúmeros aspectos da função reprodutiva em ruminantes (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994; 1996; 1998; SPROTT et al., 2000; MOURA, 2005; MOURA et al., 2006a).

Nesse sentido, sugere-se que o perfil protéico do plasma seminal de ovinos Santa Inês passa por alterações significativas ao longo do desenvolvimento reprodutivo, refletindo associações com a função espermática e outros aspectos da maturidade sexual desses animais. Portanto, o objetivo desse trabalho é determinar de que forma o perfil protéico do plasma seminal de cordeiros Santa Inês se modifica durante o primeiro ano de vida.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. DESCRIÇÃO DOS ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Dezesseis cordeiros da raça Santa Inês foram estudados entre as idades de 8 e 48 sem. de idade. Os animais foram desmamados aos 30 dias de idade e mantidos em uma baia coletiva, recebendo alimentação à base de feno de gramíneas (*Pennisetum sp.*; *Cynodon sp.*), concentrado e mistura mineral. Semanalmente, avaliou-se o nível de desbridamento do pênis dos animais, utilizando uma escala de 0 a 5 (WIGGINS e TERRIL, 1953). Ao atingirem o grau 2, por volta de 12 sem. de vida, iniciaram-se as tentativas de coleta de sêmen por meio de eletro-ejaculação, utilizando um eletrodo especialmente desenvolvido para utilização em animais jovens. O volume ejaculado e o turbilhonamento foram obtidos por observação direta do tubo de coleta graduado. Imediatamente após a coleta, uma alíquota de sêmen foi tomada para avaliação microscópica do percentual de espermatozóides móveis e com motilidade progressiva, e do percentual de células com defeitos morfológicos (COLAS, 1980). Uma segunda alíquota foi tomada, e diluída (1:400) para determinação da concentração espermática, em câmara de Neubauer (EVANS e MAXWELL, 1987). O restante do ejaculado era prontamente transportado ao laboratório, para separação do plasma seminal.

### 3.2.2. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ANÁLISE DOS MAPAS

#### PROTÉICOS

No laboratório, as amostras de sêmen foram centrifugadas duas vezes (1000 g, 15 min., 4°C) para obtenção do plasma seminal. O sobrenadante (plasma seminal) foi aliquotado e congelado (-80°C) para posterior utilização, descartando-se os espermatozoides. A concentração protéica das amostras foi determinada (BRADFORD, 1976) pela média de triplicatas, utilizando a albumina sérica bovina (BSA) para criar uma curva-padrão.

Para a preparação dos géis, um volume contendo 150 µg de proteínas foi misturado a um volume de tampão de re-hidratação (8M uréia, 1M tiouréia, 2% CHAPS, 10% glicerol, 2% anfólitos na faixa de pH 4 a 7, 25mM DTT e 0,002% de azul de bromofenol) em uma quantidade suficiente para completar 250µl. Esta mistura foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de gradiente de pH imobilizado (Amersham Biosciences, USA) de 13cm, com faixa de pH linear indo de 4 a 7, por um período de aproximadamente 20 horas. A focalização isoelétrica foi feita em um equipamento Multiphor II (Amersham Biosciences, USA) com a seguinte programação: 200V (30 min.), 500V (30 min.), 1000V (60 min.), 2500V (60 min.) e 3500V (5 hr.), totalizando 21.700 Vh. Após a focalização, as tiras foram equilibradas no tampão de equilíbrio I (6M uréia, 50mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS e 1% DTT) por 15 min. Em seguida, foram incubadas por mais 15 minutos com a solução de equilíbrio II (mesma composição da solução I, substituindo-se o DTT por 2,5% de iodoacetamida). Após a etapa

de equilíbrio, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE; 12,5%T, 2,6%C, 250V, 25mA) com base em sua massa molecular em um equipamento Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences, USA). Após a esta separação, que durou cerca de 5 horas, os géis foram fixados por cerca de 15 horas, e revelados com nitrato de prata (BLUM et al., 1987). Em seguida os géis foram digitalizados em um equipamento ImageScanner II (Amersham Biosciences, USA) e as imagens, salvas no formato *tiff*.

Os géis foram analisados utilizando-se o programa PDQuest (Bio-Rad Laboratories, USA). Para isso, foi criado um grupo de imagens (*matchset*) das amostras coletadas às 15, 18, 20, 24, 28, 30, 34 e 48 semanas de idade. O grupo era composto por 3 amostras nas idades de 15 e 20 semanas, e por 6 amostras nas demais idades, totalizando 40 géis. O gel principal (*máster gel*) foi baseado num gel representativo do grupo de 30 semanas de idade e outras proteínas consistentemente presentes nas demais amostras foram adicionadas. Proteínas presentes em diversas regiões dos géis foram usadas como marcos de orientação para se associar cada proteína nos diferentes géis, de acordo com a metodologia descrita por MOURA et al. (2006b), de modo que cada proteína, em cada gel, estivesse representada no gel principal. A quantificação das proteínas nos géis foi dada como PPM da densidade óptica total integrada de todas as proteínas, de acordo com o programa.

### 3.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado neste experimento. As diferenças entre as idades quanto à expressão das proteínas foi apresentada na forma de  $\text{media} \pm \text{erro-padrão}$ . Correlações de Pearson foram calculadas entre a intensidade dos *spots* nos mapas protéicos e características seminais dos animais em idades selecionadas ( $p < 0,05$ ; SAS, 2003).



### 3.3. RESULTADOS

A circunferência escrotal dos animais apresentou crescimento significativo entre 8 e 36 semanas de idade (figura 1), com variações não significativas após essa idade. O crescimento médio entre o aparecimento dos primeiros espermatozóides no ejaculado (23 sem.) e a puberdade (28 sem.) foi de  $0,14 \pm 0,01$  cm/dia, sendo esta a fase de desenvolvimento testicular mais acelerado ( $p < 0,01$ ).

A percentagem de espermatozóides móveis elevou-se apenas de 4 para 12% entre 15 e 19 sem. de idade, e para 20% às 23 sem. (figura 1). Variações mais significativas foram observadas entre 23 e 28 sem. (64%), coincidindo com a fase de maior crescimento testicular. Espermatozóides com motilidade progressiva só foram observados por volta de 25 sem. de idade, apresentando aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) até a idade de 30 sem., quando atingiu 65% de células progressivamente móveis (figura 1). Após 30 sem., foram observados ainda pequenos aumentos nesse parâmetro, mas sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

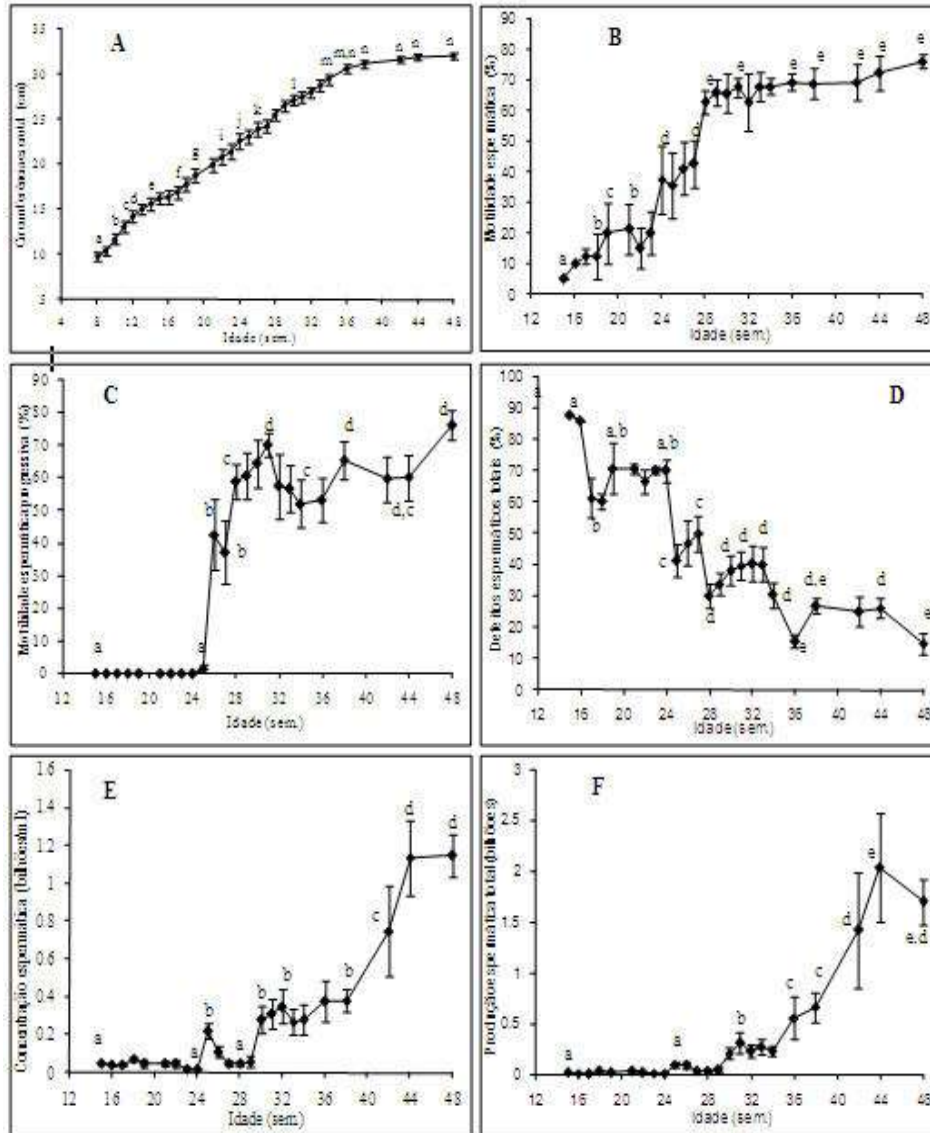
O total de espermatozóides com anormalidades morfológicas foi máximo às 15 sem. de idade (88%), reduzindo-se para  $30 \pm 2\%$  às 28 sem. e  $15,8 \pm 1\%$  às 36 sem., com pequenas variações daí em diante (figura 1). Em idades mais jovens (15 a 24 sem.), as principais anormalidades incluíram defeitos de cabeça e gota citoplasmática proximal. Entre 25 e 31 sem., período em que os animais atingiram a puberdade, o número de espermatozóides com defeitos de cabeça diminuiu consideravelmente, contando menos

de 2% do total de anormalidades espermáticas. Após 34 sem., os defeitos menores predominaram com maior intensidade, sendo os mais comuns as caudas dobradas ou fortemente enroladas, gotas citoplasmáticas distais e cabeças normais isoladas.

A concentração espermática dos animais manteve-se reduzida nas primeiras semanas de vida (figura 1), mas com aumentos importantes entre 29 sem. ( $50 \pm 10 \times 10^6$  células/ml) e 32 sem. ( $410 \pm 47 \times 10^6$  células/ml). Estas variações não foram significativas, possivelmente devido à grande variabilidade observada entre indivíduos. As variações mais significativas foram observadas entre 34 sem. ( $390 \pm 35 \times 10^6$  células/ml) e 44 sem. ( $1,21 \pm 0,2 \times 10^9$  células/ml), estabilizando-se ao redor de 1 bilhão de células por mililitro de sêmen após essa idade. O total de espermatozoides ejaculados apresentou variações muito semelhantes às observadas para concentração espermática, seguindo as mesmas tendências (figura 1).

Os mapas representativos das proteínas do plasma seminal nas diversas idades são mostrados na figura 2. Foram encontrados  $186 \pm 10$  spots protéicos nos géis oriundos de amostras coletadas às 48 sem., semelhante ao encontrado às 34 (183) e 30 (179) semanas de idade. Os mapas representando 34 e 48 semanas apresentaram uma seqüência de spots de 63 kDa (pI 4,2 a 5,0; seta "e", figura 2) que não estava presente nas idades mais jovens.

Figura 1: Variações na circunferência escrotal e qualidade do ejaculado em função da idade em carneiros da raça Santa Inês (média  $\pm$  EP). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



Os géis produzidos com amostras de 28 semanas de idade também apresentaram quantidade equivalente de *spots* (170), sendo as principais diferenças para as idades posteriores a ausência de *spots* acídicos na faixa de 150 kDa (seta “a”, figura 2) e um menor número de *spots* entre 40 e 50 kDa (pls de 5,0 a 5,7). Ao contrário dos mapas produzidos com amostras dos animais mais maduros, uma grande diferença no número de *spots* foi observada entre os géis de 15 semanas (45 *spots*) e os de 28 sem. (170 *spots*; figura 3). Nos animais mais jovens (15 sem.), os *spots* mais representativos restringiram-se a dois trens acídicos de 34 e 27 kDa (seqüências 1 e 2, respectivamente; caixa 9, figura 2) e uma série de *spots* de 16 kDa (pls de 4,6 a 6,4; caixa 10, figura 2). Entre 15 e 18 semanas, as diferenças mais marcantes foram a nítida secreção de proteínas ao redor de 35 kDa (caixas 2, 3, 4, 5 e 6; figura 2) e um trem na região básica, por volta de 28 kDa (caixa 8, figura 2).

À medida que os animais amadureceram, novas proteínas foram detectadas no plasma seminal. Nos mapas de 20 semanas de idade, seqüências de elevada massa molecular (158 a 160 kDa; setas “b”, “c” e “d”; figura 2) foram detectadas, além de outras proteínas nas regiões 3, 4 e 5, diferentemente dos mapas obtidos em idades mais jovens. Já entre 20 e 24 semanas, um aumento considerável foi observado tanto no número de *spots* detectados (96 para 134) quanto na intensidade dos mesmos, com exceção daqueles apresentados na caixa 4 (figura 2). Apesar de menos evidentes, pequenas diferenças ocorreram entre 24 e 28 semanas, especialmente na intensidade dos *spots* presentes nas regiões 2, 3, 6 e 9 (figura 2).

Figura 2: Mapas bidimensionais revelados por prata, representativos das proteínas do plasma seminal obtido de carneiros Santa Inês nas idades de 15, 18, 20, 24, 28, 30, 34 e 48 semanas de vida. Para cada idade, um gel principal foi construído pelo programa PDQuest.

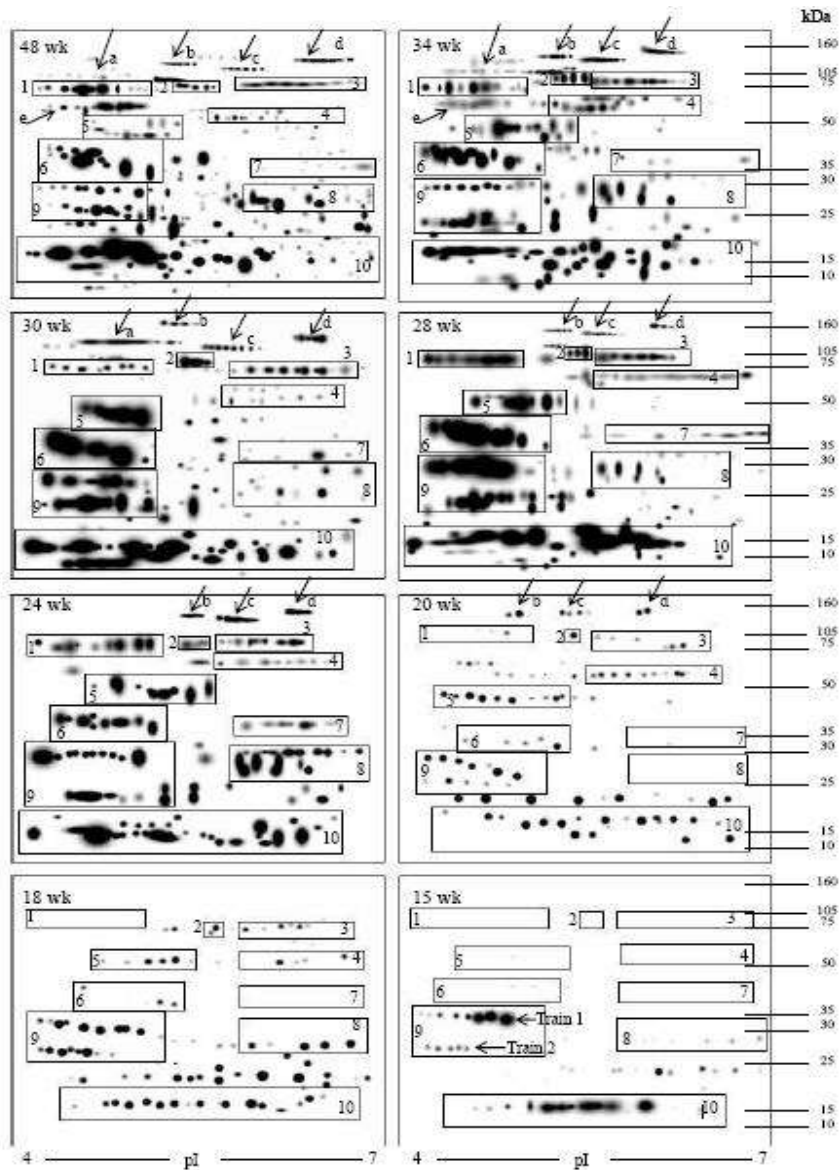


Figura 3: Quantidade de *spots* protéicos detectados em mapas bidimensionais do plasma seminal de carneiros Santa Inês em diferentes idades.

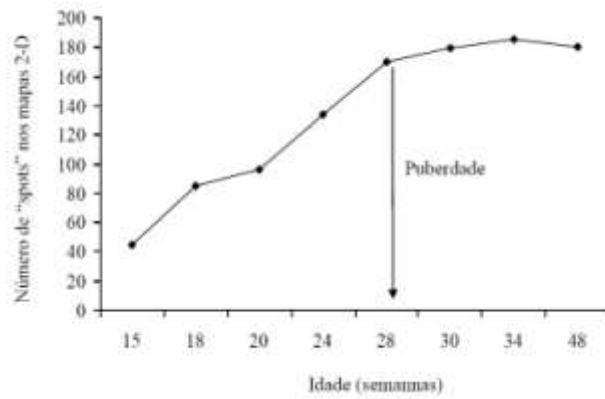
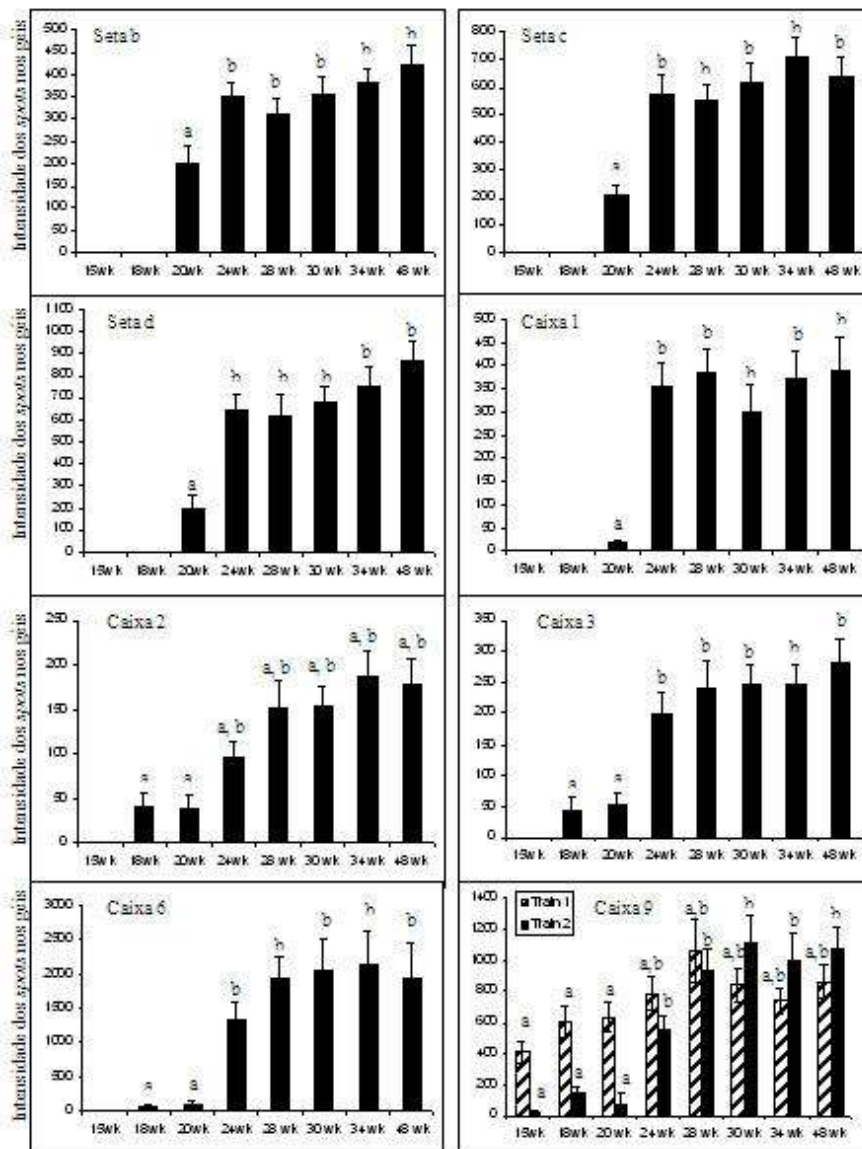


Figura 4: Variações na intensidade dos *spots* protéicos relacionadas à idade em mapas bidimensionais do plasma seminal de carneiros Santa Inês. Para cada idade, as barras representam a intensidade total ( $\pm$  erro-padrão) de todos os *spots* identificados em cada região dos mapas 2D mostradas na figura 1.



Mudanças quantitativas na secreção dos *spots* em função da idade foram mais evidentes durante a fase pré-púbere (figura 4). Os *spots* indicados pelas setas “b”, “c” e “d” (158 a 160 kDa) e caixa 1 (90 kDa) apareceram nos mapas pela primeira vez na idade de 20 semanas (figura 2).

Entre 20 e 24 sem., a intensidade dos *spots* de elevada massa molecular (158 a 160 kDa) aumentou em 1,7 a 3,3 vezes e aquela dos *spots* da caixa 1, aumentou 21 vezes. Proteínas presentes nas caixas 2 (95 kDa) e 3 (90 kDa) começaram a ser detectadas às 18 sem., mas sua expressão mostrou-se bastante aumentada às 20 (2,5 vezes) e 24 sem. (3,9 vezes), com pequenas mudanças às 28 (1,6 vezes) e 48 sem. (1,2 vezes). Já os *spots* na faixa de 43 kDa (caixa 6), quase indetectáveis às 15 sem., foram visualizados claramente apenas às 18 sem. As principais variações na expressão desses *spots* deram-se entre 20 e 24 sem. (12,4 vezes) e entre 24 e 28 sem. (1,5 vezes), mas sem grandes alterações em idades subsequentes. A região 9 dos mapas (figura 2) apresenta duas seqüências protéicas, ambas já detectáveis às 15 sem. A intensidade da seqüência 1 desta região, aumentou gradualmente entre 15 e 28 sem. (1,04 a 1,5 vezes), com pequenas alterações posteriormente. De outra forma, a seqüência 2 mostrou mudanças mais marcantes neste período, aumentando 6,3 vezes entre 15 e 18, 7,6 vezes entre 20 e 24 e 1,7 vezes entre 24 e 28 sem. de idade nos carneiros Santa Inês.

