

EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO
NO PERFIL PROTEICO E NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA
DO SÊMEN EQUINO (*Equus caballus*)

PAULA KAROLINA RANGEL AMORIM

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

FEVEREIRO, 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PAULA KAROLINA RANGEL AMORIM

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO
NO PERFIL PROTEICO E NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA
DO SÊMEN EQUINO (*Equus caballus*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

ORIENTADOR: PROF. Dr MARIA LUISA LÓPEZ ALVAREZ

ORIENTADOR: PROF. Dr CLAUDIO ANDRÉS RETAMAL MARTINEZ

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

Fevereiro, 2008

EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO
NO PERFIL PROTEICO E NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA
DO SÊMEN EQUINO (*Equus caballus*)

PAULA KAROLINA RANGEL AMORIM

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Aprovado em 18 de Fevereiro de 2008.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Clovis José Pascarelli Souza (Centro Exp. Animal do IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (LRMGA, CCTA – UENF)

Prof. Dr. Flávio Costa Miguens (LBCT, CBB – UENF)

Prof.^a Dr. Maria Luisa López Alvarez (LBCT, CBB – UENF)

(orientadora)

Prof. Dr. Claudio Andrés Retamal Martinez (LBCT, CBB – UENF)

(orientador)

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de biologia celular e tecidual, no setor biologia da reprodução do centro de biociências e biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense sob orientação dos pesquisadores Maria Luisa López Alvarez e Cláudio Andrés Retamal Martinez.

Apoio Financeiro:

UENF

FAPERJ

TECNORTE

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernad Shaw

Dedico, ao meu pai, Paulo Amorim, in memoriam, por ter me incentivado mesmo de longe nos momentos em que faltaram forças para continuar. Sei que aonde quer que esteja pai sempre estarás me ajudando a tomar as minhas decisões. Amo-te Pai!!!

Agradecimentos

À professora Maria Luisa López-Alvarez, que viabilizou o desenvolvimento dessa dissertação, pela orientação, exigência e disponibilidade, grande amizade, conselhos e confiança.

Ao professor Claudio A. Retamal, pela amizade e orientação e por todos os ensinamentos repletos de experiência.

Ao professor Angelo Burla Dias, revisor desta dissertação.

À banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões dada a finalização dessa dissertação.

Aos amigos de laboratório: Nathália Curty, Renata Vasconcelos, Roberta Fernandes, Thaisa Domingos, equipe que me ajudou nesse trabalho sob sol ou chuva. Glauber Dias e Joseph Albert. Obrigada pela amizade e paciência comigo!

Ao Arthur Rodrigues técnico do laboratório pela amizade e disposição a colaborar no que fosse necessário

Aos amigos veterinários Bruno e Marcus, que dedicaram tempo e disposição para realização das coletas de materiais.

A todas as pessoas que conviveram comigo no LBCT durante estes anos e que compartilharam comigo os sonhos e as dificuldades.

À Cinthia Costa, pela amizade, companheirismo e incentivo.

À minha mãe, Zelinda Amorim pelos conselhos, amizade, e financiamento.

Ao Pedro Peluzio, meu noivo, que está sempre a me lembrar o quanto a vida é intensa.

À TECNORTE, por outorgar a bolsa de formação que me permitiu desenvolver este trabalho. À FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que me auxiliaram na execução deste projeto e incentivando, acreditaram na sua execução.

INDICE

I. INTRODUÇÃO	15
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. FERTILIZAÇÃO EM MAMÍFEROS	17
2. COMPONENTES DO SÊMEN	20
3. MANOSIDASE NO TRATO REPRODUTIVO	24
4. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN	26
III. OBJETIVOS	
OBJETIVO GERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	
1. MATERIAIS	35
2 METODOLOGIAS	
2.1. OBTENÇÃO DOS EJACULADOS	35
2.2. ANÁLISE SEMINAL	35
2.3. OBTENÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES E FLUIDO EPIDIMÁRIOS	37
2.4. PREPARO DAS AMOSTRAS	38
2.5. CONGELAMENTO DO SÊMEN	38
2.6. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
2.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
2.8. DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DAS AMOSTRAS DE SÊMEN <i>IN NATURA</i>, DILUÍDAS E CRIOPRESERVADAS	39
2.9. DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	40