Detectaram-se também relações entre a intensidade de alguns *spots* nos mapas protéicos de amostras obtidas às 48 sem. de idade e parâmetros espermáticos. Dois *spots* (38 kDa, pI 4,5 e 15 kDa; pI 6,8) estavam significativamente associados à concentração espermática dos ejaculados ( $R^2=0,92$ ;  $p<0,001$ ). Da mesma forma, outros dois *spots*,



também de baixa massa molecular (16 e 10 kDa, pI 5,3) também estavam relacionados com a motilidade espermática observada nos ejaculados às 48 sem. ( $R^2=0,91$ ;  $p<0,001$ ). Além disso, foi detectada ainda uma relação entre a intensidade de um outro *spot* de massa molecular intermediária (56 kDa, pI 5,0) e a motilidade espermática progressiva média detectada entre as idades de 42 a 48 sem. ( $R^2=0,64$ ;  $p<0,01$ ). Esses *spots* foram detectados no plasma seminal dos animais já as 15 sem. de idade, ainda que com intensidade bastante reduzida.

### 3.4. DISCUSSÃO

Este trabalho discute aspectos do desenvolvimento sexual de cordeiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. Os resultados mostram que a expressão de várias proteínas no plasma seminal se estabelece progressivamente à medida que o animal amadurece, especialmente na fase de transição entre a pré-puberdade e puberdade. De acordo com a literatura, esse é o primeiro estudo a acompanhar essas mudanças no desenvolvimento sexual em ovinos deslanados.

O número total de *spots* protéicos detectados nos géis 2D do plasma seminal aumentou principalmente entre 15 e 28 sem., período em que ocorreram mudanças importantes no desenvolvimento testicular e na qualidade do sêmen. Este período também foi marcado por alterações quantitativas substanciais em inúmeros *spots*. Várias proteínas já eram expressas desde as 15 sem. (caixa 9, figuras 2 e 4), outras às 18 sem. (caixas 2, 3 e 6, figura 2), enquanto outras tantas passaram a ser detectadas somente às 20 sem. de idade no plasma seminal (setas "b", "c" e "d" e caixa 1, figura 2). Outra mudança substancial foi detectada entre 20 e 24 sem. e, em menor intensidade, entre 24 e 28 sem. Dessa forma, nota-se que as principais mudanças no perfil protéico do plasma seminal ocorrem imediatamente antes ou concomitantemente com mudanças ocorridas no quadro seminal, especialmente no que se refere à motilidade espermática e defeitos morfológicos. Após as 28 sem., somente diferenças discretas ocorreram no perfil protéico, acompanhadas de variações também pequenas na motilidade espermática.

Apesar da maior parte das mudanças na expressão de proteínas no plasma seminal ocorrerem na transição entre pré-puberdade e puberdade (15 a 28 sem.), alguns *spots* foram secretados exclusivamente nas idades pós-púberes. Seqüências protéicas (“a”; 150 kDa e “e”; 63 kDa; figura 2) foram detectados às 30 e 34 sem., respectivamente, quando alterações importantes no volume ejaculado e na concentração espermática são verificadas. Mais especificamente, a intensidade dos *spots* da seqüência “e” aumentou 3,2 vezes entre 34 e 38 sem., exatamente quando a concentração espermática aumenta cerca de 4 vezes. Estas alterações na seqüência “e” coincidem ainda com a fase em que se detectam as maiores concentrações de testosterona na circulação periférica, embora outras mudanças tenham ocorrido no perfil protéico sob concentrações mais baixas desse hormônio. Estes achados sugerem que algumas proteínas parecem reguladas diferencialmente pelos andrógenos durante o desenvolvimento sexual.

Poucos estudos relatam alterações na secreção protéica do plasma seminal associadas à idade, especialmente no carneiro. SYNTIN et al. (1999) demonstraram que a expressão da prostaglandina D sintetase no epidídimo suíno é regulada diferentemente ao longo do desenvolvimento sexual, aparecendo inicialmente quando os primeiros espermatozóides entram na região anterior desse órgão, por volta de 19 semanas de idade. Além disso, a expressão de outras proteínas também se modificou em diferentes regiões do epidídimo durante a pré-puberdade de suínos (SYNTIN et al., 1999), resultados que, em linhas gerais, apresentam concordância com o presente estudo conduzido com os animais Santa Inês. No caso dos cordeiros Santa Inês, é bastante provável que inúmeras dessas proteínas expressadas diferencialmente com a idade estejam ligadas à função

epididimal, devido a suas associações cronológicas com as variações na motilidade espermática.

Dada a grande complexidade observada nos mapas protéicos de plasma seminal produzidos nesse trabalho, principalmente naqueles obtidos durante e após a puberdade (28 sem.), estes mapas foram divididos em regiões, contendo seqüências ou grupos específicos de proteínas detectados nas diversas idades. Análises de mapas 2D de amostras de fluido da cauda do epidídimo (capítulo 3), plasma seminal e fluido das glândulas sexuais acessórias de touros (MOURA et al., 2006a,b) e fluido da cauda do epidídimo de ovinos e suínos adultos (SYNTIN et al., 1999; DACHEUX e DACHEUX, 2002) e em humanos (DACHEUX et al., 2006) evidencia claramente que muitos dos trens observados são, na verdade, isoformas das mesmas proteínas. Portanto, este também pode ser o caso de várias seqüências de *spots* observadas nos mapas apresentados nesse trabalho, apesar de mais estudos serem necessários para se confirmar essa hipótese.

Os *spots* de 15 e 18 kDa expressos no plasma seminal dos animais já às 15 sem. de idade (caixa 10, figura 2) apresentam massa molecular na mesma faixa das espermedesinas descritas por BERGERON et al. (2005) no plasma seminal de carneiros adultos de raças européias. Estas espermedesinas apresentam reação cruzada com anticorpos contra proteínas do plasma seminal bovino (BSP A1/A2 e A3; BERGERON et al., 2005), sugerindo que possuem alguma semelhança estrutural. Além disso, proteínas semelhantes às BSPs já foram identificadas no plasma seminal de carneiros adultos (15 kDa, pls 4,7 a 5,2), usando o mesmo tipo de anticorpos (JOBIM et al., 2005). É interessante notar que essas proteínas apresentam massa molecular e faixa de pI comparáveis àquelas

observadas na caixa 10 (figura 2) e às BSPs A1/A2 e A3 identificadas por imunoblots e espectrometria de massa no fluido das glândulas sexuais acessórias em bovinos (14 kDa, pls 4,8 a 5,2; MOURA et al., 2006a). Os *spots* protéicos mostrados na caixa 10 localizaram-se numa faixa de pls de 4,2 a 6,6 (idades pós-púberes), possivelmente em consequência da estreita faixa de pH das tiras utilizadas (4 a 7). As BSPs são sintetizadas nas glândulas sexuais acessórias, mais especificamente nas glândulas vesiculares, e atuam no processo de capacitação espermática em bovinos (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002), bem como sobre a motilidade espermática (SANCHEZ-LUENGO et al., 2004) e sobre a formação do reservatório espermático no oviduto (GWATHMEY et al., 2006), mas as possíveis implicações de proteínas semelhantes em carneiros jovens e adultos ainda é desconhecida.

Inúmeros autores têm relatado associações entre proteínas detectadas no plasma seminal e a fertilidade dos reprodutores (MILLER et al., 1990; KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1996, 1998; MOURA et al., 2006b), bem como com aspectos da função espermática, incluindo a motilidade (AMMAN et al., 1987; DIAMANDIS et al., 1999). Esses achados sugerem que existem proteínas secretadas pelo trato reprodutivo masculino que modulam a função espermática, de certa forma favorecendo a fertilização. No entanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela uma vez que, apesar de diversos parâmetros seminais serem indicativos do potencial reprodutivo de um reprodutor, os mesmos refletem apenas alguns aspectos necessários para o sucesso da fertilização e, portanto, podem ter relação limitada com os índices de fertilidade desses animais (SMITH et al., 1981; RODRIGUEZ-MARTINEZ e LARSSON, 1998; ZHANG et al., 1998).

Esse é o primeiro estudo a associar aspectos da puberdade e do desenvolvimento sexual a variações no perfil protéico do plasma seminal ovino. Embora a caracterização bioquímica e funcional destas proteínas ainda não tenha sido concluída, as associações entre expressão das mesmas e aspectos do desenvolvimento sexual dos carneiros sugerem que estão relacionadas à função espermática e podem vir a serem indicadores da precocidade sexual dos animais. Portanto, este trabalho mostra que a secreção de proteínas no plasma seminal em cordeiros Santa Inês ocorre de forma sincronizada com uma série de alterações complexas no desenvolvimento sexual como um todo, ao longo do primeiro ano de vida desses animais. Estas mudanças foram mais marcantes na fase de pré-puberdade, justamente quando os espermatozoides começaram a adquirir motilidade progressiva.

Os resultados mostrados nesse trabalho deverão trazer um novo enfoque sobre como as proteínas são expressas no plasma seminal ovino desde idades jovens e de como as mesmas modificam-se ao longo do desenvolvimento sexual dos animais. Além disso, demonstram que existem proteínas com associações potenciais com alguns aspectos funcionais dos espermatozoides, necessários para que estas células atinjam o local de fertilização no trato reprodutivo feminino. Adicionalmente, esses achados devem servir de base para estudos com o objetivo de melhor se compreender as interações entre proteínas específicas do plasma seminal, função espermática e desenvolvimento sexual de carneiros, levando ao desenvolvimento de estratégias que melhorem a eficiência reprodutiva desses animais.

#### 4. ESTUDO 2: PADRÃO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL BOVINO BSP A1/A2, BSP 30-kDa E OSTEOPONTINA A MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES EJACULADOS ANTES E APÓS INCUBAÇÃO COM FLUIDOS DO OVIDUTO

##### 4.1. INTRODUÇÃO

Estudos anteriores têm demonstrado a existência de relações significativas entre proteínas dos fluidos do trato reprodutivo masculino e a fertilidade de touros leiteiros provados, cujo índice de fertilidade foi baseado em milhares de inseminações (KILLIAN et al., 1993; MOURA et al., 2006, 2007ab). Estes índices estavam correlacionados positivamente com a quantidade de osteopontina e fosfolipase A<sub>2</sub> no plasma seminal, correlacionados negativamente com a espermedesina Z13 e mostraram também associação quadrática com a (*Bovine seminal plasma; BSP*) BSP 30-kDa (KILLIAN et al., 1993; MOURA et al., 2007a). Além disso, animais cujo fluido das glândulas sexuais acessórias (AGF) continha mais albumina, BSP A1/A2, BSP 30-kDa, clusterina, osteopontina (OPN) e fosfolipase A<sub>2</sub>, e menos *nucleobindin* (NUC) apresentaram maior capacidade de estimular a capacidade de espermatozóides epididimais em penetrar oócitos bovinos *in vitro* (MOURA et al., 2007b). A partir desses resultados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, fica claro que o plasma seminal e o fluido das glândulas acessórias possuem proteínas que são marcadores da fertilidade em touros, incluindo a OPN e as BSPs.

As BSPs constituem cerca de 86% do total de proteínas detectadas no AGF bovino (MOURA et al., 2007a) e promovem uma remoção parcial de colesterol e fosfolipídeos da membrana espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002), bem como atuam na mediação da ligação dos espermatozóides ao epitélio do oviduto e manutenção da motilidade espermática nesse órgão (GWATHMEY et al., 2003, 2006). Já a osteopontina tem se mostrado como o marcador mais significativo da fertilidade de touros leiteiros, sendo 4,5 vezes mais concentrada no AGF de touros com os maiores índices de fertilidade, em comparação com os demais (KILLIAN et al., 1993; MOURA et al., 2007a). A OPN já foi detectada em inúmeros tecidos (FRANZEN e HEINEGARD, 1985; MAZZALI et al., 2002; JOHNSON et al., 2003; DENHARDT, 2004; RANGASWAMI et al., 2006), atuando em diversas funções, como migração e adesão celular, estimulação do sistema imune, mineralização de tecidos e prevenção da apoptose.

Sendo a OPN uma molécula que atua na adesão intercelular, propõe-se que a mesma participaria também na interação entre espermatozóide e oócito durante a fertilização (MOURA, 2005), hipótese apoiada por experimentos recentes conduzidos com fertilização *in vitro* de oócitos bovinos (GONÇALVES et al., 2006) e suínos (HAO et al., 2006). As proteínas do fluido das glândulas acessórias, tais como a OPN e as BSPs ligam-se aos espermatozóides durante a ejaculação, e acredita-se que permaneçam ligadas até o momento da fertilização. A membrana espermática sofre alterações após a ejaculação, especialmente em sua composição protéica, por ocasião do contato com os fluidos do oviduto (KILLIAN, 2004), apesar de a identidade da maior parte dessas proteínas não ser conhecida.



Informações sobre as interações das proteínas com a membrana espermática e sobre como estas interações modificam-se por ocasião da exposição dos espermatozoides aos fluidos do trato reprodutivo feminino podem auxiliar compreensão dos mecanismos de funcionamento das proteínas associadas à fertilidade. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar a distribuição topográfica e a intensidade de ligação das proteínas BSP A1/A2, BSP-30kDa e OPN à membrana de espermatozoides ejaculados e após exposição destas células *in vitro* às secreções do oviduto.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

O padrão de ligação das proteínas BSP-A1/A2, BSP-30kDa e osteopontina foi avaliado em espermatozoides obtidos de sêmen fresco e, em seguida, exposto sequencialmente aos fluidos do istmo (IODF) e da ampola (AODF) do oviduto. Foram utilizadas amostras de sêmen de cinco touros Holandês, submetidos às seguintes condições: 1. Espermatozoides ejaculados; 2. Espermatozoides ejaculados incubados com IODF; 3. Espermatozoides ejaculados + IODF incubados com AODF. De cada um desses tratamentos foram colhidas alíquotas de células espermáticas para o procedimento de imunocitoquímica e análise por microscopia confocal.

### **4.2.2. COLETA DO FLUIDO DO OVIDUTO**

Amostras de fluidos do oviduto (ODF), istmo e ampola, foram coletadas por meio de catéteres inseridos nos respectivos segmentos, de acordo com a metodologia descrita por KAVANAUGH et al. (1992). Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 60 min., 4°C) para remoção de resíduos celulares, e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Nos mesmos dias de coleta de ODF, amostras de sangue foram também obtidas para determinação das concentrações de progesterona pela

técnica de rádioimunoensaio. As amostras foram obtidas durante, pelo menos, dois ciclos estrais consecutivos de cada vaca. Amostras de fluido da fase não-luteal do ciclo estral, cuja concentração de progesterona era menor que 1,5 ng/ml, foram agrupadas para cada fêmea. Para todas as incubações com os espermatozoides, utilizou-se a combinação de amostras de ODF de três vacas diferentes.

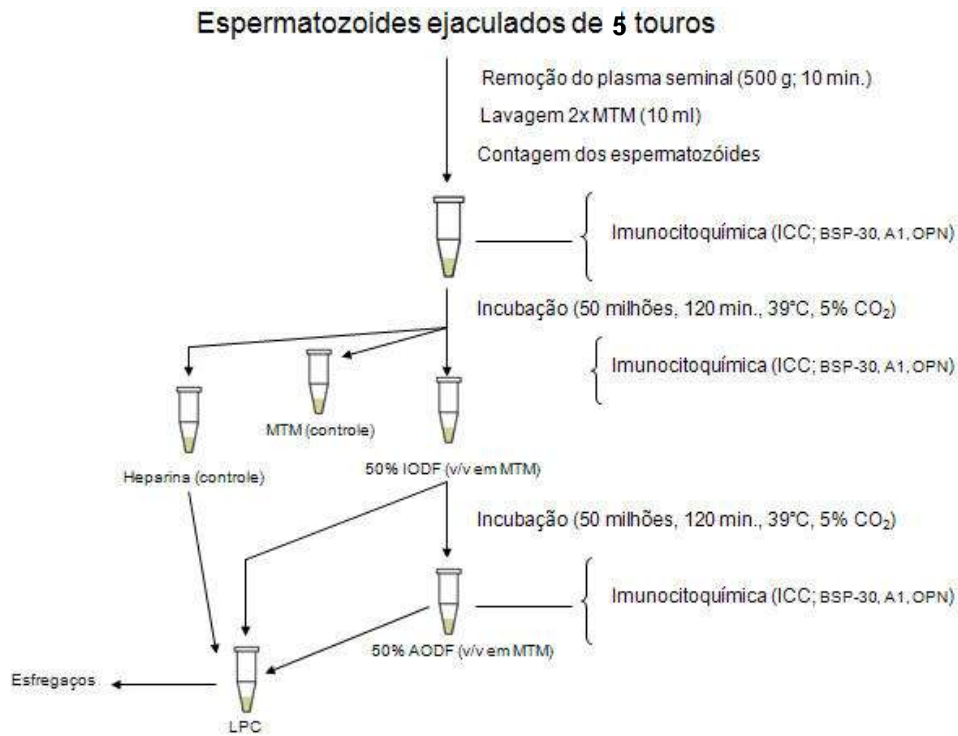
#### **4.2.3. PREPARAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES E INCUBAÇÕES COM FLUIDO DE OVIDUTO**

Este experimento utilizou o sêmen de cinco touros Holandeses adultos, procedentes de centrais de inseminação artificial, rotineiramente submetidos à coleta de sêmen (duas vezes por semana). Para as análises descritas neste estudo, utilizaram-se dois ejaculados de cada touro, contendo no mínimo 80% de células móveis. Após a coleta por vagina artificial, o sêmen foi mantido em banho-maria (37°C) o tempo suficiente para análise microscópica. Em seguida, as amostras foram diluídas (1:3) em meio modificado de Tyrode (MTM; PARRISH et al., 1988) previamente mantido em incubador (39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 12 horas) e centrifugadas (700 *g*, 10 min.). Este procedimento foi repetido duas vezes, para a completa remoção do plasma seminal. Por fim, os espermatozoides foram novamente suspensos (1:5) em MTM suplementado (MTMS; 1 mM piruvato; 100 UI/ml; 100 µg/ml) e uma pequena alíquota dessa suspensão foi tomada para determinação da concentração espermática.

Alíquotas contendo  $5 \times 10^6$  espermatozóides foram processadas para imunocitoquímica (ICC) utilizando anticorpos policlonais (produzidos em coelhos) contra a BSP-A1/A2, BSP-30-kDa e osteopontina. Do restante da amostra, outras alíquotas com  $50 \times 10^6$  células espermáticas foram retiradas e incubadas por 4 horas (39°C, 5% CO<sub>2</sub>) em um meio contendo 50% de MTMS e 50% de fluido do istmo (v/v). Após esta incubação, uma fração ( $5 \times 10^6$  células) foi retirada para ICC, enquanto o restante das células foi lavada em MTMS (700 g, 10 min.) e novamente incubada em MTMS + fluido da ampola (50% v/v) durante 60 minutos, nas mesmas condições descritas acima. Em seguida, novas alíquotas foram tomadas para ICC (figura 1). Sendo o ODF um meio capacitante (KILLIAN, 2004), uma outra alíquota de células ejaculadas foi incubada com heparina (10 µg/ml) para servir de controle positivo para a capacitação espermática. Outra alíquota foi incubada apenas em MTMS, servindo como controle negativo.

Após cada incubação, uma alíquota de 100 µl foi tomada e exposta por cerca de 10 minutos (37°C) a lisofosfatidilcolina (LPC; 60 µg/ml) e albumina (BSA; 50 µg/µl) para induzir a reação acrossômica em espermatozóides capacitados (PARRISH et al., 1988). Em seguida, 10 µl dessa solução foram utilizados para confecção de esfregaços (Fast Green FCF/ Eosina B) avaliados sob microscopia óptica, contando-se 100 células por animal, em cada tratamento, para determinação do número de espermatozóides capacitados. Foram considerados capacitados os espermatozóides vivos e com acrossomo reagido em resposta ao LPC.

Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando o delineamento experimental dos tratamentos com espermatozoides ejaculados e após incubação com fluidos do oviduto.



#### 4.2.4. IMUNOCITOQUÍMICA

Amostras de espermatozoides obtidas antes e depois das incubações com o ODF foram fixadas em paraformaldeído (PFA; 2% em PBS) por 10 minutos (4°C), sob leve agitação. Seguiu-se a dupla lavagem das amostras em PBS (10.000 g, 5 min.) e a incubação em tampão de bloqueio, composto de PBS + 0,1% Tween-20 (PBS-T), adicionado de 5% de BSA, sob leve agitação (4°C, 120 minutos). Após este período, adicionaram-se os anticorpos primários a cada tratamento (1:200 para BSP-A1/A2 e BSP-30kDa, e 1:100 para osteopontina), e a incubação prolongou-se por mais 120 minutos. O material foi lavado novamente (PBS-T; 10.000 g, 5 min.) para remoção dos anticorpos primários não ligados e, em seguida, incubados com anticorpos secundários conjugados com FITC (Sigma Inc., USA; 1:300) por 60 min., nas mesmas condições das demais incubações, porém sob ausência de luz. Ao final, os espermatozoides foram novamente lavados em PBS-T, e os esfregaços foram confeccionados utilizando-se *anti-fade* (Invitrogen Corp., USA), em ambiente de baixa luminosidade.

Os anticorpos primários contra as BSPs foram previamente isolados do anti-soro de coelhos (MOURA et al., 2006b), fornecidos gentilmente pelo Dr. P. Manjunath (University of Montreal, Canadá). Os anticorpos policlonais contra osteopontina foram desenvolvidos também em coelhos, e específicos contra OPN bovina (36 kDa) purificada do leite (GABLER et al., 2003).