2.10. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS	41
2.11. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	43
2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
V. RESULTADOS	
5.1. EFEITO DA DILUIÇÃO E DA CRIOPRESERVAÇÃO NA MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO.	45
5.2. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS.	50
5.3. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA.	54
5.4. EFEITO DO PH, ATIVADORES E INIBIDORES NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA.	64
VI DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS	68
VII CONCLUSÕES	76
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação gamética	17
Figura 2 - Reação acrossômica	18
Figura 3 - Esquema de um espermatozóide de mamífero	23
Figura 4 - Movimentação da água intracelular para o meio extracelular	28
Figura 5 - Esquema de anormalidades espermáticas	37
Figura 6 - Fotografia das diferentes regiões do epidídimo	38
Figura 7 - Efeito da diluição na motilidade da célula espermática	46
Figura 8 - Efeito da diluição no vigor da célula espermática	46
Figura 9 - Efeito da diluição na integridade da membrana da célula espermática	46
Figura 10 - Efeito da criopreservação na motilidade da célula espermática	47
Figura 11 - Efeito da criopreservação no vigor da célula espermática	47
Figura 12 - Efeito da criopreservação na integridade da membrana da célula espermática	47
Figura 13 - Fotografias de espermatozóides de <i>Equus caballus</i> tratados com diacetato de carboxifluoresceína – brometo de etídio	48
Figura 14 - Perfil de proteínas espermáticas obtidas de sêmen de <i>E. caballus</i> .	50
Figura 15 - Efeito da criopreservação sobre proteínas espermáticas de sêmen eqüino.	51
Figura 16 - Perfil protéico de espermatozóides <i>in natura</i> , diluídos e criopreservados de <i>E. caballus</i> .	52
Figura 17 - Perfil protéico de proteínas espermáticas da região de cauda epididimária de <i>E. caballus</i> .	53

Figura 18 - Atividade manosidásica em proteínas espermáticas de <i>Equus caballus</i> .	55
Figura 19 - Gel nativo gradiente (4-16% v/v) de poro transverso. Proteína de plasma seminal de <i>E. caballus</i> .	56
Figura 20 - Gráfico de Ferguson do gel nativo gradiente (4-16% v/v) de poro transverso.	57
Figura 21 - SDS-PAGE gradiente (4-16% v/v) de poro transverso. Proteína de plasma seminal de <i>E. caballus</i> .	57
Figura 22 - Gráfico de Ferguson do SDS-PAGE gradiente (4-16% v/v) de poro transverso.	58
Figura 23 - Efeito da concentração salina na atividade manosidásica.	58
Figura 24 - Proteínas de fluido das diversas regiões epididimária e de plasma seminal de <i>E. caballus</i> .	59
Figura 25 - Mobilidade relativa da proteína α -manosidase em condições nativas.	60
Figura 26 - Mobilidade relativa da proteína α -manosidase em condições desnaturante.	60
Figura 27 - Massa molecular relativa da proteína que apresenta atividade manosidásica	61
Figura 28 - Identificação da glicoproteína que apresenta atividade manosidásica.	61
Figura 29 - Efeito da copolimerização do SDS-PAGE com gelatina na atividade manosidásica.	62
Figura 30 - Efeito da criopreservação na atividade manosidásica.	63
Figura 31 - Atividade da manosidase em proteínas de espermatozóides de <i>E. caballus</i>	64

Figura 32 - Atividade da manosidase em proteínas de plasma seminal <i>E. caballus</i>	64
Figura 33 - Curva de pH da atividade manosidásica em espermatozóides	65
Figura 34 - Curva de pH da atividade manosidásica em plasma seminal	65
Figura 35 - Efeito do pH na atividade manosidásica em géis.	66
Figura 36 - Efeito de ativadores CoCl_2 e ZnCl_2 , e swainsonine na atividade manosidásica.	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição do plasma seminal de alguns animais domésticos	21
Quadro 2 - Análise seminal das amostras em estudo	49

RESUMO

A criopreservação de sêmen tem sido vista como uns meios de beneficiar a procriação de animais de importância agrícola. No entanto, o alto índice de fertilidade obtido com sêmen criopreservado de gados não tem sido atingido em outras espécies. A motilidade espermática e a fertilidade do sêmen criopreservado podem variar significativamente entre indivíduos e entre ejaculados de um mesmo ganhão. As principais características da superfície do espermatozóide maduro são adquiridas no epidídimo (durante o processo de maturação) e na ejaculação, pela absorção de componentes específicos do plasma seminal. Alguns destes elementos (proteínases, glicosidases e transferases) estão envolvidos na ligação espermatozóide-ovócito. Considerando a importância potencial de proteínas e glicosidases espermáticas na fertilização, o nosso estudo avaliou o efeito da criopreservação no perfil protéico e na atividade de manosidásica no sêmen de *E. caballus*. Nós observamos que o perfil protéico do espermatozóide criopreservado se assemelha ao de amostras in natura. Porém, algumas diferenças entre o perfil protéico do espermatozóide in natura e do criopreservado foram encontradas. Os ganhões foram agrupados baseando-se na média da motilidade progressiva após a criopreservação. Ganhões com motilidade espermática pós-descongelamento >30% foram classificados como "bons congeladores" (n = 8) e ganhões com motilidade entre <30% e > 20% após o descongelamento foram classificados como "congeladores moderados" (n = 9), e ganhões com motilidade <20% como "maus congeladores" (n=8). A proteína de 21kDa estava presente em todos os animais e diminuiu em abundância após a criopreservação. Nos espermatozóides de animais classificados como "maus congeladores" esta proteína estava em uma concentração menor no sêmen in natura quando comparado com os demais grupos. Nós detectamos que após a criopreservação algumas proteínas diminuem e outras aumentam sua concentração, e este fenômeno varia entre os grupos de ganhões. Esse aumento e/ou diminuição na concentração de proteína, ou desaparecimento de bandas de proteínas após o procedimento de criopreservação pode estar relacionado com a dissolução de proteínas espermáticas no meio extracelular, com a degradação (proteólise) de proteínas devido à tensão sofrida pelo congelamento, ou desagregações de proteínas durante o processo de criopreservação. A expressão da atividade da α -1,4 manosidase foi fluorimétrica e eletroforicamente avaliada nos espermatozóides e no plasma seminal de ganhões. A atividade específica da α -manosidase é significativamente mais alta em espermatozóide da região de cauda epididimária do que em espermatozóides de ejaculado. A atividade manosidásica manteve-se em uma ampla gama de pH, com dois picos distintos (ao redor de pH 4.0 e pH 6.0). A manosidase, analisada por géis não desnaturante, exibiu uma massa molecular de 60 kDa e mobilidade eletroforética de 0,02 em concentrações de poliacrilamida 8%v/v. Em condições desnaturantes a manosidase apresentou uma massa molecular de 180kDa e mobilidade relativa de 0,3. Nós observamos que a atividade de manosidásica foi alterada e pode variar entre os grupos de ganhões pelo processo de criopreservação. A avaliação simultânea de vários parâmetros espermáticos, incluindo a motilidade espermática como também o perfil protéico e a relação da atividade manosidásica com o processo de criopreservação podem levar a uma maior elucidação das diferenças da fertilidade em amostras criopreservadas.