#### 4.2.5. CAPTURA DAS IMAGENS UTILIZANDO MICROSCOPIA CONFOCAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As imagens das células submetidas à imunocitoquímica foram capturadas através de microscopia confocal, utilizando-se o programa FluoView (v. 9.0, Olympus Inc., USA) na forma de arquivos *tiff* de 24 *bits*, compostos de uma série cortes seqüenciais tomados a cada 0,125  $\mu\text{m}$ , num total de 5  $\mu\text{m}$ . As imagens foram processadas pelo aplicativo Autodeblur & Autovisualize (v. X, Media Cybernetics Inc., USA) e a intensidade da fluorescência quantificada (em *pixels*) nas regiões dos espermatozoides onde uma reação positiva de fluorescência foi evidenciada. A intensidade de ligação média de todos os planos tomados de cada célula foi comparada pelo teste de Duncan (SAS, 2003;  $p < 0,05$ ) entre as diferentes regiões do espermatozoide, e dentro e entre os tratamentos (1. SPTZ ejaculados (controle), 2. SPTZ + IODF, 3. SPTZ + IODF + AODF). Para fins destas análises, a intensidade da fluorescência foi quantificada nas seguintes regiões dos espermatozoides: peça intermediária, regiões equatorial, pós-equatorial e acrossômica (figura 2). As células com acrossomo intacto ou reagido foram analisadas separadamente.

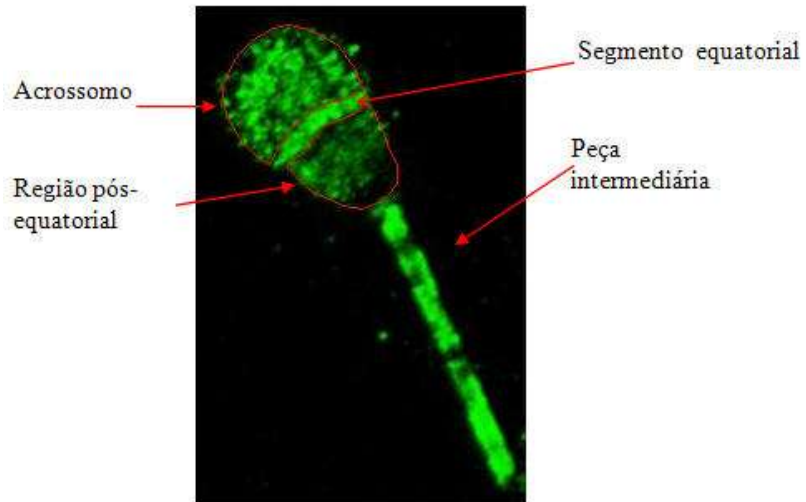


Figura 2: Identificação das regiões do espermatozóide bovino ejaculado nas quais se quantificou a intensidade de fluorescência. A imagem representa reação específica para a BSP-30kDa.



### 4.3. RESULTADOS

Uma reação positiva para BSP-A1/A2 foi detectada na peça intermediária, regiões equatorial e pós-equatorial e acrossomo dos espermatozóides, em todos os tratamentos (figura 3). A análise dos diferentes planos de várias células mostrou fluorescência significativamente mais intensa na peça intermediária, em comparação com o restante das células (figura 4), independente das condições de incubação.

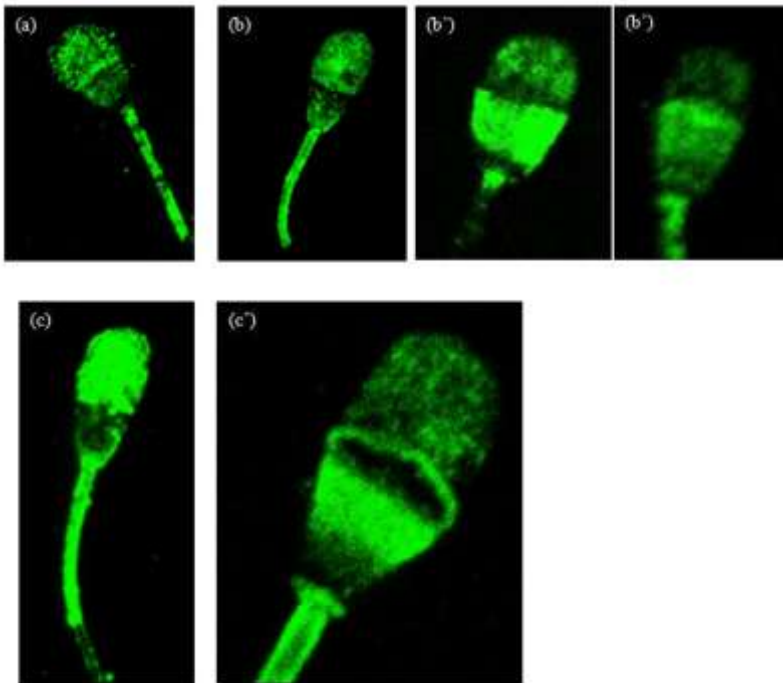
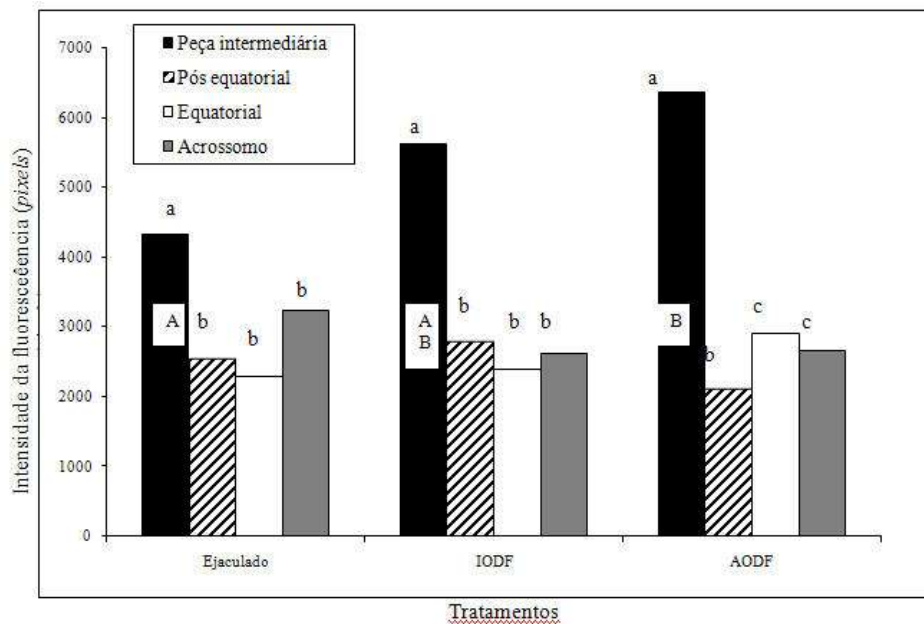


Figura 3: Topografia de ligação da proteína BSP-A1/A2 à membrana de espermatozóides bovinos ejaculados (a) e para células com acrossomo intacto após exposição ao fluido do istmo (b) e da ampola (c) do oviduto da fase não luteal do ciclo estral. A topografia de células com acrossomo alterado também é mostrada para IODF (b') e AODF (c'). As imagens foram produzidas a partir de imunofluorescência em microscopia confocal.

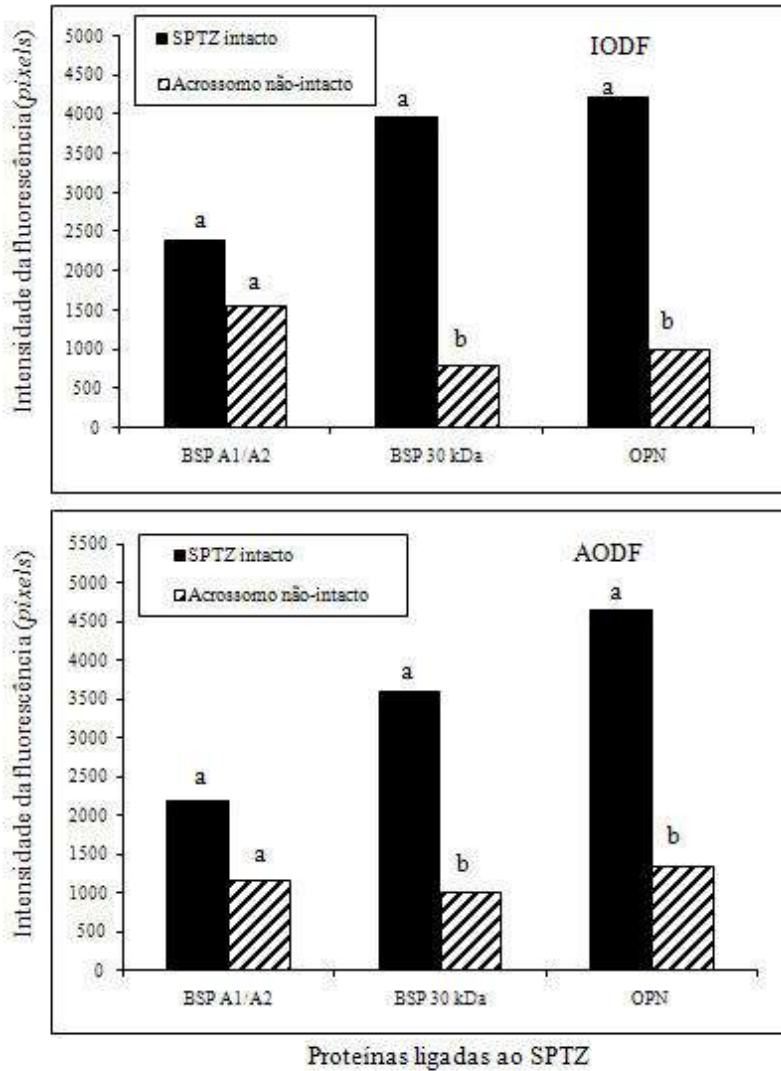
Esta fluorescência na peça intermediária tornou-se mais intensa após incubação com os fluidos do oviduto, mas sem alterações significativas nos demais segmentos celulares (figura 4). As células com acrossomo reagido apresentaram a mesma topografia de ligação com a proteína BSP A1/A2 em comparação com as células intactas, mas a intensidade da fluorescência tornou-se 34 e 47% menor ( $p < 0,06$ ) no segmento acrossômico após contato com os fluidos do istmo e da ampola, respectivamente (figura 5).



Letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as regiões do espermatozóide, dentro de cada tratamento.

Letras maiúsculas mostram variações significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos, para cada região das células.

Figura 4: Comparações quantitativas da intensidade de ligação da proteína BSP-A1/A2 a regiões específicas da membrana (acrossomo intacto) de espermatozoides bovinos ejaculados e após contato com os fluidos do oviduto.



Letras representam diferenças significativas para cada proteína ( $p < 0,05$ ).

Figura 5: Comparações quantitativas da intensidade de ligação das proteínas BSP-A1/A2, BSP-30kDa e osteopontina (OPN) à membrana acrossômica em células com acrossomo intacto e não-intacto de espermatozoides bovinos ejaculados e após contato com os fluidos do oviduto.

O modelo de ligação da BSP-30kDa aos espermatozoides foi semelhante àquele observado para a BSP-A1/A2. Da mesma forma, a imunoreação mais intensa foi observada na peça intermediária, tanto para células expostas ou não ao ODF (figura 6 e 7). Além disso, nos espermatozoides com acrossomo reagido, a fluorescência apresentou redução de 4,9 e 3,6 vezes após exposição aos fluidos do istmo e da ampola, respectivamente (figura 5).

Figura 6: Topografia de ligação da proteína BSP-30kDa à membrana de espermatozoides bovinos ejaculados (a) e para células com acrossomo intacto após exposição ao fluido do istmo (b) e da ampola (c) do oviduto durante a fase não luteal do ciclo estral. A topografia de células com acrossomo alterado também é mostrada para IODF (b') e AODF (c'). As imagens foram produzidas a partir de imunofluorescência em microscopia confocal.

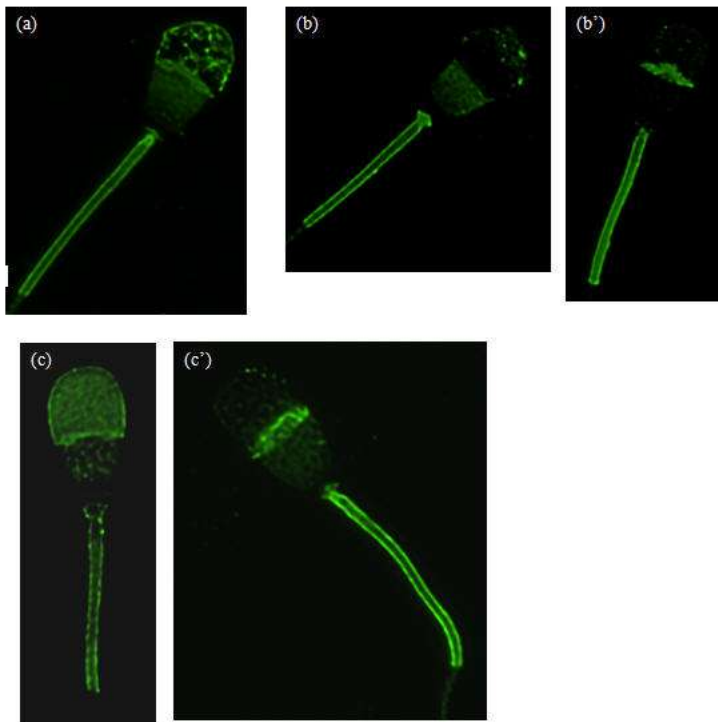
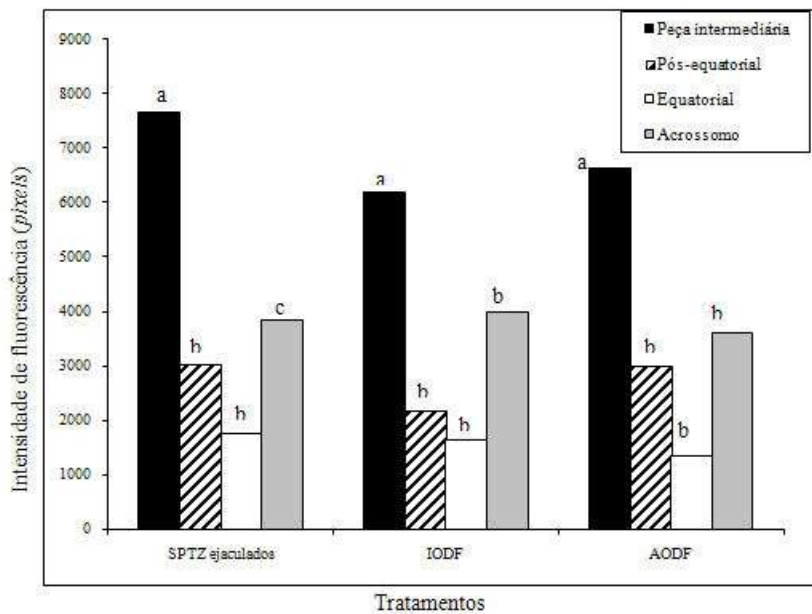


Figura 7: Comparações quantitativas da intensidade de ligação da proteína BSP-30kDa a regiões específicas da membrana (acrossomo intacto) de espermatozoides bovinos ejaculados e após contato com os fluidos do oviduto.



Letras representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre regiões dos SPTZ, dentro de cada tratamento. Não houve diferenças significativas entre tratamentos para cada região da célula.

A ligação da osteopontina foi identificada na região pós-equatorial e na extremidade do acrossomo em espermatozoides ejaculados (figura 8), apresentando fluorescência 3 vezes mais intensa ( $p < 0,05$ ) no acrossomo em comparação com o segmento pós-equatorial (figura 9). Entre as células com acrossomo intacto, a incubação com o IODF por 4 horas causou um aumento na ligação da OPN com a região pós-equatorial das células espermáticas ( $p < 0,05$ ). No entanto, exposição ao fluido da ampola não alterou a intensidade de ligação desta proteína. Também não foram verificadas alterações no segmento acrossômico (figura 9), como resultado da exposição ao fluido do

istmo ou ampola. Espermatozoides com acrossomo reagido apresentaram uma redução significativa na intensidade da fluorescência neste segmento (4,1X e 3,6X, respectivamente) por ocasião do contato com fluido proveniente do istmo ou ampola do oviduto (figura 5).

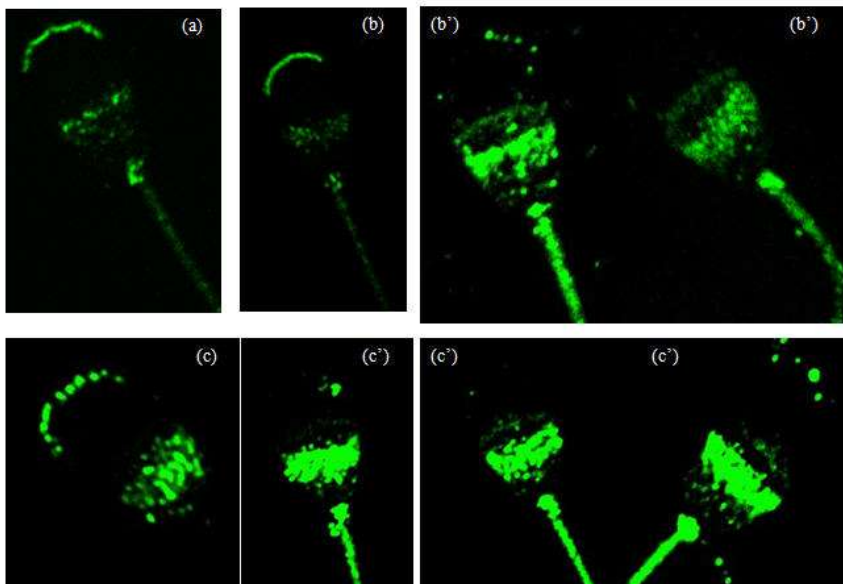
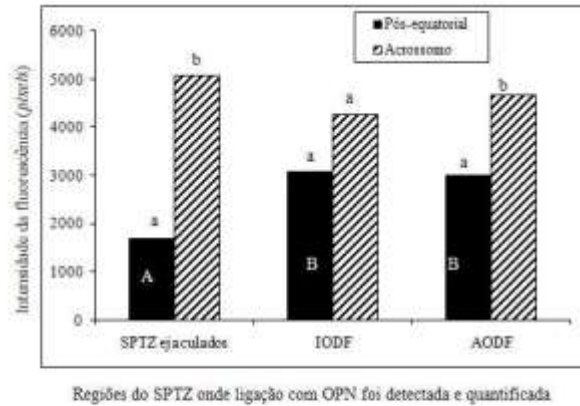


Figura 8: Topografia de ligação da osteopontina (OPN) à membrana de espermatozoides bovinos ejaculados (a) e para células com acrossomo intacto após exposição ao fluido do istmo (b) e da ampola (c) do oviduto da fase não luteal do ciclo estral. A topografia de células com acrossomo alterado também é mostrada para IODF (b') e AODF (c'). As imagens foram produzidas a partir de imunofluorescência em microscopia confocal.

A maior percentagem de células capacitadas e capazes de reação acrossômica em resposta ao LPC ocorreu após exposição das células aos fluidos do istmo (39,8% e 79%) e ampola (20,5% e 69,3%, respectivamente) em comparação aos espermatozoides expostos apenas ao MTMS (12,3% e 49,3%) e à heparina (23,7% e 38,9%; figura 10).



Letras minúsculas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre regiões do SPTZ, dentro de cada tratamento.

Letras maiúsculas mostram variações significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos, para cada região do SPTZ.

Figura 9: Comparações quantitativas da intensidade de ligação da osteopontina (OPN) a regiões específicas da membrana (acrossomo intacto) de espermatozoides bovinos ejaculados e após contato com os fluidos do oviduto.

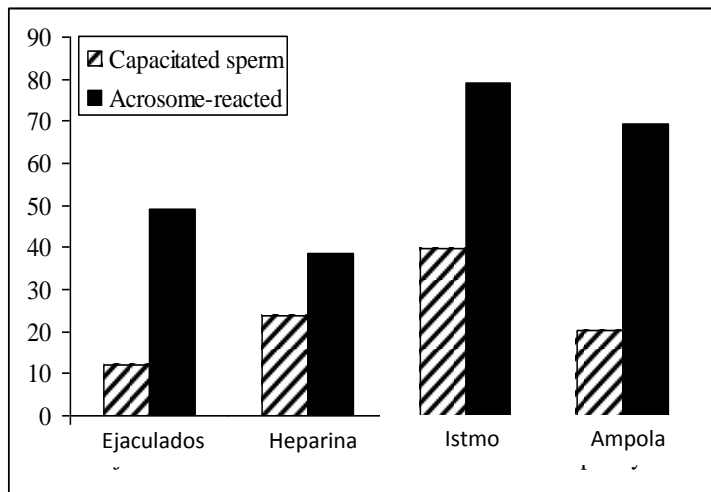


Figura 10: Percentagem de espermatozoides ejaculados capacitados e com acrossomo reagido após incubação com heparina e fluidos do istmo e ampola do oviduto.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Este estudo mostra informações detalhadas sobre a topografia das proteínas BSP-A1/A2, BSP-30kDa e osteopontina a espermatozoides ejaculados bovinos e após contato com os fluidos do istmo e ampola do oviduto. Uma vez que nenhum dos anticorpos contra essas proteínas mostrou reação detectável em espermatozoides epididimários (dados não mostrados), parece claro que estas proteínas originam-se do fluido das glândulas sexuais acessórias, e se ligam aos espermatozoides durante a ejaculação. De fato, tanto as BSPs quanto a OPN já foram identificadas em mapas protéicos oriundos do fluido das glândulas acessórias de touros (MOURA et al., 2007a), mas não em amostras de fluido oriundo da cauda do epidídimo (MOURA et al., 2006b). MANJUNATH et al. (1994) descreveram uma leve reatividade para a BSP-30kDa em espermatozoides oriundos da cauda do epidídimo bovino mas, mesmo utilizando concentrações de anticorpos 50% maiores que as descritas nesse trabalho, tal resultado não foi confirmado no presente estudo.

A associação das BSPs com a membrana da cabeça espermática está em consonância com o modelo proposto de que as BSPs contribuem com a remoção de colesterol e fosfolípidos da membrana espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). De acordo com este modelo, as BSPs permaneceriam ligadas à membrana dos espermatozoides desde a ejaculação, ao longo do trajeto no trato reprodutivo feminino. Ao chegarem ao oviduto, os espermatozoides ligados às BSPs interagem com o HDL presente no fluido, desencadeando uma segunda remoção de colesterol e fosfolípidos da membrana, evento essencial para o processo de capacitação espermática. Achados recentes mostram ainda que as BSPs também



atuam na interação dos espermatozóides com o epitélio do oviduto, facilitando a preservação da motilidade e viabilidade espermática durante armazenamento temporário naquele órgão (GWATHMEY et al., 2006).