Palavras-chave: criopreservação; sêmen; ganhão; perfil protéico; manosidase

ABSTRACT

Cryopreservation of semen has long been seen as a means of benefiting the breeding of animals of agricultural importance. Nevertheless, with the possible exception of bull semen, a lower fertility is generally accepted as a consequence of cryopreservation. Stored semen has decreased spermatozoal motility and fertility that can vary significantly between individual stallions and between ejaculates within stallions. The main characteristics of the ejaculated sperm surface are acquired in the epididymis (maturation process) and at ejaculation by the adsorption of specific components from the seminal plasma. Some of these elements (proteinases, glycosidases and transferases) are involved in binding to egg receptors during fertilization. Considering the potential importance of sperm proteins and glycosidases in fertilization, the present study was undertaken to investigate the effect of cryopreservation on sperm protein profile and α -mannosidase activity. We observed that the protein profile of frozen-thawed sperm resembles that of fresh samples. However, some differences in protein profile between fresh and cryopreserved sperm exist. The stallions were grouped based on their average visually estimated post-thaw progressive motility. Stallions with spermatozoa having post-thaw motility $>30\%$ classified as "good freezers" (32%) and stallions with average post-thaw motility $<30\%$ and $> 20\%$ classified as "moderate freezers" (34%), and stallions with post-thaw motility $<20\%$ as "poor freezers" (32%). The 21 kDa protein was present in all animals and decrease in protein abundance after cryopreservation. In spermatozoa from "poor freezers" this protein had a smaller concentration in fresh semen. We detected that after cryopreservation some proteins have decreased and others increased their concentration, and these phenomenons vary between the stallions group. Decrease/increase in protein abundance or spot disappearance in sperm after the cryopreservation procedure may be due to either leakage of proteins from spermatozoa to the extracellular medium, to degradation (proteolysis) following freezing-thawing stress, or proteins disaggregations during the cryopreservation process. The expression of α -1, 4 mannosidase activity was fluorometrically and electrophoretically assessed in the spermatozoal and seminal plasma of stallions. α -mannosidase specific activity is significantly higher in spermatozoa from cauda epididymal regions than in spermatozoa from ejaculated. Stallion ejaculated mannosidase maintained their activity in ample range of pH, with two distinct peaks (around pH 4.0 and pH 6.0). The mannosidase, analyzed by nondenaturing electrophoresis, exhibited a molecular weight of 60 kDa and electrophoretic mobility of 0,02 in polyacrilamide 8%v/v. In denaturing assays shows a molecular weight of 180kDa and electrophoretic mobility of 0,3. We observed that the mannosidase activity was altered and can vary between the grouped stallions by the cryopreservation. Analyzing several sperm parameters simultaneously, including sperm motion parameters as well as protein profile sperm by electrophoresis and mannosidase activity, can achieve a more comprehensive evaluation of total sperm function and high correlations between laboratory assays and sperm fertility can be obtained for frozen-thawed stallion spermatozoa.

Keywords: cryopreservation; semen; stallion; protein profile; mannosidase

I. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma tecnologia de grande impacto na indústria agropecuária, uma vez que permite uma maior disseminação do material genético de animais de alto potencial produtivo, possibilita o armazenamento de gametas de animais que não possam, temporariamente ou permanentemente, ser utilizados com fins reprodutivos e contribui na preservação de espécies em extinção. No entanto, o alto índice de prenhez obtido com sêmen criopreservado de bovinos, não tem sido atingido em eqüinos.

Diversos fatores têm concorrido contra o desenvolvimento e aplicação desta técnica em eqüinos, principalmente a elevada sensibilidade do espermatozóide às baixas temperaturas dos processos de congelamento e descongelamento. A diminuição da viabilidade espermática resulta na obtenção de um baixo índice de prenhez, em torno de 40%, por ciclo reprodutivo da égua (GRAHAM, 1996; SNOECK e HENRY, 2001). Além do menor potencial fertilizante do sêmen criopreservado, a proibição do uso de sêmen congelado em algumas associações de raças e os custos dos procedimentos (sincronização do cio, controle folicular da égua, sincronização das datas de ovulação e inseminação; manutenção do sêmen, etc.) têm limitado o uso de espermatozóides criopreservados na inseminação artificial de eqüinos (LOOMIS, 2001; CARNEIRO, 2002).

A reduzida fertilidade dos espermatozóides criopreservados é geralmente atribuída a mudanças nas características biofísicas e bioquímicas de suas membranas, que resultam numa baixa resistência do gameta ao choque térmico (AMMAN e PICKETT, 1987; WATSON, 1995; PARKS e GRAHAM, 1992).

Nas últimas décadas, uma série de proteínas espermáticas tem sido postulada como candidatas a participar no reconhecimento e ligação a moléculas complementares da zona pelúcida. Algumas delas apresentam atividade enzimática como β 1-4 galactosiltransferase, fucosiltransferase e α -manosidase. Existe a hipótese que estas moléculas operariam como uma lectina, reconhecendo sacarídeos complementares na zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994).

Apesar dos avanços das pesquisas nesta área, pouco se sabe em relação à estrutura química e localização dos receptores espermáticos, bem como das moléculas-chave na interação espermatozóide - ovócito; e pouco se conhece sobre

a natureza e mecanismos dos danos provocados pela criopreservação de gametas. Tendo em vista que a alteração de proteínas-chave poderia resultar na perda da motilidade e do potencial fertilizante (CHATTERJEE e GAGNON, 2001; ZILLI *et al.*, 2005) é de grande interesse avaliar o efeito da criopreservação no perfil protéico da membrana plasmática de espermatozóides de eqüinos.

Visando verificar o efeito da criopreservação em algumas características estruturais e funcionais do sêmen de eqüinos, no presente estudo se avaliará o efeito desta metodologia na motilidade, vigor e viabilidade da célula espermática bem como no perfil protéico de espermatozóides de *Equus caballus*. Levando em consideração a hipótese de uma possível participação da α -manosidase na fertilização, se focalizará nossa análise no efeito do congelamento e descongelamento das amostras na atividade desta enzima. O estudo do efeito da criopreservação em proteínas-chave pode ser de grande valor, não só no diagnóstico de problemas de fertilidade, mas também na avaliação de possíveis doadores em programas de inseminação artificial.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. FERTILIZAÇÃO EM MAMÍFEROS

Para atingir a membrana ovocitária, o espermatozóide deve primeiro atravessar a camada de células do cumulus, reconhecer e se ligar à matriz extracelular que rodeia o ovócito, a zona pelúcida (ZP), iniciando uma cadeia de interações celulares que culminarão na fertilização (NIXON *et al.*, 2007) (Fig. 1).

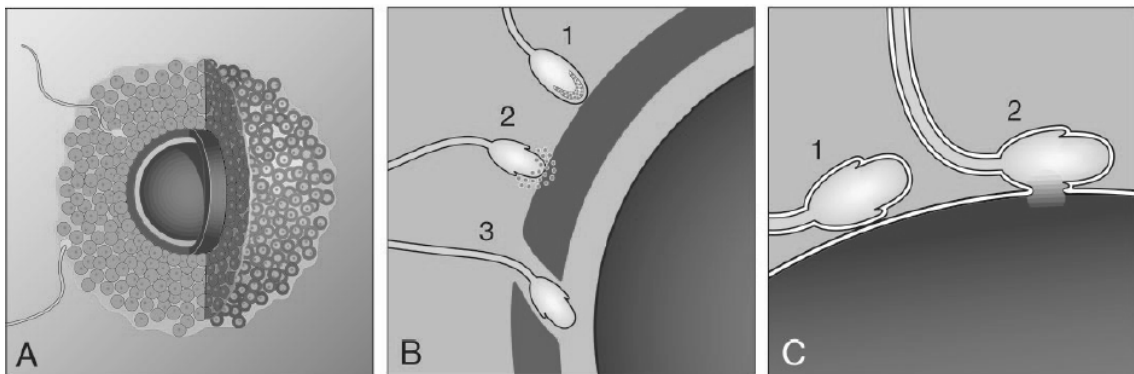


Figura 1 - Interação gamética. A: Passagem dos espermatozóides pelas células do cumulus. B: Interação dos espermatozóides com a zona pelúcida (1), reação acrossômica (2), penetração do espermatozóide na zona pelúcida (3). C: Interação espermatozóide com a membrana plasmática do ovócito (PRIMAKOFF e MYLES, 2002).