O modelo proposto para a atuação das BSPs pressupõe que elas permanecem ligadas aos espermatozóides desde a ejaculação até atingir o oviduto no trato reprodutivo feminino. Os resultados sobre as ligações das BSPs com a membrana espermática, desde a ejaculação até a exposição aos fluidos do oviduto fornece as primeiras evidências experimentais apoiando esta hipótese, apesar de algumas mudanças na intensidade da ligação terem sido observadas. Naquelas células sem o acrossomo intacto, as intensidades da fluorescência para a BSP-A1/A2 e BSP-30kDa foram reduzidas significativamente na região acrossômica por ocasião da exposição ao IODF e AODF. Estas mudanças podem ser resultado da fusão entre as membranas do acrossomo, parte da reação acrossômica, ou mesmo produto de reestruturação na membrana espermática, devido a mudanças nas proporções de colesterol e fosfolipídeos na membrana espermática, os quais são, em parte, modulados pelas próprias BSPs.

Os fluidos do oviduto têm a capacidade de induzir a reação acrossômica *in vitro* em espermatozóides bovinos capacitados (KILLIAN, 2004). Além disso, o ODF é rico em apolipoproteína A1 e lipoproteínas de alta densidade (HDL) as quais interagem com fosfolipídeos e BSPs na membrana espermática, também modificando sua composição (THÉRIEN et al., 1997; MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Adicionalmente, a albumina compõe mais de 85% de todas as proteínas presentes nos fluidos do istmo e da ampola, independente da fase do ciclo estral (SOUZA et al., 2007). Sabe-se que, entre outras funções, a albumina

pode atuar no efluxo de colesterol da membrana plasmática e atuar no processo de capacitação espermática (SINGLETON e KILLIAN, 1983; GO e WOLF, 1985; VISCONTI e KOPF, 1998). Sugere-se, portanto, que o oviduto propicia um ambiente favorável a modificações na membrana espermática dos espermatozóides, as quais promovem alterações na topografia da intensidade de ligação das BSPs com a região acrossômica das células.

A fluorescência para as BSPs na peça intermediária dos espermatozóides apresentou uma intensidade muito maior do que nas demais regiões da célula, independente dos tratamentos a que foram submetidos. Uma forte imunoreação de anticorpos anti-BSP-A1/A2 (PDC-109) na peça intermediária já havia sido relatada anteriormente em espermatozóides bovinos ejaculados (AUMULLER et al., 1988), mas a explicação para estes resultados ainda é meramente hipotética. Estes autores sugerem, por exemplo, que a localização dessas BSPs em uma região rica em mitocôndrias poderiam indicar que essas proteínas poderiam afetar a motilidade espermática. Apesar de receptores protéicos para as BSPs não terem sido identificados até o momento, ficou demonstrado que a BSP-A1/A2 estimula ou mantém a motilidade espermática e a atividade de ATPases ligadas à membrana (GWATHMEY et al., 2003; SANCHEZ-LUENGO et al., 2004). A conexão funcional entre a ligação das BSPs à peça intermediária e a estimulação da atividade mitocondrial e motilidade espermática sugere múltiplas funções para as BSPs na preparação dos espermatozóides para a fertilização. Apesar de não ter sido testado nesse trabalho, é possível que as BSPs atuem ou mediem a hiperomotilidade espermática, como parte do processo de capacitação.

No presente estudo, detectou-se um aumento inexplicado na ligação da BSP-A1/A2 à peça intermediária dos espermatozóides após exposição aos fluidos do oviduto. Baseando-se

em achados anteriores (KILLIAN, 2004) e na análise de mapas protéicos de ODF por eletroforese 2D e espectrometria de massa (MOURA et al., 2006; SOUZA et al., 2007), não há evidência de que as BSPs sejam expressas nos fluidos do istmo ou da ampola. Uma razão plausível para este aumento seria que componentes do ODF mediarium uma remodelagem da membrana espermática, estimulando a ligação das BSPs na membrana da peça intermediária. Alternativamente, componentes do ODF poderiam remover ou modificar outras proteínas superficiais na membrana espermática e alterar a detecção da fluorescência produzida pelo FITC.

A ligação da osteopontina aos espermatozoides ejaculados restringiu-se à extremidade do acrossomo e a região pós-equatorial. Foi observado um aumento na fluorescência deste último segmento após exposição aos fluidos do istmo e da ampola. Nas células com alterações acrossômicas, houve redução notória na ligação da osteopontina após contato com as secreções do oviduto. Estas observações são interessantes e inéditas, mas podem ser explicadas, pelo menos em parte, pelo fato das secreções do oviduto conterem OPN (GABLER et al., 2003). A osteopontina presente no oviduto pode ligar-se aos espermatozoides e contribuir para o aumento na fluorescência observado na região pós-equatorial. Contudo, nas células onde a imunoreatividade acrossômica caiu 4,9 e 3,1 vezes após incubação nos fluidos do istmo e da ampola, respectivamente, é improvável que mais OPN oriunda do ODF ligue-se à membrana espermática. O aparente declínio na ligação da OPN na região acrossômica nessas células provavelmente deve-se à fusão e remodelamento de membranas que ocorre durante a reação acrossômica. Apesar de aumentos concomitantes no número de espermatozoides capacitados e com acrossomo reagido (em resposta ao LPC)

terem ocorrido após exposição ao ODF, a hipótese de que a perda parcial da OPN acrossômica é consequência do remodelamento de membrana ainda necessita de confirmação experimental. Mesmo assim, parece que os espermatozoides atingem o local de fertilização com a OPN firmemente ligada à região pós-equatorial, mas com níveis variáveis de ligação na região acrossômica. Entretanto, é necessário determinar se essas diferentes subpopulações espermáticas têm capacidades distintas de fertilização. Além do mais, a ligação da OPN à região central da célula espermática é de grande relevância, dado que a fusão de membranas entre os gametas durante a fertilização ocorre justamente em segmentos próximos à região equatorial do espermatozoide (GADDUM-ROSSE, 1985).

A osteopontina é uma molécula multifuncional, tipicamente envolvida nos processos de adesão celular e remodelamento de tecidos (LIAW et al., 1998; MAZZALI et al., 2002; DENHARDT, 2004; WAI e KUO, 2004). Apesar da disponibilidade de uma quantidade substancial de informações sobre a atuação da osteopontina em diversos tecidos, pouco se conhece sobre o papel dessa proteína no trato reprodutivo masculino. Baseando-se nas características gerais da OPN e em resultados de pesquisas conduzidas especificamente sobre a fisiologia reprodutiva, sugere-se que a osteopontina media a interação espermatozoide-oócito durante a fertilização (MOURA, 2005; MOURA et al., 2007a). Os resultados desse trabalho, juntamente com a literatura publicada, apóiam essa hipótese e permitem uma melhor compreensão das ações da osteopontina (figura 11). Além de ligar-se à membrana espermática, a OPN também se liga à zona pelúcida e à membrana do oócito bovino (figura 12).

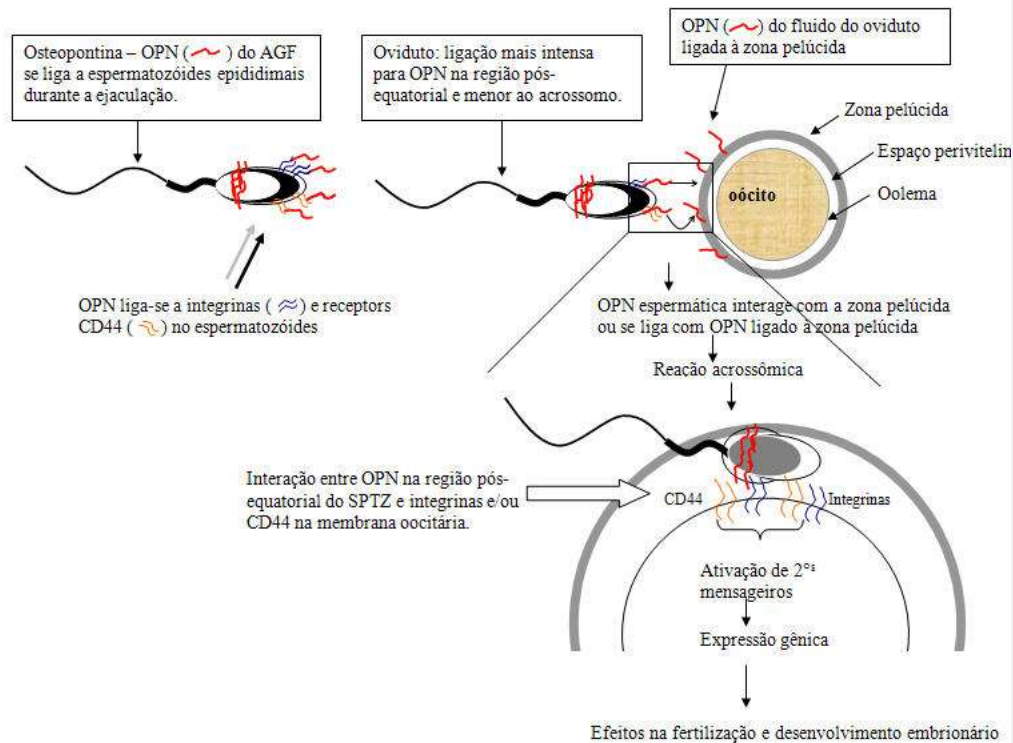


Figura 11: Mecanismo proposto pelo qual a osteopontina (OPN) interage com os gametas. A OPN se liga aos espermatozoides (SPTZ) durante a ejaculação, possivelmente através das integrinas ou CD44, permanecendo ligada até que estas células atinjam o local da fertilização. Contato com as secreções do oviduto reduzem a ligação da OPN no acrossomo de alguns SPTZ. A OPN ligada à membrana espermática vai interagir com a zona pelúcida, e, estando no espaço perivitelino, com a membrana do oócito. Esta última etapa envolve a OPN ligada à região central dos SPTZ, uma região tipicamente envolvida no processo de fusão de membranas. Estes eventos iniciariam cascatas de transdução de sinais, explicando os efeitos benéficos da OPN sobre o desenvolvimento embrionário.

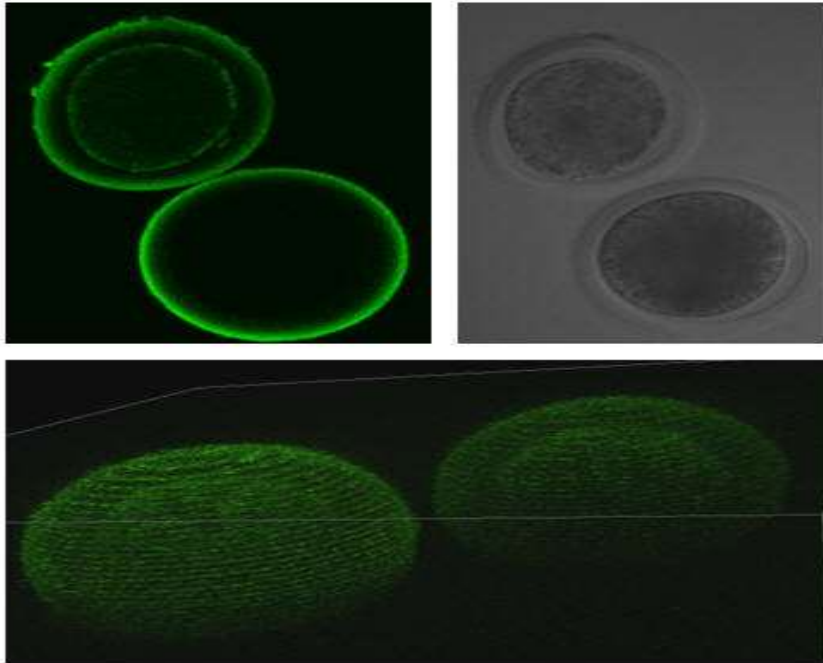


Figura 12: Detecção por imunofluorescência e microscopia confocal da osteopontina (OPN) na membrana de oócitos bovinos pré-incubados com fluidos do oviduto bovino, que contém OPN (GABLER et al., 2003). Os oócitos foram maturados *in vitro* e tiveram as células do *cumulus* removidas (HASLER et al., 1995; GONÇALVES et al., 2006). Após o cultivo, as células foram lavadas em TL-HEPES e incubadas com anti-OPN bovina (100 µg/ml), o mesmo anticorpo utilizado na imunocitoquímica espermática, por 60 min. (39°C, 5%CO<sub>2</sub>). Os oócitos foram novamente lavados, e incubados com anticorpo secundário conjugado a FITC (1:300) por 30 minutos, novamente lavados, e observados microscopicamente.

A partir desses resultados, propõe-se que a OPN adere ao espermatozóide e este conjunto liga-se diretamente à zona pelúcida ou a outras moléculas de osteopontina, uma vez que esta proteína é capaz de se ligar fortemente a outras moléculas de OPN com alta afinidade (KAARTINEN et al., 1999; GOLDSMITH et al., 2002). Após penetrar no espaço perivitelino, a osteopontina ligada à região pós-equatorial media a ligação entre as

membranas dos gametas, seja através de integrinas ou CD44. A hipótese de que a OPN se liga a espermatozoides e oócitos através destes receptores baseia-se no fato de integrinas  $\alpha_v$  e  $\alpha_5$  foram detectadas tanto na membrana espermática em bovinos (ERIKSON e KILLIAN, dados não publicados) e humanos (FUSI et al., 1996; REDDY et al., 2003), quanto em oócitos (D'CRUZ, 1996). Glicoproteínas CD44 também estão presentes na membrana espermática (BAINS et al., 2002) e oocitária (SCHOENFELDER e EINSPIANIER, 2003), e a osteopontina interage com integrinas e CD44 em diversos outros tipos de células (MAZZALI et al., 2002; RANGASWAMI et al., 2006). A ligação entre a OPN e integrinas/CD44 deve iniciar uma cascata de reações de sinalização intracelular, assim como ocorre em outros tipos celulares (WAI e KUO, 2004; RANGASWAMI et al., 2006), influenciando o resultado da fertilização, e desenvolvimento embrionário inicial.

A importância da osteopontina nos processos reprodutivos também foi demonstrada em experimentos com fertilização *in vitro*. Estudos realizados demonstraram que a percentagem de oócitos bovinos fertilizados ( $88,6 \pm 3,0\%$ ) foi significativamente reduzida ( $28,7 \pm 3,2\%$ ) pela adição de anticorpos anti-OPN ao meio de fertilização (GONÇALVES et al., 2006a). Além disso, tratamento dos oócitos com ODF obtido na fase não luteal do ciclo estral ou com anticorpos anti-OPN diminuiu a percentagem de blastocistos (no dia 8) e blastocistos eclodidos (dia 11) de  $22 \pm 1\%$  e  $10,5 \pm 0,5\%$  para  $8 \pm 1\%$  e  $3 \pm 0,5\%$ , respectivamente (GONÇALVES e KILLIAN, dados não publicados). A seqüência de aminoácidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) na molécula da osteopontina media sua ligação às integrinas  $\alpha_v$  e  $\alpha_5$  (DENHARDT et al., 2001; WAI e KUO, 2004) e quando esta seqüência RGD sofre mutação (LIAW et al., 1995; XUAN et al., 1995) a

capacidade da OPN de mediar a adesão intercelular é neutralizada. Tratamento de espermatozoides ou oócitos com um peptídeo contendo RGD, mas não com a seqüência RGE (arginina-glicina-ácido glutâmico), ou com anticorpos anti-integrinas  $\alpha_v$  ou  $\alpha_5$ , reduz o número de espermatozoides ligados à zona pelúcida e as taxas de fertilização, produzindo resultados semelhantes àqueles obtidos pela adição de anticorpos anti-OPN. Resultados envolvendo a seqüência RGD ou anticorpos anti-integrinas (GONÇALVES et al., 2007) apóiam a hipótese de que a osteopontina interage com os espermatozoides através das integrinas, apesar de mais evidências experimentais serem necessárias para comprovar esta hipótese.

A incubação de oócitos com OPN purificada do leite desnatado bovino promove aumentos nas taxas de clivagem (de  $78,1 \pm 1,3\%$  para  $85,8 \pm 1,4\%$ ), de desenvolvimento de blastocistos no dia 8 ( $24,2 \pm 1,2\%$  para  $33,8 \pm 1,4\%$ ) e blastocistos eclodidos no dia 11 ( $10,6 \pm 1,6\%$  para  $18,5 \pm 1,4\%$ ; GONÇALVES et al., 2003). Seguindo esta mesma linha de pesquisa, HAO et al. (2006) mostraram que o tratamento do meio de fertilização com OPN recombinante (de ratos) melhorou as taxas de fertilização de oócitos suínos em 41%. Além do mais, sêmen bovino congelado com diferentes concentrações de osteopontina produziu melhores taxas de fertilização *in vitro* (78 a 85% X 69 a 75%) e desenvolvimento de blastocistos no dia 8 (37 a 45% versus 29 a 33%) em comparação com sêmen não adicionado de OPN (GONÇALVES et al., 2006).

Em resumo, desde que as associações empíricas entre a OPN, as BSPs e a fertilidade masculina foram inicialmente descritas (KILLIAN et al., 1993; CANCEL et al., 1997; MOURA et al., 2006; 2007b), tem-se obtido uma melhor compreensão sobre seus



mecanismos de ação, especialmente no caso da osteopontina. As funções tanto das BSPs quanto da OPN nos gametas baseiam-se em interações específicas com moléculas na membrana e estas interações modificam-se em resposta à exposição aos fluidos do oviduto. A ligação das BSPs à membrana espermática modula alterações no conteúdo de colesterol e fosfolídeos, contato dessas células com o epitélio do oviduto e possivelmente a motilidade espermática. O modelo proposto para a atuação da OPN sugere que esta proteína media a interação espermatozóide-ócito, influenciando a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Estudos que objetivam elucidar como proteínas associadas à fertilidade interagem e modulam a função dos gametas são de importância fundamental para viabilizar sua utilização como marcadores da fertilidade masculina.

## **5. ESTUDO 3: ANÁLISE PROTEÔMICA DO FLUIDO DA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE TOUROS HOLANDÊS ADULTOS**

### **5.1. INTRODUÇÃO**

Os espermatozoides formados no testículo irão sofrer um processo de maturação ao longo do trânsito epididimal. Esta maturação compreende uma série de eventos que inclui alterações na estrutura da membrana plasmática, alterações nas proteínas superficiais, modelação do cito-esqueleto, entre outras (OLSON et al., 2003; GATTI et al., 2004; SULLIVAN et al., 2005). O processo de maturação confere ao espermatozoide a motilidade, e a capacidade de se ligar aos oócitos. Ao final do trânsito epididimal, os espermatozoides permanecem armazenados na cauda do epidídimo, em um estado de metabolismo reduzido, por um período variável de tempo.

Sabe-se ainda que a secreção protéica ao longo do epidídimo varia de acordo com a região (DACHEUX et al., 2005), e que é coincidente com a fase de maturação espermática. Baseando-se em estudos conduzidos com inúmeras espécies, a atividade secretória parece ser mais intensa nas regiões anteriores (DACHEUX et al., 2003), sugerindo uma relação mais intensa com a maturação espermática. Contudo, é na cauda do epidídimo, onde os espermatozoides ficam num estado latente, que existem importantes mecanismos que previnem a

capacitação precoce, o estresse oxidativo, além de proteger as células espermáticas do sistema imunológico (HINTON et al., 1995).

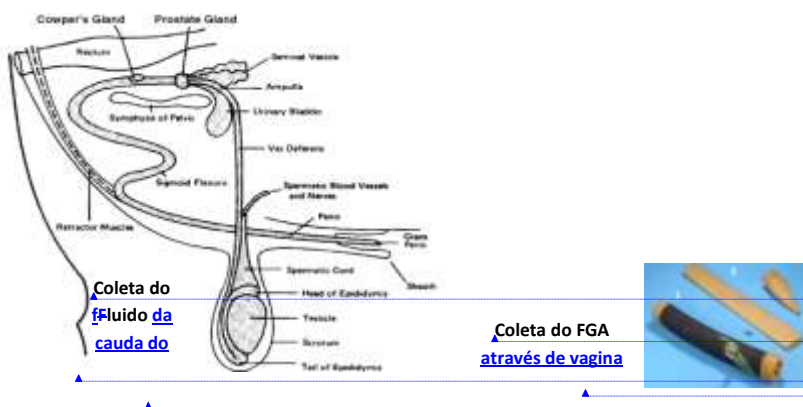
Já está bem estabelecido que proteínas presentes no plasma seminal estejam associadas à fertilidade de touros Holandeses (KILLIAN et al., 1993). Duas dessas proteínas foram identificadas como sendo a osteopontina (OPN; CANCEL et al., 1997) e a prostaglandina D sintetase (PGDS; GERENA et al., 1998). Mais recentemente, demonstrou-se que proteínas presentes em outros fluidos do trato reprodutivo masculino, como o fluido das glândulas sexuais acessórias (AGF; MOURA et al., 2007a) ou o fluido da cauda do epidídimo (CEF; MOURA et al., 2006) também são indicadores da fertilidade em bovinos. A composição protéica do plasma seminal (KILLIAN et al., 1993; DESNOYERS et al., 1994; KELLY et al., 2006) e do fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2006c) já é bem conhecida, contudo, apenas as principais proteínas do CEF foram identificadas. Além disso, a identificação detalhada de componentes do fluido da cauda do epidídimo é um passo importante no sentido de se compreender de que forma se dá a regulação da função espermática no epidídimo. Portanto, nosso objetivo foi utilizar uma abordagem proteômica para identificar detalhadamente as proteínas presentes no fluido epididimal de touros sexualmente maduros.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram obtidas amostras de fluido da cauda do epidídimo (CEF) de 11 touros Holandês maduros, canulados nos ductos deferentes (figura 1). Com isso, foi possível a coleta de CEF de animais vivos, antes que ele se misturasse com as secreções das glândulas sexuais acessórias (AGF). Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas (1000 g, 15 min.) para separação dos espermatozoides, aliqüotadas e congeladas em nitrogênio líquido. Estas amostras foram utilizadas para a preparação de mapas protéicos, através de eletroforese 2D, os quais foram analisados pelo software PDQuest, sendo os *spots* identificados por espectrometria de massa. Esta primeira análise do CEF mostrou que cerca de 21% da intensidade de todos os *spots* dos géis era composta por albumina, prejudicando a identificação de proteínas menos abundantes.

Figura 1: Esquema mostrando a coleta de fluido da cauda do epidídimo (CEF) em touros cateterizados nos ductos deferentes, adaptado de HENAULT et al. (1995).



Formatted: Portuguese (Brazil)

Formatted: Portuguese (Brazil)

Formatted: Portuguese (Brazil)

Formatted: Portuguese (Brazil)

Formatted: Portuguese (Brazil)

Para contornar esse obstáculo, a albumina foi parcialmente removida das amostras utilizando-se cromatografia de afinidade. Em seguida, essas novas amostras (depletadas) foram utilizadas para a preparação de novos mapas bidimensionais, novamente sujeitos à análise computadorizada. Os *spots* detectados nesses novos géis, não identificados nos mapas anteriores foram também sujeitos a espectrometria de massa.

### **5.2.2. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL**

Para preparação dos mapas protéicos, as amostras de CEF foram descongeladas a temperatura ambiente, e centrifugadas (10.000 *g*, 60 min., 4°C) para a remoção de restos e debris celulares. Do sobrenadante, determinou-se a concentração protéica, de acordo com a técnica descrita por LOWRY (1951), usando-se albumina sérica bovina como padrão. Um volume de CEF contendo 500 µg de proteínas foi misturado a um volume de tampão de focalização (5 ml β-mercaptoetanol, 57,1 g uréia, 20 ml NP-40 (10%), 5 ml anfólitos na mesma faixa de pH dos géis, para um volume de 100 ml) suficiente para atingir 100 µl. Esta mistura foi adicionada ao topo de géis de focalização de 13 cm em tubos de vidro, com faixa de pH variando de 3 a 7,6, por um período de aproximadamente 20 horas. A focalização foi feita segundo o programa: 200V (15 min.), 300V (30 min.), 400V (30 min.), 375V (16 a 18h), e 800V (60 min.), totalizando cerca de 7.600 Vh.

Após a focalização, os géis foram removidos dos tubos e as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), com gradiente de 10,5 a 17% por cerca

de 8 horas, com marcadores moleculares variando de 14 a 66 kDa (Sigma Chemical Co., USA). Após a corrida, os géis foram corados em Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250, descorados (40% metanol, 10% ácido acético em ddH<sub>2</sub>O) e digitalizados em um densitômetro GS800 (Bio-Rad Laboratories, USA). As imagens desses géis (não-depletados) foram salvos no formato *.tiff*, e analisadas pelo aplicativo PDQuest, v. 7.3 (Bio-Rad Laboratories, USA). Apesar de ter sido possível a detecção de inúmeros *spots* protéicos, aquele correspondente à albumina constituía cerca de 21% do total de proteínas do fluido da cauda do epidídimo, dificultando, com isso, a localização de proteínas menos abundantes.

### 5.2.3. DEPLEÇÃO DA ALBUMINA

Para contornar essa limitação, nós decidimos pela depleção da albumina das amostras de CEF dos 11 touros utilizados na primeira fase. A depleção consistiu na utilização de colunas de cromatografia de afinidade contendo matriz à base de Cibacron F3GA (Aurum Serum Protein Kit, Bio-Rad Laboratories, USA). Amostras de CEF contendo 5mg de proteínas foram diluídas (1:3) em um tampão de ligação de proteínas fornecido com o kit. As colunas foram equilibradas com o mesmo tampão (5 min.), e centrifugadas (10.000 *g*, 20 seg.), para secar a matriz. As amostras foram colocadas no topo da resina, as colunas foram agitadas imediatamente, e após 5 e 10 min., para facilitar a interação entre

as proteínas e a matriz. As colunas ficaram em repouso por mais 5 min., totalizando 15 minutos de incubação.

As colunas foram centrifugadas (10.000 *g*, 20 seg.), obtendo-se a fração não ligada à matriz (pobre em albumina). Desta fração, determinou-se a concentração protéica (LOWRY, 1951) e foram preparados novos mapas protéicos, conforme descrito acima. Os mapas produzidos antes e após a depleção da albumina utilizando-se o PDQuest. Em ambos os grupos, após a digitalização dos géis, os *spots* foram cortados dos géis e identificados por espectrometria de massa.

#### 5.2.4. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DAS IMAGENS

A análise dos mapas protéicos do CEF foi feita conforme descrito no capítulo 1. Foram preparados *match sets* utilizando as imagens dos géis preparados antes e após a depleção da albumina. Dessa forma, um gel principal foi construído representando todos os *spots*, detectados em todos os géis. Conforme descrito (MOURA et al., 2007a), proteínas presentes em regiões chave dos géis foram utilizados como marcos de orientação para se associar os *spots* nos diferentes géis, de modo que cada *spot*, em cada gel, esteja representado no gel principal. A quantificação das proteínas nos géis foi dada como dada como PPM da densidade óptica total integrada de todas as proteínas.

## 5.2.5. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

### 5.2.5.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA (Q-ToF) – ANTES DA DEPLEÇÃO

Os *spots* foram cortados dos géis da primeira fase do estudo (não depletados), digeridos com tripsina (KOC et al., 2001), lavados (3X) em bicarbonato de amônia (100 µl; 25 mM), desidratados em acetonitrila (100 µl; 50% v/v) e secados à vácuo (SpeedVac, Savant Inc., USA). Em seguida, foram incubados com tripsina (37°C; 12,5 ng/µl em bicarbonato de amônia 25 mM) para digestão dos peptídeos. Estes peptídeos foram extraídos (2X) em ácido fórmico (25 µl; 5% v/v) por 20 minutos, secados a vácuo, e re-suspensos em acetonitrila (10 µl; 5% v/v, contendo 0,1% de ácido fórmico). Os fragmentos da digestão foram analisados por cromatografia líquida capilar (Waters CapLC HPLC, Waters Corp., USA) associado a um espectrômetro de massa Micromass Q-ToF API US (ABBAS et al., 2005; MOURA et al., 2007b).

Os fragmentos proteolíticos (1 a 5 µl) foram injetados em solvente A (acetonitrila/água/ácido fórmico 1:95:0,1) por meio de uma bomba auxiliar da unidade de HPLC em uma coluna C-18 (Waters Symmetry 300, filme de 5 µm, 0,3 X 5 mm) para dessalinização e pré-concentração das amostras. Após lavagem por 3 minutos em solvente A (20 µl/min.) os peptídeos foram injetados na coluna analítica (C-18, filme de 5µm, 0.075 x 150 mm), usando uma válvula de 10 portas. A cromatografia na coluna analítica foi corrida em um gradiente (5 a 42%) de solvente B (acetonitrila/água/ácido fórmico 95/5/0,2) por 44 minutos. O



espectrômetro de massa foi calibrado utilizando-se fragmentos iônicos de um produto Glu-Fib, de modo a se manter a acurácia em 10 ppm. O espectrômetro Q-ToF foi ajustado para obter MS/MS de fragmentos trípticos em modo dado-dependente para seleção do íon precursor utilizando reconhecimento do estado de carga e limite de intensidade como critérios seletivos, utilizando o programa MassLynx v.4 SP1.

De modo a se obter os dados dos íons, foram realizadas varreduras (2 seg.) no espectro  $m/z$ . De cada varredura, até 4 dos íons mais intensos, com base nos critérios descritos acima foram selecionados para obtenção dos espectros de massa resultantes da dissociação, através de colisão na presença de argônio. Os espectros obtidos (6 a 8 seg.) foram analisados utilizando-se o ProteinLynx Global Server v.2.1, e convertidos em listas de picos em arquivos de texto para busca em bancos de dados. Visando identificar as proteínas, as listas de picos foram submetidas à base de dados NCBI nr, usando a ferramenta de busca MASCOT (Matrix Science Inc., USA). Como critérios de buscas, assumiram-se que havia apenas uma clivagem perdida, que os peptídeos eram mono-isotópicos, que os resíduos de metionina estavam oxidados e que os resíduos de cisteína estavam carbamidometilados. A tolerância para a massa dos peptídeos e fragmentos foi ajustada para 1,2 e 0,6 Da, respectivamente.

#### 5.2.5.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-ToF-ToF) – APÓS A DEPLEÇÃO

As amostras de CEF depletadas foram secadas completamente à vácuo (SpeedVac) e re-suspensas em água destilada/deionizada (ddH<sub>2</sub>O). Este procedimento foi repetido, e na terceira secagem, as amostras foram reduzidas a um volume de cerca de 10 µl. Adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA; 1%) em um volume suficiente para que a concentração final na amostra fosse de 0,1% (v/v). Ponteiros contendo uma matriz de troca iônica, para dessalinização e concentração das amostras (SCX ziptips, Millipore Inc., USA) foram umedecidas em TFA 0,1%, e as amostras foram ligadas à matriz, lavadas e eluídas, de acordo com as instruções do fabricante. Na última etapa de eluição, 3 µl de tampão de eluição foram pipetados para cima e para baixo, umedecendo a matriz, sem descartar a gota, permitindo a evaporação de um pequeno volume. O restante da gota foi depositado diretamente sobre as placas de MALDI e, após secar completamente, cada *spot* foi coberto com 0,6 µl de matriz de MALDI até a secagem completa (5 mg/ml de ácido alfa-cianohidroxícinnâmico (CHCA); 2 mg/ml fosfato de amônia; 0,1% TFA em acetonitrila (50%)). Em seguida as amostras foram aplicadas em um espectrômetro de massa ABI 4700 Proteomics Analyzer MALDI-ToF-ToF. As placas foram calibradas (6 *spots* de calibração/placa) e 1000 disparos de laser, em 40 regiões da placa, foram obtidos por *spot*, em modo reflectron, de íons positivos. A análise foi feita selecionando-se os 10 maiores picos de cada espectro MS (excluindo os picos de autodigestão da tripsina) para análise MS/MS utilizando fragmentação induzida por colisão (CID). Os espectros MS/MS foram obtidos utilizando-se uma potência do laser de 3550, com CID gasosa (em ar), em

pressão entre 2,2 e  $2,5 \times 10^{-7}$  torr. Entre 2500 e 5000 tiros de laser foram dados para aquisição dos espectros MS/MS, obtendo-se pelo menos 5 picos.

Os espectros MS e MS/MS foram utilizados para busca de combinações com espectros teóricos de mamíferos, no banco de dados do NCBI, utilizando uma instalação local dos algoritmos Mascot (v. 2.0, Matrix Science, USA), com uma tolerância máxima de 200 ppm de massa em modo MS, e 0,4 Da em modo MS/MS, com modificações fixas carbamidometilação de cisteínas (C), e alterações variáveis de desamidação de asparagina ou glutamina (N,Q), N-acetilação de extremidades amino-terminais, oxidação de metioninas (M), e formação de piroglutamato da extremidade N-terminal da glutamina (Q). A identificação foi feita tanto pelos escores dos picos da impressão de massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprinting*), como pelos escores iônicos individuais nos espectros MS/MS ( $p < 0,05$ ) de acordo com o algoritmo probabilístico do Mascot, e avaliação individual das identificações.

### 5.3. RESULTADOS

No gel principal, construído pelo PDQuest a partir do grupo de 11 géis do fluido da cauda do epidídimo (CEF) antes da depleção da albumina (figura 2), foram detectados 114  $\pm$  3 *spots*, dos quais foram identificados 55, representando 23 proteínas. Com base na densidade óptica integrada dos *spots*, as proteínas mais abundantes no CEF foram albumina (21,1%), proteínas ligadoras de colesterol (6 isoformas de baixa massa molecular; 10,5%), prostaglandina D sintetase (PGDS; 7,6%), e *gelsolina* (6%), totalizando quase a metade (45,2%) do total de proteínas. Outros 36 *spots* também foram identificados, correspondendo a 13 diferentes proteínas (tabela 1).

Figura 2: Mapa protéico de fluido da cauda do epidídimo bovino, produzidos com uso de eletroforese 2D e espectrometria de massa. O mapa foi construído a partir de amostras de CEF de 11 touros.

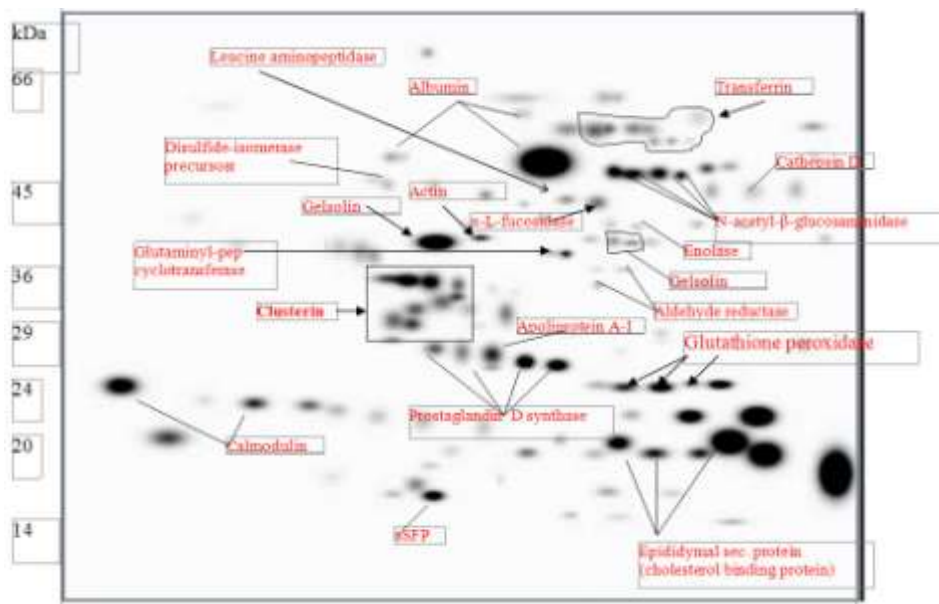


Tabela 1: Proteínas identificadas no fluido da cauda do epidídimo de touros Holandês utilizando eletroforese 2D e cromatografia capilar líquida/espectrometria de massa (CapLC-MS/MS).

Proteína	spot no gel principal	Massa molecular (kDa)/Ponto isoelétrico (pI)		Código <i>gi</i>	Escore MS/MS	Seqüência coberta (%)	Peptídeos coincidentes
		Teórico	Experimental				
Catepsina D	9704	43,5/6,8	57,0/7,0	2687645	61	5	AGCEAIVDTGTSLIVGFVEEVR
Prostaglandina D sintetase	3402	21,4/6,4	27,0/5,8	27807521	103	11	EHFTTFAK; SLGFTEEGIVFLPK
	4401	21,4/6,2	26,0/6,0	3914330	53	7	SLGFTEEGIVFLPK
	5401	21,4/6,4	25,0/6,2	27807521	193	17	MATLYSR; AEVKEHFTTFAK; EHFTTFAK; SLGFTEEGIVFLPK
	5301	21,4/6,4	24,0/6,3	27807521	270	37	WFSTGLASNSSWFLEK; SVVAPAADGGLNLTSTFLR; MATLYSR; AEVKEHFTTFAK; EHFTTFAK; SLGFTEEGIVFLPK; SLGFTEEGIVFLPKTDK
Apolipoproteína A1	4401	28,4/5,6	26,0/6,0	245563	318	43	DFATVYVEAIK; DYVAQFEASALGK; LLDNWDTLASTLSK; EQLGPVTQEFWDNLEK; VQPYLDEFQK; LSPLAQELR; QQLAPYSDDLK; QGLLPVLESK; VSILAAIDEASK
Transferrina	6901	79,9/6,8	75,0/6,4	29135265	193	11	YGYTGAFR; ELPDPQESIQR TYDSYLGDDYVR; TAGWNIPMGLLYSK; DKPDNFQLFQSPHGK

6902	79,9/6,8	75,0/6,5	29135265	316	16	YYGYTGAFR; ELPDPQESIQR; TSDANINWNNLK; TYDSYLGDDYVR; TAGWNIPMGLLYSK
6903	79,9/6,8	75,0/6,6	29135265	350	16	YYGYTGAFR; ELPDPQESIQR; TSDANINWNNLK; TYDSYLGDDYVR; TAGWNIPMGLLYSK
7901	79,9/6,8	79,0/6,8	29135265	340	17	YYGYTGAFR; ELPDPQESIQR; TSDANINWNNLK; TYDSYLGDDYVR; TAGWNIPMGLLYSK; DNPQTTHYYAVAVVK; HSTVFDNLPNPEDR; GEADAMSLDGGYLYIAGK; TVGGKEDVIWELLNHAQEHFGK
7802	79,9/6,8	71,0/6,7	29135265	102	6	GPNHAVVSR; YYGYTGAFR; ELPDPQESIQR; DQTVIQNTDGNNNEAWAK
8801	79,9/6,8	71,0/6,8	29135265	237	13	GPNHAVVSR; YYGYTGAFR; ELPDPQESIQR; TSDANINWNNLK; HSTVFDNLPNPEDR; GEADAMSLDGGYLYIAGK; DQTVIQNTDGNNNEAWAK; IMKGEADAMSLDGGYLYIAGK

Proteína	spot no gel principal	Massa molecular (kDa)/Ponto isoelétrico (pI)		Código <i>gi</i>	Score MS/MS	Seqüência coberta (%)	Peptídeos coincidentes
		Teórico	Experimental				

N-acetil- $\beta$ - glicosaminidase	6803	44,7/6,4	62,0/6,5	76646152	225	24	<b>GSYSLSHVYTPNDVR</b> ; VLPEFDSPGHTESWGK; QYYSVKPLNFAGTPEQK; KLQSFYMQMVLDMISTMK; FNVLHWHIVDDQSFYQSI SFPELSNK
	7701	44,7/6,4	62,0/6,6	76646152	412	30	<b>GSYSLSHVYTPNDVR</b> ; VLPEFDSPGHTESWGK; QYYSVKPLNFAGTPEQK; KLQSFYMQMVLDMISTMK; SIVWQEVYDDEGKLLPGTVVQVWK; FNVLHWHIVDDQSFYQSI SFPELSNK
	7702	44,7/6,4	62,0/6,7	76646152	270	18	<b>GSYSLSHVYTPNDVR</b> ; VLPEFDSPGHTESWGK; QYYSVKPLNFAGTPEQK; SIVWQEVYDDEGKLLPGTVVQVWK
	8701	44,7/6,4	61,0/6,8	76646152	471	29	<b>TVIEYAR</b> ; TLDAMAFNK; LLPGTVVQVWK; SIVWQEVYDDEGK; GSYSLSHVYTPNDVR; VLPEFDSPGHTESWGK; QYYSVKPLNFAGTPEQK; FNVLHWHIVDDQSFYQSI SFPELSNK
Cauxina	6803	68,6/6,2	62,0/6,5	76625606	370	12	<b>FVFGGAFK</b> ; GLPLWPAYR; AIMESGVAIIPYLK; GNIVMFEEATEEEK; LGIFGFFNTGDEHAR; VVDGLFFPNEPLDLLAQK
	7701	69,1/6,2	62,0/6,6	76625606	273	8	<b>GLPLWPAYR</b> ; AIMESGVAIIPYLK; GNIVMFEEATEEEK; LGIFGFFNTGDEHAR
	7702	69,1/6,2	61,4/6,6	76625606	193	9	<b>AIMESGVAIIPYLK</b> ; GNIVMFEEATEEEK; LGIFGFFNTGDEHAR; VVDGLFFPNEPLDLLAQK
	8701	69,1/6,2	60,9/6,7	76625606	202	9	<b>AIMESGVAIIPYLK</b> ; GNIVMFEEATEEEK;

							LGIFGFFNTGDEHAR; VVDGLFFPNEPLDLLAQK
	9902	69,1/6,2	70,4/7,2	76625606	107	7	AIMESGVAIIPYLK; GNIVMFEEATEEEK; VVDGLFFPNEPLDLLAQK
Glicoproteína $\alpha$ -1- $\beta$	2801	54,1/5,3	65,0/5,5	76668190	230	15	FPLGPNVTSTTR; SLLSESDPVVELR; LEGEDQFLEVAEAEATQATFPVHR; THAAGTPSEPSATVTIEELDPPPAPTLTVDR
$\alpha$ 1-anti-tripsina	1701	46,4/6,3	58,8/5,5	76647789	264	14	GPTLTEILEGLK; FDRPFLIAIALK; VLYSSEAFPTNFGDPEAAK; TVEVPMMTLDLETPYFR
	2	46,3/5,6	75,2/5,3	31340900	104	8	SNYELNDILSQLGIR; FIEDAQVLYSSEAFPTNFR

Proteína	spot no gel principal	Massa molecular (kDa)/Ponto isoelétrico (pI)		Código <i>gi</i>	Escore MS/MS	Seqüência coberta (%)	Peptídeos coincidentes
		Teórico	Experimental				
Albumina	5801	71,2/5,8	64,0/6,3	162648	698	30	KQTALVELLK; LVNELTEFAK; HLVDEPQNLIK; TVMENFVAFVDK; RHPEYAVSVLLR; YICDNQDTISSK; LGEYGFQNALIVR; EYEATLEECCA; VPQVSTPTLVEVSR; KVPQVSTPTLVEVSR; MPCTEDYLSLILNR; YNGVFQECQAEDK; HPYFYAPELLEYANK; CCAADDKEACFAVEGPK; DAIPENLPPLTADFAEDK
	4901	71,2/5,8	72,7/6,1	162648	179	7	YLYEIAR; LVNELTEFAK; LGEYGFQNALIVR;



							DAFLGSFLYEYSR
Nucleobindin 2	1701	49,5/5,1	60,8/5,3	76635535	146	18	AATSDLEHYDK; QVIDVLETDSHFR; NEEDDMVEMEEER; EVWEEADGLDPNDFDPK; LHDVNSDGLFDEQELEALFTK
	9	49,5/5,2	18,3/5,2	76635535	176	7	LVTLDEFLK; LHDVNSDGLFDEQELEALFTK
Aldeído- redutase	6601	36,3/5,8	38,0/6,5	113594	182	27	ILNKPGLK; TTAQVLIR; VAIDLGYR; MPILGLGTWK; DFFPLDEDGNVIPSEK; DFVDTWTAMEELVDEGLVK; LDYLDLYLIHWPTGFKPGK
	6501	36,3/5,8	35,3/6,4	113594	405	41	VAIDLGYR; MPILGLGTWK; AIGVSNFNHLQVEK; IAENFQVDFELDK; DFFPLDEDGNVIPSEK; DFVDTWTAMEELVDEGLVK; LDYLDLYLIHWPTGFKPGK; GIVVTAYSPLGSPDRPWAKPEDPSILEDPR
	11	36,3/5,8	??????	113594	178	?????	VAIDLGYR; DYPFHEEF; AHNIVLYTGAK; AIGVSNFNHLQVEK
Enolase	6602	47,6/6,4	44,7/6,5	74354056	524	26	GNPTVEVDLFTAK; YITPDELANLYK; VVIGMDVAASEFYR; DATNVGDEGGFAPNILENK; LAMQEFMILPVGAENFR; FTASAGIQVVGDDLTVTNPK; DYPVVSIEDPFDQDDWEAWQK
	12	?????	??????	27806645	174	?????	IGAEVYHNLK; YITPDELANLYK; VVIGMDVAASEFYR; AAVPSGASTGIYEALER; LAMQEFMILPVGAENFR
Actina	3701	42,0/5,3	43,0/5,9	71625	214	21	QEYDESGPSIVHR; SYELPDGQVITIGNER; EEEIAALVIDNGSGMAK; DLYANTVLSGGTTMYPGIADR;