A ZP é uma matriz porosa, altamente glicosilada, secretada tanto pelo ovócito em crescimento quanto pelas células que o circundam (SINOWATZ *et al.*, 2001). Na maioria dos mamíferos têm sido descrito três tipos de glicoproteínas sulfatadas ZP1, ZP2 e ZP3, sendo que em outras espécies como suínos e humanos foi identificada uma quarta glicoproteína, a ZP4/B (ARAKI *et al.*, 1992; LEFIEVRE *et al.*, 2004). As proteínas ZP mostram uma grande heterogeneidade, produto de uma glicosilação diferencial da estrutura polipeptídica e/ou da sulfatação de cadeias glicano (SHIMITZU *et al.*, 1983). Esta matriz desenvolve várias funções, como a regulação do perfil endócrino durante a folículo-gênese, reconhecimento espermatozóide - ovócito, ativação espermática e indução da reação acrossômica, barreira

heteroespecífica para a fertilização e proteção ao embrião desde a fertilização à implantação (YAMAGIMACHI, 1994; LIU *et al.*, 1996; SINOWATZ *et al.*, 2001).

Diversas fontes assinalam que na ligação espermatozóide - ZP participariam oligossacarídeos O-ligados da ZP3 (YANAGIMACHI, 1994; WASSARMAN, 1999). Porém a identidade do resíduo oligossacarídeo terminal é tema de controvérsias. Bleil e Wassarman (1990) sugerem que a galactose terminal é crítica, entretanto os trabalhos de Miller e colaboradores (1993b) indicam o grupamento N-acetilglicosamina (GlcNAc) como fundamental. Estes autores sugerem que uma GlcNAc da ZP reconheceria uma galactosil transferase (GalT) presente nos espermatozoides. Outros autores apóiam a participação de cadeias oligossacarídicas híbridas (TULSIANI *et al.*, 1997) e Töpfer e Calvete (1996) sugerem as espermadesinas como proteínas ligantes, entre elas a AWN-1, AQN-1 e AQN-3. Esta interação primária dispara no espermatozóide uma cascata intracelular de sinais que culmina na fusão das membranas plasmática e acrossomal externa e exocitose do conteúdo acrossomal (YANAGIMACHI, 1994; ALLEN e GREEN, 1997) (Fig. 2). A cascata de sinal disparada envolve diversos mecanismos dentre eles, a toxina pertussis (PTx), a proteína-G (WARD *et al.*, 1992; WARD e KOPF, 1993), e um canal aniônico dependente de voltagem que regula o potencial de membrana (FLORMAN *et al.*, 1998; 1999) e resulta na elevação do pH e da concentração de Ca^{2+} (FLORMAN *et al.*, 1999). Recentes estudos sugerem que a reação acrossômica expõe componentes específicos da matriz acrossomal que estabilizam a adesão do espermatozóide com a ZP (KIM *et al.*, 2001a) como a sp56 (KIM *et al.*, 2001b) e a proteína zonadesina (HADEN, 2000).

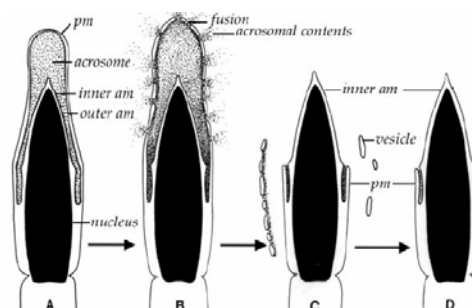


Figura 2 - Reação acrossômica. (A) Espermatozóide com acrossoma intacto. (B) Fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática. (C e D) Espermatozóide com acrossoma reagido (WASSARMAN, 1999).

Após a reação acrossômica, o espermatozóide perde afinidade pela ZP3 e se une a ZP2 via membrana acrossomal interna (MORTILLO e WASSARMAN, 1991; BLEIL *et al.*, 1988). As enzimas hidrolíticas liberadas (proteases, glicosidases entre outras) contribuem facilitando a penetração do espermatozóide na segunda fase da interação espermatozóide – ZP (MILLER *et al.*, 1993b; YANAGIMACHI, 1994). Essas proteases podem estar ancoradas na membrana espermática (ZHU *et al.*, 2001) ou serem proteases solúveis do conteúdo acrossomal (OHMURA *et al.*, 1999).