Proteína	spot no gel principal	Massa molecular (kDa)/Ponto isoelétrico (pI)		Código <i>gi</i>	Escore MS/MS	Sequência coberta (%)	Peptídeos coincidentes
		Teórico	Experimental				
		TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR					
Proteína ácida do fluido seminal (aSFP)	3001	13,1/5,0	14,0/5,7	3318757	139	50	IC <del>E</del> GS <del>L</del> MDYR; VSIQYLQLNCNK' ESLEIIDGLPGSPVLGK; EPEHPASFYEVLYFQDPQA
	7	13,1/5,0	??????	3318757	237	?????	MD <del>W</del> LPR; EESGVIATYYGPK; VSIQYLQLNCNK; ESLEIIDGLPGSPVLGK; TNCVWTIQMPPEYHVR
Precursor da Gelsolina	3602	85,1/5,9	43,0/5,8	121118	536	16	YIETDPANR; RYIETDFANR; AGALNSNDAFVLK; DSQEEKTEALTSK; AQPVQVAEGSEPDFWEALGGK; VPVDPATYGQFYGGDSYIILYNRY; IEGSNKVPVDPATYGQFYGGDSYIILYNRY; QQQIYNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPVQSR
	7603	80,9/5,5	42,9/6,5	77736200	238	10	MVVEHPEFLK; HVVPNEVVQR; EVQGFESATFLGYFK; QTQVSVLPEGGETPLFK; VSNGAGTMSVSLVADENPFAQGALR
	6702	86,0/5,9	43,1/6,5	4504165	125	5	HVVPNEVVQR; EVQGFESATFLGYFK; QTQVSVLPEGGETPLFK
Proteína ligadora de	7101	17,0/8,2	16,6/6,6	3182992	182	26	NE <del>Y</del> PSIK; TNYVVK; DCGSWVGVIK; DKTYNYVVK;

colesterol							VVVEWELTDDK
	6101	17,0/8,2	17,6/6,1	27806881	85	?????	VVVEWELTDDK; VVVEWELTDDKNQR
	9102	17,0/8,2	17,7/6,9	27806881	194	?????	LPVKNEYPSIK; VVVEWELTDDK; VVVEWELTDDKNQR
	6	17,0/8,2	?????	27806881	100	?????	VVVEWELTDDKNQR
	20	17,0/8,2	?????	27806881	255	?????	NEYPSIK; TYNVVK; LPVKNEYPSIK; VVVEWELTDDK; VVVEWELTDDKNQR
Leucina-aminopeptidase	5701	53,4/5,6	55,2/6,3	230115	145	17	LMETPANEMTPTK; GSPNASEPPLVFGK; SWIEEQEMGSFLSVAK; TFYGLHEDFPSVVVGLGK; WAHLDIAGVMTNKDEVPLYR
	28	?????	?????	230115	307	?????	TDVFIRPK; TLIEFLFR; EILNISGPPLK; MPLFEHYTR; GVLFASQNLAR; LHGSEDQEAQWR; GSEPPVFLEIHYK
Glutathionaperoxidase	9301	24,2/8,5	23,9/6,9	70778757	72	12	FLVGPDGIPVMR; GTIYDYDAFTLNGK
	8301	24,2/8,5	23,9/6,8	70778757	75	12	YVRPGGSYVPNFQLEK
	9201	?????	?????	21728388	46	?????	?????
Calmodulina	201	12,3/???	?????	2677834	58	?????	FDKDGDTITTK
	301	8,5/???	?????	16974825	69	?????	IDQLTEEQIAEFK; EAFSLFDKDGDTITTK
	3	16,8/4,1	18,0/4,5	115509	204	45	VFDKDGNGYISAAELR; EAFSLFDKDGDTITTK;

EADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK

Glutaminil-peptídeo ciclotransferase	5601	41,4/???	40,8/6,3	29135363	113	?????	LEAIEHGLR; YPGSPGSFAAR; NYGYGGVIQDDHIPFLR; VFGATDSAVPCAMMLELAR
--------------------------------------	------	----------	----------	----------	-----	-------	--

Proteína	spot no gel principal	Massa molecular (kDa)/Ponto isoelétrico (pI)		Código <i>gi</i>	Escore MS/MS	Seqüência coberta (%)	Peptídeos coincidentes
		Teórico	Experimental				
Clusterina	1501	51,7/5,7	43,3/5,4	27806907	201	11	LLSSLEEAK; KLLSSLEEAK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK; TPYHFFTMEFTENNDR
	1503	51,7/5,7	42,2/5,4	27806907	170	11	KLLSSLEEAK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK; TPYHFFTMEFTENNDR
	1601	51,7/5,7	38,0/5,5	27806907	175	11	KLLSSLEEAK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK
	1602	51,7/5,7	44,3/5,3	27806907	98	5	KLLSSLEEAK; ASSIMDELQDR
	2401	51,7/5,7	30,8/5,6	27806907	224	15	IDSLMENDR; LLLSSLEEAK; IDSLMENDR; ELQEMSTEGSK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK; EQSHVMDVMEDSFTR
	2501	51,7/5,7	33,0/5,7	27806907	210	13	LLSSLEEAK; IDSLMENDR; LLLSSLEEAK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK; EQSHVMDVMEDSFTR; IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR

	2601	51,7/5,7	37,7/5,6	27806907	132	9	ASSIMDELQDR; TPYHFPTMEFTENDR	LYDQLLQSYQQK;
	3501	51,7/5,7	34,1/5,8	27806907	226	20	IDSLMENDR; LLLSSLEEAK; QQLNASLQAEK; ASSIMDELQDR; EQSHVMDVMEDSFTR; RPQDTQYSPFSSFPR; TPYHFPTMEFTENDR; IDSLMENDREQSHVMDVMEDSFTR	
	3502	51,7/5,7	35,0/5,8	27806907	204	15	LLLSSLEEAK; IDSLMENDR; QQLNASLQAEK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK; EQSHVMDVMEDSFTR	
	3601	51,7/5,7	37,5/5,7	27806907	140	9	ASSIMDELQDR; TPYHFPTMEFTENDR	LYDQLLQSYQQK;
	4403	51,7/5,7	32,3/6,1	27806907	139	10	KLLSSLEEAK; QQLNASLQAEK; ASSIMDELQDR; LYDQLLQSYQQK	
Cistatina E/M	6001	16,6/7,6	14,8/6,7	61097917	138	31	AHSQLVAGIK; VGELQELSPNDPQVQK; KVGELQELSPNDPQVQK; AAQVAVANYNMGNSDYYR	
	5101	16,6/7,6	18,0/6,2	61097917	117	24	VGELQELSPNDPQVQK; AAQVAVANYNMGNSDYYR	
	19	16,6/7,6	18,9/6,0	61097917	157	17	AHSQLVAGIK; VGELQELSPNDPQVQK	
Galectin 3	1	63,0/5,4	74,6/4,7	76645574	393	16	LILSTNPEAHGLWK; TELVVPSELVLLAVDK; ALLHCEGSFVVDVIDFK; LYTSPTWSQSVMSSTNSR; GVYTLDSLSELPAALEQIFESQK	
	901	63,0/5,4	74,2/4,7	76645574	190	10	RIDVSLSSVK; VTMEVDAECPVVK;	

TELVVPSELVLLLAVDK; LYTSPTWSQSVMSSSYNPSR

Proteína	spot no gel principal	Massa molecular (kDa)/Ponto isoelétrico (pI)		Código <i>gi</i>	Escore MS/MS	Seqüência coberta (%)	Peptídeos coincidentes
		Teórico	Experimental				
Enzima conversora de angiotensina (ACE)	10	150,7/5,0	97,1/6,3	449408	336	6	SILPYFPK; FVEEYDRR; FHIPASVPYVR; ENYNQEWWSLR; INLLSSGDGGYEEDINFLMK; EGANPGFHEAIGDVLALSVPSTPHLHK
Inibidores de proteases serínicas (SERPINs)	4	16,7/5,6	20,9/4,8	76623551	156	19	GTLYFVK; LHNNECR; KLNNECR; TYSNECMYCFNLR
	6	55,2/8,2	20,2/5,2	76644489	116	3	IDSPFELPPYIEPK; EKIDSPFELPPYIEPK
	7	55,2/8,2	19,7/5,5	76644489	78	3	IDSPFELPPYIEPK; EKIDSPFELPPYIEPK
	14	42,9/5,9	58,0/5,7	76674571	80	8	DTAVVLYLPQLR; GFPEDLAPVLAALGMVDVFDR
	15	42,9/5,9	58,8/5,5	76674571	94	8	DTAVVLYLPQLR; GFPEDLAPVLAALGMVDVFDR
	16	42,9/5,9	55,3/5,8	76674571	268	22	VLHLNELTR; DTAVVLYLPQLR; LGSITEPPGQVLELPDVEDR; GFPEDLAPVLAALGMVDVFDR;

							ELLFPSSLTSSDQLVLINAI SFR	
	17	42,9/5,9	56,2/6,0	76674571	283	22	LRPENLDFK; LGSSITEPPGQVLELPDVEDR; GFPEDLAPVLAALGMVDVFDR; LKGFPEDLAPVLAALGMVDVFDR; ELLFPSSLTSSDQLVLINAI SFR	DTAVVLYLPQLR;
	18	42,9/5,9	64,6/6,1	76674571	315	24	VLHNLNLTR; LRPENLDFK; LGSITEPPGQVLELPDVEDR; GFPEDLAPVLAALGMVDVFDR; ELLFPSSLTSSDQLVLINAI SFR	DTAVVLYLPQLR;
	701	42,9/5,9	58,0/5,3	76674571	159	12	ANLSGIIAGGGLGVSK; LGSITEPPGQVLELPDVEDR	LDESQSTSVQMMR;
Calreticulina	13	?????	?????	237420	133	?????	FYALSAR; VHVIFNYK; KVHVIFNYK	
$\alpha$ -L-fucosidase	6701	53,6/6,6	54,4/6,4	76626175	183	10	WPISGQLFLAQPK; YQPEVLWADGGGAPDTYWK	NAGIADYLTIEELVK;
Fosfodiesterase 1	18	?????	?????	1526949	52	?????	SMEAIFLAHGPSFK	
$\beta$ -galactosidase	19	?????	?????	57619080	48	?????	QYFGFVLYR; YISGSIHYFR	

Optou-se por cortar os *spots* dos géis individualmente, exatamente como apareceram no gel principal, evidenciando o fato de muitas proteínas terem aparecido como grupos de isoformas, principalmente a clusterina (12 *spots*), cauxina (7 *spots*), transferrina, (6 *spots*), N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase (6 *spots*), PGDS (4 *spots*), *gelsolina* (3 *spots*) e glutathiona peroxidase (2 *spots*). Outras proteínas presentes nos mapas protéicos incluem: proteína acídica do fluido seminal (aSFP), aldeído-redutase,  $\alpha$ -L-fucosidase,  $\alpha$ -1- $\beta$ -glicoproteína, apolipoproteína A1,  $\beta$ -actina, calmodulina, catepsina D, cistatina, precursor da dissulfeto-isomerase, enolase, galectina 3, glutaminil-peptídeo ciclotransferase, leucina-aminopeptidase e nucleobindina (58 kDa).

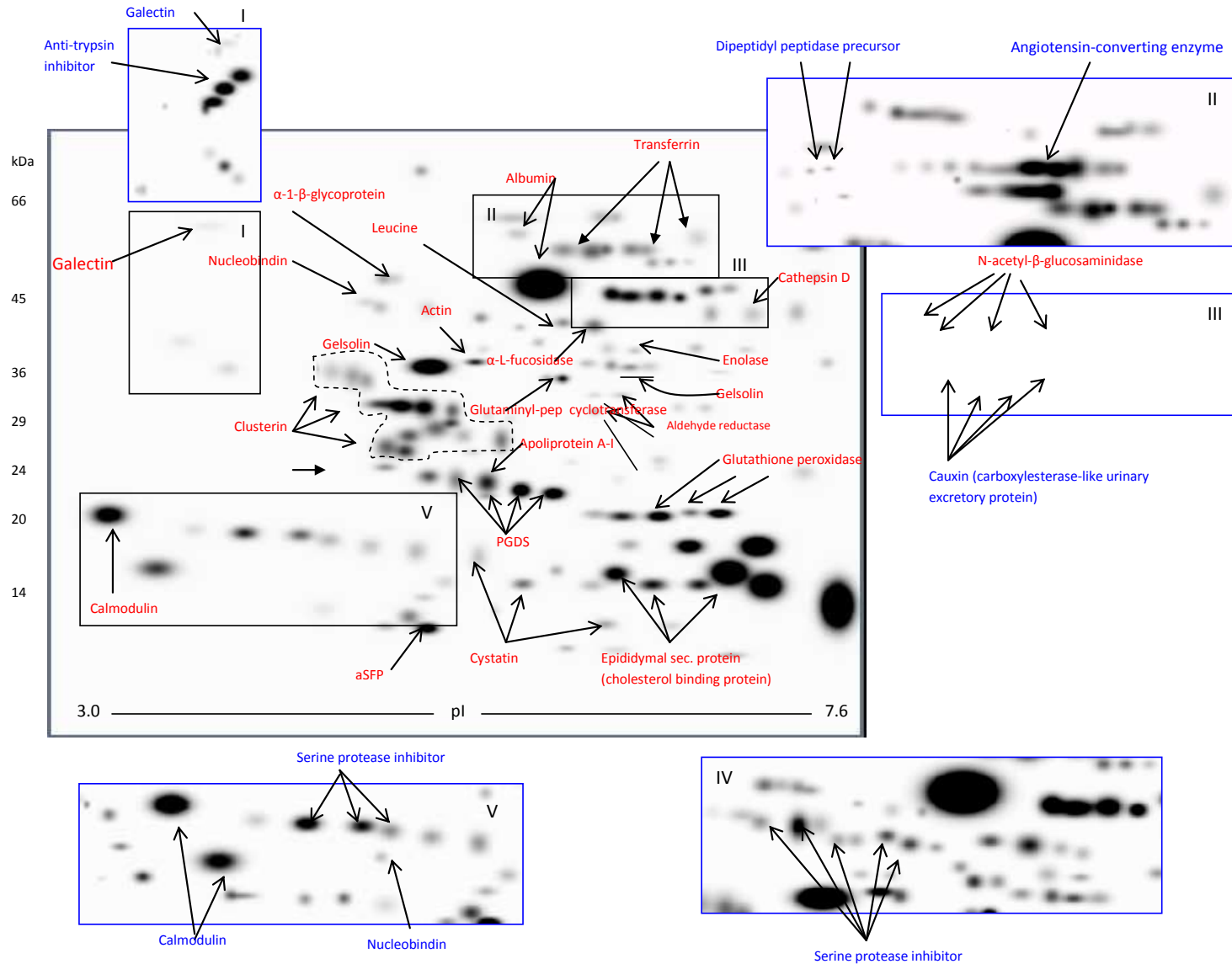
Após a depleção da albumina, o número de *spots* detectados nos mapas passou para  $137 \pm 4$  *spots* (figura 3). Comparação dos géis antes e após o procedimento de depleção, mostrou que a intensidade da albumina foi reduzida para 1/10 da intensidade nos géis não submetidos à depleção. Além do aumento no número de *spots*, 48 deles tiveram sua intensidade aumentada em 3X, pelo menos, nos géis depletados em comparação aos originais (figura 3). As principais regiões dos mapas mostrando esses *spots* podem ser observadas nas figuras 3A a 3E.

Na figura 3A, a galectina 3 mostrou-se mais intensa, tendo sua identidade confirmada, e um *spot* não detectado nos géis originais, foi identificado como inibidor anti-tripsina. Os fragmentos correspondentes a outros dois *spots* nessa mesma região (A1 e A2) não corresponderam a nenhuma seqüência presente nos bancos de dados. A figura 3B também mostrou *spots* não identificados anteriormente, tais como a enzima conversora de angiotensina (ACE) e o precursor da dipeptidil-peptidase. Os principais



*spots* observados na figura 3C foram identificados como cauxina, próximo a uma série de *spots* identificados como N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase. Da mesma forma, a figura 3D mostra duas proteínas não identificadas anteriormente, a calmodulina, e uma isoforma (20kDa) da nucleobindina 2. Uma série de *spots* já detectados nos géis originais de CEF (figura 2), apareceu mais intensamente nos géis após a depleção da albumina, permitindo a identificação de três deles, como inibidores de proteases serínicas (SERPINS). O *spot* D1, identificado por meio de MALDI-ToF-ToF mostrou-se aSFP, confirmando a identificação do mesmo *spot* nos mapas originais. Já na região mostrada na figura 3E, o principal achado foi a identificação de um “trem” protéico denominado E1, sendo cinco *spots* correspondentes a SERPINS. Já o *spot* E2 foi identificado como leucina aminopeptidase, próximo de um outro *spot* de mesma identidade, já observado nos géis originais.

Figura 3: Mapa protéico de fluido da cauda do epidídimo bovino, produzidos com uso de eletroforese 2D e espectrometria de massa. O mapa foi construído a partir de amostras de CEF após o procedimento de depleção de albumina.



#### 5.4. DISCUSSÃO

Os espermatozóides formados no testículo irão sofrer um processo de maturação ao longo do trânsito epididimal (ROBAIRE e HERMO, 1988). Esta maturação compreende uma série de eventos que inclui alterações na estrutura da membrana plasmática (DACHEUX et al., 1989), alterações nas proteínas superficiais, modelação do cito-esqueleto, entre outras (OLSON et al., 2003; GATTI et al., 2004; SULLIVAN et al., 2005). O processo de maturação confere ao espermatozóide a motilidade, e a capacidade de se ligar aos oócitos. Estes processos são mediados por inúmeras substâncias presentes no meio líquido que circunda estas células. O fluido epididimal fornece um ambiente ideal para a maturação e manutenção dos espermatozóides. Ele possui uma composição protéica específica (ROBAIRE e HERMO, 1988), resultado, principalmente, de secreção do epitélio epididimal (DACHEUX et al., 2006).

Recentemente avançou-se bastante no conhecimento das proteínas presentes no fluido do epidídimo, e algumas delas têm sido associadas a importantes eventos, tais como a proteção dos espermatozóides contra danos oxidativos (HINTON et al., 1995; REYES-MORENO et al., 2002), aquisição de motilidade (DACHEUX e PACQUIGNON, 1980; DACHEUX et al., 2003, 2005; HENDERSON e ROBAIRE, 2005). Além disso, proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo (CEF) também têm sido associadas à fertilidade em touros (MOURA et al., 2006b). Apesar de inúmeras proteínas terem sido identificadas nesse fluido, os mecanismos responsáveis pelas

transformações sofridas pelos espermatozóides ainda não foram completamente elucidados. Possivelmente, algumas das proteínas que atuam nesses processos estejam presentes em quantidades reduzidas, sendo ofuscadas por proteínas presentes em grandes quantidades.

De fato, em várias espécies, um pequeno grupo de proteínas compõe mais de 90% da composição protéica (FOUCHÉCOURT et al., 2000; YUAN et al., 2006; DACHEUX et al., 2006), entre elas, destacam-se a albumina e as imunoglobulinas. Essas proteínas também estão presentes em outros fluidos biológicos, dificultando a detecção de proteínas secretadas em pequenas quantidades (OGATA et al., 2005; PLAVINA et al., 2007).

Para contornar essa limitação, inúmeras técnicas têm sido utilizadas para depleção de proteínas abundantes, destacando-se o uso de colunas de afinidade (FOUNTOULAKIS et al., 2004; DEKKER et al., 2007), a fim de se identificarem biomarcadores. Este trabalho descreve uma análise da composição protéica do fluido da cauda do epidídimo utilizando técnicas proteômicas, e depleção de proteínas abundantes para identificação de proteínas expressas em menor quantidade.

Dentre as várias técnicas disponíveis, nós optamos por utilizar aquela baseada na ligação de afinidade ao Cibacron, por ser uma técnica simples e rápida. O uso desta técnica nos permitiu aumentar em 20% o número de *spots* detectados nos géis de CEF, além de aumentar a intensidade de uma série de outros *spots*, melhorando assim a resolução dos géis.

As proteínas identificadas se inserem em diferentes classes funcionais, tais como aquelas envolvidas no transporte de substâncias hidrofóbicas, proteases e inibidores, proteção

contra oxidação e diferentes enzimas. Mais especificamente, detectou-se um grupo de enzimas glicolíticas, entre as quais se incluem enolase, aldose-redutase,  $\alpha$ -L-fucosidase, N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase, e  $\beta$ -galactosidase.

Essas enzimas glicolíticas, em grande parte, atuam na produção de substratos energéticos para o metabolismo espermático (BROOKS, 1976), com a produção de frutose e sorbitol (MURDOCH e WHITE, 1968). Contudo, mais recentemente, novas funções têm sido atribuídas a essas proteínas, tanto na modificação de glicoproteínas ligadas à membrana espermática no processo de maturação epididimal (SKUDLAREK et al., 1992; TULSIANI et al., 1995, 1998), quanto na mediação das interações entre espermatozóide e zona pelúcida/oócito (DE CEREZO et al., 1996; ABASCAL et al., 1998).

A enolase é uma enzima que participa na degradação de glicose em piruvato, catalisando a conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. Foram descritas duas isoformas da enzima, uma delas, a enolase- $\alpha$  (ENO- $\alpha$ ) é amplamente distribuída em diversos tecidos (MIZUKAMI et al., 2004; TAKASHIMA et al., 2005; KANEMOTO et al., 2006). Outra, a enolase-S (ENO-S) é especificamente ligada ao espermatozóide (EDWARDS e GROOTEGOED, 1983). A atividade dessas enzimas no espermatozóide parecem estar relacionadas à qualidade seminal. Em humanos, uma maior atividade de ENO- $\alpha$  está associado a espermatozoides com anormalidades morfológicas, enquanto a atividade da ENO-S estava correlacionada com células morfológicamente normais (FORCE et al., 2002). A enolase espermática parece ser sintetizada durante a espermatogênese, localizando-se no flagelo, próxima ao sistema motor (GITLITS et al., 2000), região de alto consumo de ATP. Outras enzimas que participam da degradação de

substratos energéticos também parecem estar associadas à cauda espermática (KNULL e WALSH, 1992), sugerindo participação dessas proteínas na manutenção do metabolismo espermático. Em espermatozoides testiculares, a enolase espermática apresenta-se em três formas diferentes (ENO-S1, -S2 e -S3). Durante a maturação epididimária, começa a haver um predomínio da ENO-S2 sobre as demais, e, em espermatozoides ejaculados, apenas esta última é detectada, parecendo ser a ENO-S2 a enzima ativa (FORCE et al., 2004).

A aldose-redutase catalisa a conversão de glicose em sorbitol, primeiro passo na produção de frutose no sêmen (HERS, 1956), fornecendo substrato energético para os espermatozoides, através da via dos polióis (KOBAYASHI et al., 2002; FRENETTE et al., 2004, 2006). No entanto, outras funções têm sido atribuídas a essa proteína no trato reprodutivo. Essa enzima está presente no epidídimo em vesículas, conhecidas como epididimossomos (FRENETTE et al., 2003). Ligadas a essas vesículas, essa enzima atuaria na produção de sorbitol, o qual, por sua lenta difusão, se acumularia no fluido da cauda do epidídimo (CEF), aumentando sua osmolaridade. Sabe-se ainda que esses epididimossomos podem transferir proteínas para o espermatozoide (EICKHOFF et al., 2001; FRENETTE et al., 2002). No citoplasma espermático, essa enzima também promoveria um aumento da osmolaridade celular, protegendo a célula, dessa forma, contra danos osmóticos (BURG, 1995). Além disso, esse aumento de osmolaridade promoveria uma leve desidratação nos espermatozoides, contribuindo, dessa forma, para a regulação da motilidade e conservação da viabilidade celular (CRICHTON et al., 1994) enquanto presentes na cauda do epidídimo.

Outras enzimas têm sido implicadas na alteração de resíduos de carboidratos componentes de glicoproteínas espermáticas durante a maturação epididimal. A  $\beta$ -galactosidase é uma glicosidase que cliva resíduos galactosil de diversos tipos de substrato (CONZELMANN e SANDHOFF, 1987). No pH predominante no epidídimo (6,6 a 6,8), essa enzima atua principalmente sobre resíduos galactosil de glicoproteínas (SKUDLAREK et al., 1992). Duas formas diferentes de  $\beta$ -galactosidase foram observadas no epidídimo. Em ratos, uma isoforma, de cerca de 80 kDa é encontrada no interior do acrossomo (SKUDLAREK et al., 1993), e que provavelmente está envolvida na clivagem de carboidratos da zona pelúcida, após a reação acrossômica. Outra forma, de 84 kDa é encontrada no fluido da cauda do epidídimo (TULSIANI et al., 1995). Esta última, secretada pelo próprio epidídimo, parece estar envolvida, como outras glicosidases (TULSIANI et al., 1993) na clivagem de glicoproteínas da membrana espermática, como parte do processo de maturação epididimária (SRIVASTAVA e OLSON, 1991). Em bovinos, a  $\beta$ -galactosidase é secretada tanto no epidídimo quanto nas glândulas sexuais acessórias. A atividade predominante no plasma seminal, coincide com aquela epididimal, proveniente de uma isoforma de cerca de 200 kDa (JAUHAINEN e VANHA-PERTTULA, 1986).

Outra enzima que atua de forma semelhante à  $\beta$ -galactosidase, é a N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase. Esta enzima cliva resíduos de N-acetilglicosamina de glicoproteínas, ao invés de resíduos de galactose. No epidídimo, a principal fonte de N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase são as células principais da cabeça e do corpo (CHAPMAN e KILLIAN, 1984), e sua secreção parece ser regulada por andrógenos (CASTELLÓN e HUIDOBRO, 1999). Acredita-se que, assim como a  $\beta$ -galactosidase, esta enzima esteja envolvida na digestão de resíduos de N-acetilglicosamina

pertencentes a glicoproteínas ligadas à membrana espermática, de forma a exibir novos domínios na membrana, como parte do processo de maturação epididimária.

Contudo, atividade significativa de N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase (NAG) foi detectada também na membrana de espermatozóides epididimais (CHAPMAN e KILLIAN, 1984; MIRANDA et al., 1995), sugerindo que a enzima presente no fluido epididimal se liga à membrana espermática. Assim como em humanos (MIRANDA et al., 1995), detectou-se neste trabalho quatro isoformas de NAG no fluido epididimal dos touros, com massa molecular semelhante, e pontos isoelétricos ligeiramente diferentes (6,5 a 6,8). Além disso, MORI et al. (1989) demonstraram que a incubação de oócitos humanos com uma lectina que interage especificamente com a N-acetilglicosamina bloqueou a ligação entre os gametas. Da mesma forma, MIRANDA et al. (1997) mostraram que a pré-incubação de espermatozóides com N-acetilglicosamina reduziu em 62% o número de células espermáticas ligadas à zona pelúcida, sugerindo que este açúcar desempenhe um papel importante na interação entre espermatozóide e oócito. Dessa forma, além de atuar nos processos de maturação epididimária, a N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase secretada pelo epidídimo parece ligar-se à membrana espermática, para posteriormente, agir como lectina, ligando-se a resíduos de N-acetilglicosamina presentes em glicoproteínas da zona pelúcida, mediando o processo de fertilização. É possível que papel semelhante também seja desempenhado pela  $\beta$ -galactosidase, pelo menos em humanos, uma vez que o tratamento de espermatozóides capacitados com galactose também inibe a interação dessas células com a zona pelúcida (MIRANDA et al., 1997). É possível que as diferentes isoformas de NAG detectadas no CEF atuem de forma diferente na função reprodutiva. Em humanos, MIRANDA et al. (1995) encontraram diversas isoformas de



NAG no fluido epididimal, mas apenas uma delas estava associada à membrana espermática. Portanto, algumas dessas isoformas podem atuar na modificação de glicoproteínas espermáticas, enquanto outra(s) podem se ligar a essa membrana e atuar como lectinas, no processo de interação entre os gametas, no oviduto.

Da mesma forma, a  $\alpha$ -L-fucosidase, que hidrolisa resíduos de fucose de diversos substratos, tem sido implicada na interação entre gametas. Essa hipótese baseia-se no fato de que tratamento de espermatozoides capacitados com D ou L-fucose inibe a ligação de espermatozoides à zona pelúcida, entre 68 e 82% (MIRANDA et al., 1997), mas o mesmo não ocorre com células não capacitadas. Esses achados sugerem que as modificações sofridas pela membrana espermática durante a capacitação (DE LAMIRANDE et al., 1997) devem, devido a reorganização dos componentes da membrana, expor sítios de ligação para esse açúcar (TESARIK et al., 1993). Além disso, JOHNSTON et al. (1998) demonstraram que resíduos fucosil na zona pelúcida estão associados a uma maior intensidade de ligação de espermatozoides de roedores. Atividade de  $\alpha$ -L-fucosidase foi descrita tanto no sêmen (ALHADEFF et al., 1999), fluido epididimal HANCOCK et al., 1993) e na membrana espermática (JAUHIAINEN e VANHA- PERTULLA, 1986; AVILÉS et al., 1996). Nesta última, a enzima foi imunolocalizada na região pós-acrossômica em ratos (AVILÉS et al., 1996) e humanos (ALHADEFF et al., 1999), justamente a região celular envolvida na ligação entre gametas. Além disso, recentemente ficou demonstrado que a intensidade do *spot* correspondente a  $\alpha$ -L-fucosidase no fluido da cauda do epidídimo de touros era significativamente maior em animais de alta fertilidade, em comparação com machos de menor fertilidade (MOURA et al., 2006b), apoiando a hipótese de que a fucosidase presente na membrana espermática funcione como lectina, interagindo com

resíduos de fucose no oócito e, dessa forma, contribuindo para uma maior eficiência no processo de fertilização.

Outro grupo de proteínas do fluido da cauda do epidídimo que merece destaque são as proteínas ligadoras de lipídeos. A apolipoproteína A1 (apo A1) é altamente abundante no plasma sanguíneo, e parece estar envolvida no transporte de colesterol entre diversos tipos celulares e o fígado (LEWIS e RADER, 2005). A apo A1 é o principal constituinte da lipoproteína de alta densidade (HDL; RADER, 2006). A molécula de HDL está abundantemente presente no fluido do oviduto (EHRENWALD et al., 1990), e parece estar envolvida no processo de capacitação espermática, removendo colesterol e fosfolipídeos da membrana dos espermatozoides através da interação com proteínas do plasma seminal (BSPs) em bovinos (THÉRIEN et al., 1997). Este mecanismo de indução da capacitação é diferente das vias utilizadas pela heparina (LANE et al., 1999), e a interação entre as BSPs e o HDL possivelmente envolve a apo A1 (MANJUNATH et al., 1987, 1989). A apo A1 presente na composição do HDL é de 28 kDa (EHRENWALD et al., 1990), aproximadamente a mesma massa molecular da proteína encontrada neste trabalho (28,5 kDa).

Além disso, a apo A1 parece fazer parte de um complexo protéico, denominado proteína ativadora do espermatozóide (SPAP; AKERLOF et al., 1991). Este complexo protéico, também composto por albumina e IgGs, promove um estímulo *in vitro* da motilidade espermática (AKERLOFF et al., 1989), e foi localizado ligado à região pós-acrossômica dos espermatozoides (LEIJONHUFVUD et al., 1997). O exato mecanismo através do qual a SPAP promove esse aumento na motilidade ainda é desconhecido. Além disso, as funções

desempenhadas pela apolipoproteína A1 no fluido epididimal ainda são uma questão especulativa. É possível que a apo A1 se ligue aos espermatozóides durante o trânsito epididimário, alterando a composição lipídica da membrana como parte do processo de maturação. Além disso, ela deve interagir com a albumina e imunoglobulinas, presentes abundantemente no fluido da cauda do epidídimo, para formar a SPAP, a qual contribuiria para a aquisição de motilidade pelos espermatozóides. Esta motilidade seria parcialmente suprimida pela hiperosmolaridade do CEF. No entanto, por ocasião da ejaculação no trato reprodutivo feminino, as células seriam expostas a um meio com osmolaridade menor, permitindo a expressão dessa motilidade. Já que a motilidade induzida pela SPAP é predominantemente linear (LEIJONHUFVUD et al., 1997), este processo auxiliaria o espermatozóide no tráfego até o oviduto.

Além disso, um conjunto de proteínas denominadas coletivamente de proteínas ligadoras de colesterol também foi detectado no CEF. Estas proteínas são secretadas em diversas regiões do epidídimo, sendo mais prevalentes no corpo em eqüinos, bovinos e humanos (UHLENBRUCK et al., 1993; KIRCHHOFF et al., 1998; FOUCHÉCOURT et al., 2000; LÉGARÉ et al., 2006). Elas estão entre as mais abundantes no epidídimo (3 a 10%) podem se ligar a membrana espermática (KIRCHHOFF et al., 1996), mas é mais prevalente em células de homens vasectomizados (LÉGARÉ et al., 2006). Em homens vasectomizados, essa enzima é menos expressa no epidídimo, a membrana de seus espermatozóides apresenta maior conteúdo de colesterol, e estas células apresentam motilidade reduzida (LÉGARÉ et al., 2004, 2006). Possivelmente, ela atua removendo excesso de colesterol da membrana plasmática, juntamente com outras proteínas, como a apo A1, no processo de maturação espermática.

Outra apolipoproteína abundantemente presente no fluido da cauda do epidídimo é a apo J, também conhecida como clusterina (?????). Esta proteína também está presente no fluido das glândulas sexuais acessórias (MOURA et al., 2007) e é expressa em resposta ao dano celular (BAILEY e GRISWOLD, 1999), e é mais prevalente na membrana espermática de células com anormalidades morfológicas (IBRAHIM et al., 2000). Ela está presente no fluido do epidídimo como um todo, contribuindo com cerca de 25% do total de proteínas (FOUCHÉCOURT et al., 2000). No epidídimo, possivelmente ela atue no remodelamento de membrana durante a maturação epididimal (SYLVESTER et al., 1991) ou na reabsorção de células com baixa viabilidade, acumuladas na cauda do epidídimo. Além disso, dado que ela é capaz de inibir ou modular a lise celular causada por alguns componentes do complemento (MERI e JARVA, 2001), é possível que ela atue também na proteção de espermatozóides durante o armazenamento epididimal.

A prostaglandina D sintetase (PGDS) é uma molécula que está presente no plasma seminal (GERENA et al., 1998) bovino. KILLIAN et al. (1993) encontraram uma associação positiva entre a sua abundância no plasma seminal de touros e a fertilidade desses animais. No trato reprodutivo masculino, ela foi detectada nas células de Sertoli e Leydig, nas glândulas sexuais acessórias e no epidídimo (FOUCHÉCOURT et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2000; URADE e HAYAISHI, 2000). Dada a sua afinidade por retinóides (VAN PELT e DE ROOIJ, 1990; TANAKA et al., 1997), e a importância dos retinóides para as funções reprodutivas (BALEATO et al., 2005; LIN et al., 2006), é possível que ela atue mediando o transporte de retinóides e outras substâncias hidrofóbicas, as quais favoreceriam a função espermática. No entanto, recentemente, MOURA et al. (2006) relataram que isoformas de PGDS presentes no fluido da

cauda do epidídimo de touros apresentavam-se mais abundantes em animais de baixa fertilidade. Esse achado é surpreendente, e contradiz a maioria dos trabalhos, que relatam relações positivas entre PGDS e qualidade espermática (LEONE et al., 2002) ou taxas de não-retorno (KILLIAN et al., 1993). No entanto, as isoformas identificadas por MOURA et al. (2006), e nesse trabalho variam de 24 a 27 kDa, e pI 5,8 a 6,3. Já aquela associada à fertilidade nos touros (KILLIAN et al., 1993) apresentava-se como um único *spot*, com massa de 26 kDa e pI de 6,2. É razoável se imaginar que as isoformas presentes no CEF sofram algum tipo de modificação, decorrente de interações com proteínas secretadas no fluido das glândulas acessórias. Além disso, a PGDS liga-se também a fosfolípidos presentes na membrana espermática, podendo promover alterações em sua composição durante a maturação epididimal.

A actina é uma proteína que faz parte do cito-esqueleto de todas as células em mamíferos (WATT, 1986). Nos espermatozoides, ela está presente em duas formas, uma filamentosa, e outra monomérica (HOWES et al., 2001) e foi detectada no flagelo, na peça intermediária, na região equatorial e no espaço peri-acrossômico (FLAHERTY et al., 1986; DE LAS HERAS et al., 1997), onde ela está envolvida em diversos eventos importantes para a correta função espermática, tais como a iniciação da motilidade espermática (LIN et al., 2002) e manutenção da morfologia espermática. Além disso, sua localização em regiões próximas ao acrossomo sugere que ela possa participar da reação acrossômica. De fato, a distribuição de actina no interior do espermatozoide sofre modificações marcantes durante os processos de maturação epididimal (FOUQUET e KANN, 1992; HOWES et al., 2001), capacitação e reação acrossômica (MORENO-FIERROS et al., 1992; DE LAS HERAS et al., 1997; HOWES et al., 2001;

BREITBART et al., 2005). Nessas células, a actina forma uma barreira periférica (CABELLO-AGUEROS et al., 2003), impedindo a fusão prematura entre as membranas acrossômica e plasmática. Durante a reação acrossômica, essa barreira de actina seria despolimerizada, fragilizando a membrana nessa região. Além disso, variações na intensidade de polimerização da actina em diversas regiões do citoplasma seriam responsáveis pela migração de antígenos para a superfície da membrana espermática. É certo que a inibição da polimerização/despolimerização da actina espermática previne a reação acrossômica, e reduz a capacidade fecundante dos espermatozoides em diversas espécies (ROGERS, et al., 1989; CASTELLANI-CERESA et al., 1993; SPUNGIN et al., 1995). A atuação da actina nesses processos se dá por meio de uma alternância entre as formas monoméricas e filamentosas, a qual se dá por inúmeras proteínas, sendo a gelsolina uma das mais importantes.

A gelsolina é uma proteína ligadora de actina, que promove a despolimerização da actina filamentosa em actina monomérica (YIN e STOSSEL, 1979), reduzindo o tamanho das fibras de actina, sendo mais ativa proteína despolimerizadora de actina (SUN et al., 1999). Sua ligação à actina é dependente de cálcio (YIN et al., 1980; ROUSTAN et al., 2007), expondo sítios de ligação para actina. A gelsolina já foi identificada em inúmeros tipos celulares (YIN et al., 1981), mas apenas recentemente foi detectada nos espermatozoides (DE LAS HERAS et al., 1997). Ela está sempre em contato próximo com a actina e, por ocasião do influxo intra-espermático de cálcio durante o processo de capacitação (ZHU et al., 1994) a gelsolina se tornaria ativa, mediando a alternância da actina entre os estados gel/sol, e promovendo modificações no cito-esqueleto, responsáveis pela migração de antígenos e fusão das membranas acrossômicas. Além disso, a gelsolina também participa na regulação de uma

bomba de prótons ( $H^+$ -V-ATPase) nas células epididimais (HERMO et al., 2000; BEAULIEU et al., 2005). Estas ATPases atuam secretando prótons no interior do lúmen epididimário, mantendo um pH mais baixo, adequado à maturação espermática, mantendo os espermatozóides pouco móveis (WONG et al., 1981; COOPER, 1986; HINTON e PALLADINO, 1995; BRETON et al., 1996).

Apesar da gelsolina se apresentar em duas formas, uma intracitoplasmática e outra secretada (YIN et al., 1984), a actina é uma proteína predominantemente intracelular. Dessa forma, foi uma surpresa sua identificação no fluido da cauda do epidídimo. É provável que sua presença neste fluido seja produto de extravasamento de células mortas ou defeituosas, e que, no fluido da cauda do epidídimo, a gelsolina, presente em considerável quantidade nesse meio funcione como protetor dos espermatozóides e do epitélio epididimal, prevenindo os efeitos tóxicos da actina (LEE et al., 1992), assim como a proteína ligadora de vitamina D, que exerce função semelhante.

A transferrina é uma proteína implicada no transporte intercelular de ferro (SYLVESTER e GRISWOLD, 1993). No testículo, ela é sintetizada pelas células de Sertoli, atuando no transporte de ferro entre o sangue e o meio intertubular (SKINNER e GRISWOLD, 1980; SYLVESTER e GRISWOLD, 1994), onde se torna disponível para as células germinativas. Sua síntese parece ser regulada por fatores secretados paracrinamente pelas células germinativas (ROBERTS et al., 1991). Sua presença em níveis adequados é fundamental para o bom funcionamento da espermatogênese, e ratos secretando quantidades diminuídas dessa proteína, produzem espermatozóides defeituosos (BERNSTEIN, 1987). Seus níveis no plasma seminal parecem estar associados à produção espermática em humanos e bovinos (FORESTA et

al., 1986; MALLEA et al., 1988; GILMONT et al., 1990). Além disso, homens inférteis apresentam níveis significativamente inferiores de transferrina no plasma seminal comparados a pacientes férteis (HOWES et al., 1982). Uma parcela da transferrina detectada no plasma seminal vem das glândulas sexuais acessórias (GILMONT et al., 1990), mas a maior parte parece originar-se do testículo/epidídimo (FORESTA et al., 1986; GILMONT et al., 1990).

A transferrina é membro de uma família de proteínas ligadoras de ferro, que inclui ainda a ovotransferrina e a lactoferrina (SYLVESTER e GRISWOLD, 1994). Estas proteínas têm a propriedade de se ligar ao ferro tornando-o solúvel, e evitando sua agregação (SYLVESTER e GRISWOLD, 1993). No epidídimo, a transferrina proveniente do testículo parece ser absorvida pelo epitélio (DJAKIEW et al., 1986; VEERAMACHANENI e AMANN, 1991), sendo substituída, em inúmeras espécies pela lactoferrina (SYLVESTER e GRISWOLD, 1993). A lactoferrina é um componente importante do fluido epididimal (DRUART, 1998; FOUCHÉCOURT, 1999; ARAÚJO, 2000; FOUCHÉCOURT et al., 2000), ligando-se à membrana espermática durante o trânsito epididimal (JIN et al., 1997) e auxiliando na manutenção da motilidade espermática (ARAÚJO, 2000). Uma vez que a membrana espermática é bastante susceptível à oxidação de seus componentes lipídicos, possivelmente essas proteínas atuam na proteção dos espermatozóides contra danos oxidativos durante seu armazenamento no epidídimo, ligando-se ao ferro e reduzindo a formação de radicais livres (WAKABAYASHI et al., 1999). É interessante o fato de nós termos encontrados quantidades significativas de transferrina no fluido epididimal, mas não termos identificado a lactoferrina, mesmo após a depleção da albumina. É provável que em bovinos, da mesma forma que em humanos (FORESTA et al., 1986), a transferrina desempenhe o papel principal no seqüestro de ferro no fluido.



Além da transferrina/lactoferrina, uma série de enzimas com atividade anti-oxidante estão presentes no fluido do epidídimo atuando na proteção espermática contra radicais livres, mas parece que os mecanismos envolvendo a glutatona são os mais importantes (HINTON et al., 1995). Uma das enzimas que mediam a prevenção contra estresse oxidativo no epidídimo utilizando a glutatona como substrato é a glutatona peroxidase (HINTON et al., 1995). Esta enzima também está presente nos espermatozoides (LI, 1975; ALVAREZ e STOREY, 1989), e converte peróxido de hidrogênio em água, reduzindo duas moléculas de glutatona (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989), e é um potente agente inativador de moléculas oxidantes. Nós observamos três *spots* correspondentes à glutatona peroxidase, mas não fomos capazes de identificar outras enzimas, tais como glutatona transferase e superóxido dismutase, já relatadas no fluido epididimal de outras espécies (AGRAWAL et al., 1989; BRIEHL e MAINSFIELD, 1991; PERRY et al., 1993), o que sugere que a glutatona peroxidase desempenhe um papel pivotal na defesa de espermatozoides epididimais.

Outro mecanismo através do qual se processa a maturação dos espermatozoides é através de clivagem proteolítica de componentes da membrana (DACHEUX et al., 2006). Inúmeras proteínas secretadas no epidídimo ligam-se à membrana espermática numa forma precursora ou inativa, e posteriormente tornam-se ativas devido à ação de proteases (EVANS, 1999; MÉTAYER et al., 2001, 2002a). Não se sabe especificamente quais proteases estão envolvidas nesse processo, mas é possível que proteases serínicas e cisteínicas (BLOBEL, 2000; THIMON et al., 2005). Nesse trabalho, foram encontradas inúmeras proteases, incluindo leucina aminopeptidase, glutaminil peptídeo ciclotransferase e dipeptidil peptidase. No entanto, se não for devidamente regulada, a ação dessas proteases pode resultar em danos aos

espermatozoides (GATTI et al., 2004). Ação destas enzimas, em parte, é modulada pela ação de inibidores específicos (MÉTAYER et al., 2002b; BAKER et al., 2005). Nesta análise do fluido da cauda do epidídimo, foram identificados uma série dessas moléculas inibidoras. Inibidores de proteases cisteínicas, como a cistatina E/M, detectada em três isoformas distintas, foram detectados em maior quantidade. No entanto, inibidores de proteases serínicas (SERPINS), foram observados em menor quantidade, e apenas após depleção da albumina. Parece que um delicado equilíbrio entre a secreção de proteases e seus inibidores é necessário para que a maturação epididimal ocorra adequadamente.

Em resumo, utilizando uma abordagem proteômica, foi possível a identificação de uma série de proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo de touros leiteiros de fertilidade conhecida. A identidade dessas proteínas sugere que elas apresentam uma enorme gama de funções, incluindo a modulação do metabolismo espermático, participação na modificação superficial da membrana e proteção dos espermatozoides durante seu armazenamento na cauda epididimal. Esse é o primeiro passo, no sentido de se compreender de que forma o epidídimo modifica e regula a função espermática, e qual a contribuição de cada proteína nesse processo.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

A secreção protéica no plasma seminal de carneiros Santa Inês ocorre de forma sincronizada com alterações complexas no desenvolvimento sexual como um todo, ao longo do primeiro ano de vida desses animais. Estas mudanças foram mais marcantes durante a puberdade, quando os espermatozoides começam a apresentar motilidade. Algumas dessas proteínas apresentam associações potenciais com aspectos funcionais dos espermatozoides.

Tanto a osteopontina quanto BSP A1/A2 e BSP 30-kDa ligam-se aos espermatozoides bovinos durante a ejaculação, e permanecem ligadas mesmo após essas células entrarem em contato com secreções do oviduto. No entanto, estas secreções promovem mudanças na topografia de ligação das referidas proteínas, bem como na quantidade de espermatozoides capacitados e com o acrossomo reagido.

Utilizando uma abordagem proteômica foi possível a identificação de uma série de proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo de touros leiteiros. A identidade dessas proteínas sugere que elas desempenham uma ampla gama de funções, incluindo a modulação do metabolismo espermático, alterações nas propriedades bioquímicas e estruturais da membrana espermática e proteção dos espermatozoides durante sua permanência na cauda do epidídimo.

Este trabalho traz informações inéditas sobre a expressão de proteínas no trato reprodutivo de ruminantes, e sobre a topografia de ligação de algumas delas à membrana de espermatozoides ejaculados, antes e após exposição às secreções do oviduto. Essa é a primeira

etapa no sentido de se compreender de que forma essas proteínas interagem com os espermatozoides, modulando diversas propriedades dessas células. No entanto, estudos complementares são necessários no sentido de se determinar quais delas podem vir a ser marcadores do potencial reprodutivo desses animais.

## 7. REFERÊNCIAS

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

ABBAS, A. *et al.* Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. **Current Genetics**, v. 47, p. 49-56, 2005.

AKERLOF, E. *et al.* Identification of apolipoprotein A1 and immunoglobulin as components of a serum complex that mediates activation of human sperm motility. **Biochemistry**, v. 30, p. 8986-8990, 1991.

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

ALHADEFF, J.A. *et al.* Characterization of human semen  $\alpha$ -L-fucosidases. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 809-815, 1999.

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

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

AMANN, R.P. *et al.* Sperm production of Holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after cannulation of rete testis or vas deferens, and by daily ejaculation. **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 93-99, 1974.

AMANN, R.P.; HAY, S.R.; HAMMERSTEDT, R.H. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 723-733, 1982.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 361-381, 1993.

ARAÚJO, A.A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle**. Tours. **L'Université François-Rabelais de Tours**. Thèse de Doctorat. 200p., 2000.

ATREJA, S.K.; ANAND, S.R. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 686-691, 1985.

AUMULLER, G. *et al.* Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. **Cell and Tissue Research**, v. 252, p. 377-384, 1988.

AVILÉS, M. *et al.* Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral pH optimum  $\alpha$ -L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa. **The Biochemical Journal**, v. 318, p. 821-831, 1996.

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

BAINS, R.; ADEGHE, J.; CARSON, J. Human sperm cells express CD44. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 307-312, 2002.

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

BALEATO, R.M.; AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Vitamin A regulation of BMP4 expression in the male germ line. **Developmental Biology**, v. 286, p. 78-90, 2005.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 235-247, 1993.

BEAULIEU, V. *et al.* Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase recycling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 8452-8463, 2005.

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

BELLIN, M.E. *et al.* Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 173-182, 1996.

BELLIN, M.E.; HAWKINS, H.E.; AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

BERGERON, A. *et al.* Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 461-470, 2005.

BLAQUIER, J.A. *et al.* The role of epididymal factors in human sperm fertilizing ability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 541, p. 292-296, 1988.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-99, 1987.

BONET, S. *et al.* Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. **Human Reproduction**, v. 7, p. 523-528, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BROOKS, D.E. Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. **The Biochemical Journal**, v. 156, p. 527-537, 1976.



BURG, M.B. Molecular basis of osmotic regulation. **The American Journal of Physiology**, v. 268, p. F983-996, 1995.

CABELLO-AGUEROS, J.F.; HERNANDEZ-GONZALEZ, E.O.; MUJICA, A. The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 56, p. 94-108, 2003.

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

CASCIERI, M.; AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 787-793, 1976.

CASTELLANI-CERESA, L. *et al.* Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 203-211, 1993.

CASTELLÓN, E.A.; HUIDOBRO, C.C. Androgen regulation of glycosidase secretion in epithelial cell cultures from human epididymis. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1522-1527, 1999.

CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Glycosidase activities in principal cells, basal cells, fibroblasts and spermatozoa isolated from the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 627-636, 1984.

CHAUHAN, A.K.; MOORE, T.L. Presence of plasma complement regulatory proteins clusterin (Apo J) and vitronectin (S40) on circulating immune complexes (CIC). **Clinical Experimental Immunology**, v. 145, p. 398-406, 2006.

COLAS, G. Seasonal variations of the quality of sperm in the Ile-de-France ram. I. study of the cellular morphology and massal motility. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 20, n. 6, p. 1789-1799, 1980.

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

COOPER, T.G. In defense of a function for the human epididymis. **Fertility and Sterility**, v. 54, p. 965-975, 1990.

COOPER, T.G. Secretory proteins from the epididymis and their clinical relevance. **Andrology**, v. 22, suppl. 1, p. 155-165, 1990.

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

CRICHTON, E.G. *et al.* Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. R1363-1370, 1994.

D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 161-176, 1996.

DACHEUX, J.L. *et al.* Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 319-341, 2005.

DACHEUX, J.L. *et al.* Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 36-42, 2006.

DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. Protein secretion in the epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (eds.) **The epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 151-168, 2002.

DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F.; PACQUIGNON, M. Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 635-651, 1989.

DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy, Research and Technique**, v. 61, p. 7-17, 2003.

DACHEUX, J.L.; PACQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 20, p. 1085-1099, 1980.

DACHEUX, J.L.; VOGLMAYR, J.K. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1033-1046, 1983.

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

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 175-194, 1997.

DE LAS HERAS, M.A. *et al.* Actin localization in ram spermatozoa: effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis. **Tissue and Cell**, v. 29, p. 47-53, 1997.

DEKKER, L.J. *et al.* Depletion of high-abundance proteins from serum by immunoaffinity chromatography: A MALDI-FT-MS study. **Journal of Chromatography B**, v. 847, p. 65-69, 2007.

DENHARDT, D.T. The third international conference on osteopontin and related proteins, San Antonio, Texas, May 10-12, 2002. **Calcified Tissue International**, v. 74, p. 213-219, 2004.

DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annual Reviews on Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 723-749, 2001.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 425-435, 1994.

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

DJAKIEW, D. *et al.* Micropuncture studies of receptor-mediated endocytosis of transferrin in the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 691-699, 1986.

DRUART, X. **Rôle de protéines épидидymaires dans la composition de la membrane plasmique des spermatozoïdes de bélier.** Tours. **L'Université François-Rabelais de Tours.** Thèse de Doctorat. 182p., 1998.

EDWARDS, Y.H.; GROOTEGOED, J.A. A sperm-specific enolase. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 305-310, 1983.

EHRENWALD, E.; FOOTE, R.H.; PARKS, J.E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 195-204, 1990.

EICKHOFF, R. *et al.* Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. **Molecular Medicine**, v. 7, p. 27-35, 2001.

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

FLAHERTY, S.P.; WINFREY, V.P.; OLSON, G.E. Localization of actin in mammalian spermatozoa: a comparison of eight species. **The Anatomical Record**, v. 216, p. 504-515, 1986.

FLICKINGER, C.J. Synthesis and secretion of glycoprotein by the epididymal epithelium. **Journal of Andrology**, v. 4, p. 157-161, 1983.

FORCE, A. *et al.* Electrophoretic characterization of the human sperm-specific enolase at different stages of maturation. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 824-829, 2004.

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

FORESTA, C. *et al.* Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 7, p. 77-82, 1986.

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

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

FOUCHÉCOURT, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Glutathione-independent prostaglandin D2 synthase in the ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 558-566, 1999.

FOUNTOLAKIS, M. *et al.* Depletion of the high-abundance plasma proteins. **Amino Acids**, v. 27, p. 249-259, 2004.

FOUQUET, J.P.; KANN, M.L. Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: fact or artifact? **Microscopy Research and Technique**, v. 20, p. 251-258, 1992.

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

FRENETTE, G. *et al.* Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1586-1592, 2003.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Polyol pathway along the bovine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 448-456, 2004.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 308-313, 2002.

FRENETTE, G.; THABET, M.; SULLIVAN, R. Polyol pathway in human epididymis and semen. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 233-239, 2006.

FUSI, F.M. *et al.* The expression of alpha v, alpha 5, beta 1 and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 169-175, 1996.

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

GADDUM-ROSSE, P. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? **American Journal of Anatomy**, v. 174, p. 347-356, 1985.

GARBERS, D.L.; FIRST, N.L.; LARDY, H.A. Properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 875-879, 1973.

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

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

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

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

GO, K.J.; WOLF, D.P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 145-153, 1985.

GOLDSMITH, H.L. *et al.* Homotypic interactions of soluble and immobilized osteopontin. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 30, p. 840-850, 2002.

GONÇALVES, R.F. *et al.* Effect of frozen semen with osteopontin on *in vitro* bovine fertilization and embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 263-264, 2006.

GONÇALVES, R.F.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Effect of osteopontin on *in vitro* bovine embryo development. In: Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 36, 2003, Cincinnati, **Proceedings...**, Cincinnati-OH, SSR, 2003.



GONÇALVES, R.F.; WOLINETZ, C.D.; KILLIAN, G.J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha_v$  and  $\alpha_5$ ) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 468-474, 2007.

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

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 809-815, 2003.

HANCOCK, L.W.; RAAB, L.S.; ARONSON JR, N.N. Synthesis and processing of rat sperm-associated  $\alpha$ -L-fucosidase. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1228-1238, 1993.

HAO, Y. *et al.* Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 726-733, 2006.

HASLER, J.F. *et al.* Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-152, 1995.

HENAULT, M.A. *et al.* Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 390-397, 1995.

HENDERSON, N.A.; ROBAIRE, B. Effects of PNU157706, a dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 436-443, 2005.

HENKEL, R. *et al.* DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology.

**Reproductive Biomedicine Online**, v. 7, p. 477-484, 2003.

HERMO, L.; ADAMALI, H.I.; ANDONIAN, S. Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup>V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 376-391, 2000.

HERS, H.G. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles.

**Biochimica et Biophysica Acta**, v. 22, p. 202-203, 1956.

HINTON, B.T. *et al.* The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reproduction,**

**Fertility and Development**, v. 7, p. 731-745, 1995.

HINTON, B.T. *et al.* The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. **Current Topics**

**in Developmental Biology**, v. 33, p. 61-102, 1996.

HORAN, A.H.; BEDFORD, J.M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 417-423, 1972.

HOWES, E.A.; HURST, S.M.; JONES, R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 62-72, 2001.

IBRAHIM, N.M. *et al.* Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 887-894, 2000.

JAUHAINEN, A.; VANHA-PERTTULA, T. Beta-N-acetylglucosaminidase in the reproductive organs and seminal plasma of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, p. 239-250, 1986.

JIN, Y.Z. *et al.* Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 490-496, 1997.

JINDAL, S.K.; PANDA, J.N. Maturation changes of goat spermatozoa during transit throughout the epididymis. **Andrologia**, v. 12, p. 328-331, 1980.

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

JOHNSON, G.A. *et al.* Osteopontin: roles in implantation and placentation. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1458-1471, 2003.

JOHNSTON, D.S. *et al.* Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1888-1895, 1998.

KAARTINEN, M.T. *et al.* Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 1729-1735, 1999.

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

KAVANAUGH, J.F.; GRIPPO, A.A.; KILLIAN, G.J. Cannulation of the bovine ampullary and isthmic oviduct. **Journal of Investigative Surgery**, v. 5, p. 11-17, 1992.

KILLIAN, G.J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm functions, fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 141-153, 2004.

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

KIRCHHOFF, C. *et al.* Function of human epididymal proteins in sperm maturation. **Andrologia**, v. 30, p. 225-232, 1998.

KIRCHHOFF, C.; OSTERHOFF, C.; YOUNG, L. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 847-856, 1996.

KNULL, H.R.; WALSH, J.L. Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 33, p. 15-30, 1992.

KOBAYASHI, T. *et al.* Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 674-683, 2002.

KOC, E.C. *et al.* The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome-analysis of the complement of ribosomal proteins present. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 43958-43969, 2001.

KOHN, F.M. *et al.* Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 604-610, 1998.

LANE, M. *et al.* Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 169-175, 1999.

LÉGARÉ, C. *et al.* HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, p. 461-468, 2006.

LÉGARÉ, C.; VERVILLE, N.; SULLIVAN, R. Vasectomy influences expression of HE1 but not HE2 and HE5 genes in human epididymis. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 30-43, 2004.

LEIJONHUFVUD, P.; AKERLOF, E.; POUSETTE, A. Structure of sperm activating protein. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 249-253, 1997.

LEONE, M.G.; HAG, H.A.; SASO, L. Lipocalin type prostaglandin D-synthase: which role in male fertility? **Contraception**, v. 65, p. 293-295, 2002.

LEWIS, G.F.; RADER, D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circulation Research**, v. 96, p. 1221-1232, 2005.

LIAW, L. *et al.* Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 1468-1478, 1998.

LIAW, L. *et al.* Osteopontin and  $\beta 3$  integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate arg-gly-asp-dependent endothelial migration in vitro. **Circulation Research**, v. 77, p. 665-672, 1995.

LIN, C. *et al.* Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 538-543, 2006.

LIN, M.; HESS, R.; AITKEN, R.J. Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. **Reproduction**, v. 124, p. 107-117, 2002.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANJUNATH, P. *et al.* Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 16853-16857, 1989.

MANJUNATH, P. *et al.* Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27-37, 1994.

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

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

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

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

MÉTAYER, S. *et al.* Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1219-1229, 2002b.

MÉTAYER, S. *et al.* Germinal angiotensin I-converting enzyme is totally shed from the rodent sperm membrane during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1763-1767, 2002a.

MÉTAYER, S. *et al.* Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of germinal angiotensin I-converting enzyme. **Biology of Reproduction**, v. 65, 1332-1339, 2001.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 899-915, 1990.

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

MIRANDA, P.V.; BRANDELLI, A.; TEZON, J.G. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase from human epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 18, p. 263-270, 1995.

MIZUKAMI, Y. *et al.* ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 50120-50131, 2004.

MORENO-FIERROS, L. *et al.* F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, p. 172-181, 1992.

MORI, K. *et al.* Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 161, p. 207-211, 1989.

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

MOURA, A.A. *et al.* Desenvolvimento ponderal e testicular em carneiros Santa Inês no estado do Ceará. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Fortaleza, **Anais...**, Fortaleza – CE, SBZ, 1999. CD-ROM.

MOURA, A.A. *et al.* Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006a.

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

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

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



OGATA, Y.; CHARLESWORTH, M.C.; MUDDIMAN, D.C. Evaluation of protein depletion methods for the analysis of total-, phosphor- and glycoproteins in lumbar cerebrospinal fluid. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 837-845, 2005.

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

OLSON, G.E.; WINFREY, V.P.; NAGDAS, S.K. Structural modification of the hamster sperm acrosome during post-testicular development in the epididymis. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 46-55, 2003.

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

PARRISH, J.J. *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PLAVINA, T. *et al.* Combination of abundant protein depletion and multi-lectin affinity chromatography (M-LAC) for plasma protein biomarker discovery. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 662-671, 2007.

POULOS, A.; VOGLMAYR, J.K.; WHITE, I.G. Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 306, p. 194-202, 1973.

RADER, D.J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 3090-3100, 2006.

RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G.C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. **Trends in Cell Biology**, v. 16, p. 79-87, 2006.

REDDY, V.R.K.; RAJEEV, S.; GUPTA, V.  $\alpha_6\beta_1$  integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 1590-1596, 2003.

REYES-MORENO, C. *et al.* Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 500-509, 2002.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (eds.) **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p. 999-1080, 1988.

RODRÍGUEZ, C.M.; DAY, J.R.; KILLIAN, G.J. Expression of the lipocalin-type prostaglandin D synthase gene in the reproductive tracts of Holstein bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 303-309, 2000a.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B. Assessment of sperm fertilizing ability in farm animals. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 29, p. 12-18, 1998.

ROGERS, B.J. *et al.* Cytochalasin D inhibits penetration of hamster eggs by guinea pig and human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 275-282, 1989.

ROSEN, O.M.; RUBIN, C.S.; ERLIGHMAN, J. Properties of the cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine and porcine heart. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 13, p. 173-185, 1975.

ROUSTAN, C. *et al.* Calcium-induced conformational changes in the amino-terminal half of gelsolin. **FEBS Letters**, v. 581, p. 681-686, 2007.

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

SAS Institute Inc., SAS-STAT User's Guide, version 6, 4<sup>th</sup> Ed., vol. 2, Cary NC: SAS Institute Inc., 2003.

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

SINGLETON, C.L.; KILLIAN, G.J. A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. **Journal of Andrology**, v. 4, p. 150-156, 1983.

SKUDLAREK, M.D. *et al.*  $\beta$ -D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 204-213, 1993.

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

SMITH, M.F. *et al.* Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality, and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v. 16, p. 379-397, 1981.

SOUZA, C.E.A. *et al.* Desenvolvimento testicular, idade à puberdade e características seminais em carneiros da raça Santa Inês no estado do Ceará. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa, **Anais...**, Viçosa – MG, SBZ, 2000. CD-ROM.

SOUZA, C.E.A. *et al.* Estudo das interações entre o desenvolvimento gonadal, produção espermática, concentrações de testosterona e aspectos ligados à puberdade em carneiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 199-201, 2003.

SOUZA, C.E.A. *et al.* Protein profile of the oviductal fluid from cyclic cows. In: Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 40, 2007, San Antonio, **Proceedings...**, San Antonio-TX, SSR, 2007.

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.; LIMA, A.C.B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 196-199, 2001.

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

SPUNGIN, B.; MARGALIT, I.; BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2525-2535, 1995.

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

SULLIVAN, R. *et al.* Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, p. 1-10, 2005.

SUN, H.Q. *et al.* Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 33179-33182, 1999.

SYLVESTER, S. *et al.* Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 195-207, 1991.

SYLVESTER, S.A.; GRISWOLD, M.D. Molecular biology of iron transport in the testis. In: DE KRETSEK, D. (ed.) **Molecular biology of the male reproductive system**. San Diego: Academic Press, p. 311-323, 1993.

SYLVESTER, S.A.; GRISWOLD, M.D. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of Sertoli cells. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 381-385, 1994.

SYNTIN, P.; DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1622-1635, 1999.

SYNTIN, P. *et al.* Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 956-974, 1996.

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

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

TASH, J.S.; MANN, T. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in relation to motility and senescence of spermatozoa. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, v. 184, p. 109-114, 1973.

TASH, J.S.; MEANS, A.R. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 75-104, 1983.

TESARIK, J. *et al.* Solubilized human zona pellucida competes with a fucosylated neoglycoprotein for binding sites on the human sperm surface. **Fertility and Sterility**, v. 60, p. 344-350, 1993.

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

THIMON, V. *et al.* Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 881-890, 2005.

TULSIANI, D.R.P. *et al.* Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 417-428, 1993.

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

TULSIANI, D.R.P.; ORGEBIN-CRIST, M.C.; SKUDLAREK, M.D. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. **Journal of Reproduction and Fertility supplement**, v. 53, p. 85-97, 1998.

UHLENBRUCK, F. *et al.* Tissue-specific gene expression as an indicator of epididymis-specific functional status in the boar, bull and stallion. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 53-61, 1993.

UMAR, A. *et al.* Proteomic analysis of androgen-regulated protein expression in a mouse fetal vas deferens cell line. **Endocrinology**, v. 144, p. 1147-1154, 2003.

URADE, Y.; HAYAISHI, O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 259-271, 2000.

VAN PELT, A.M.; DE ROOIJ, D.G. The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 677-682, 1990.

VEERAMACHANENI, D.N.R.; AMANN, R.P. Endocytosis of androgen-binding protein, clusterin, and transferrin in the efferent ducts and epididymis of the ram. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 288-294, 1991.

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

VOGLMAYR, J.K.; WHITE, I.G.; PARKS, R.P. The fertilizing capacity of ram testicular spermatozoa, freshly collected and after storage in cauda epididymal fluid. **Theriogenology**, v. 10, p. 313-321, 1978.

VOGLMAYR, J.K. *et al.* Post-testicular developmental changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 655-667, 1980.

WAI, P.; KUO, P.C. The role of osteopontin in tumor metastasis. **Journal of Surgical Research**, v. 121, p. 228-241, 2004.

WAKABAYASHI, H. *et al.* Inhibition iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 955-957, 1999.

WIGGINS, E.L.; TERRIL, C.E. Variation in penis development in ram lambs. **Journal of Animal Science**, v. 12, p. 524-534, 1953.

WOLF, D.E.; VOGLMAYR, J.K. Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. **The Journal of Cell Biology**, v. 98, p. 1678-1684, 1984.



XUAN, J. *et al.* Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid sequence in osteopontin destroys cell adhesion and migration functions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 57, p. 680-690, 1995.

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

YEUNG, C.H. *et al.* Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 274-280, 1993.

YIN, H.L. *et al.* Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 5271-5276, 1984.

YIN, H.L.; ALBRECHT, J.H.; FATTOUM, A. Identification of gelsolin, a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. **The Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 901-906, 1981.

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

YIN, H.L.; ZANER, K.S.; STOSSEL, T.P.  $\text{Ca}^{2+}$  control of actin gelation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 9494-9500, 1980.

YUAN, H. *et al.* Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 299-307, 2006.

ZHANG, B.R. *et al.* Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 207-216, 1998.

# 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](#)