As interações entre a membrana plasmática do espermatozóide e do ovócito também envolvem duas etapas: a união dos gametas e a fusão de suas membranas (YANAGIMACHI, 1994; ALLEN e GREEN, 1997). Integrinas ($\alpha 1\beta 1$) e proteínas espermáticas (fertilina e DE/CRISP-1n) têm sido propostas como protagonistas da interação entre as membranas de ambos os gametas. Acredita-se que, além da fertilina e equatorina, outros membros da família ADAMs bem como moléculas relacionadas com a proteína DE parecem atuar juntas na união espermatozóide - ovócito, porém suas funções específicas não têm sido estabelecidas (Mc. LESKEY *et al.*, 1998; TOSHIMORI *et al.*, 1998; BREWIS e WONG, 1999).

Ellerman e colaboradores (2006) demonstraram que diferentes inibidores da proteína dissulfeto isomerase (PDI) seriam capazes de inibir a fusão dos gametas *in vitro*. Enquanto que o pré-tratamento de ovócitos não teve nenhum efeito, o pré-tratamento de espermatozóides reduziu a habilidade de fusão deles. Alguns membros da família PDI, detectados na região da cabeça espermática, como a oxidoreductase ERp57, têm sido sugeridos como proteínas que teriam um papel na fusão dos gametas.

A fusão das membranas espermáticas e ovocitárias induzem a exocitose dos grânulos corticais, mudanças estruturais na ZP e bloqueio a poliespermia (MILLER *et al.*, 1993a; Mc. LESKEY *et al.*, 1998; RETAMAL, 1999). Esta série complexa de eventos moleculares, seqüenciais e altamente regulados permite a união dos gametas masculino e feminino, ativação do ovócito e formação de uma nova célula diplóide (zigoto). Os mecanismos que subjazem a esses eventos são alvos principais da pesquisa nesta área. Contudo, ainda não há consenso em relação às proteínas que são essenciais na fertilização, em nenhuma espécie de mamífero.

Em eqüinos, várias proteínas candidatas potenciais a fusão espermatozóide - ZP têm sido identificadas, entre elas, hialuronidase (MEYERS *et al.*, 2000), galactosiltransferase (ENSSLIN *et al.*, 2007) e algumas glicosidases (DIAS, 2002).

Trabalhos prévios de nossa equipe demonstraram a presença de uma proteína (glicoproteína) R_f 0.45 (20kDa) (RETAMAL *et al.*, 1999) com uma seqüência aminoacídica terminal similar à HSP1 descrita por Calvete e colaboradores (1995) em plasma seminal, que poderia participar na interação espermatozóide - ZP (RETAMAL *et al.*, 1999). Duas glicosidases: 1,4 α -glucosidase e 1,4 α -manosidase também foram identificadas pelo nosso grupo em espermatozoides e plasma seminal de eqüinos (DIAS, 2002).

2. COMPONENTES DO SÊMEN

O sêmen, secreção fisiológica produto da atividade dos vários órgãos que compõem o trato genital masculino, contém o plasma seminal e os espermatozoides.

O plasma seminal é um fluido quimicamente complexo, cuja formação se deve as secreções dos testículos, epidídimos, vasos deferentes, vesículas seminais e próstata (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005), e em menor escala as glândulas de Cooper e de Littre (SETCHELL *et al.*, 1994). Além de ser o veículo para o transporte espermático, providencia substratos metabolizáveis e proteção no trato genital feminino, oferecendo condições que viabilizam o processo de fertilização (MARTINS, 2001).

A composição do plasma seminal varia entre espécies e inclusive em um mesmo animal, dependendo das condições em que ele se encontra. É constituído de proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais, vitaminas, hormônios, enzimas, água, íons, imunoglobulinas e agentes antimicrobianos, dentre outros componentes (Quadro 1). Porém o papel de cada um destes elementos não está totalmente elucidado (KIRCHHOFF *et al.*, 1998; MOREL, 1999; KRAVETS *et al.*, 2000; DACHEUX *et al.*, 2003).

Vários fatores devem ser considerados quando se analisa a composição do plasma seminal, entre eles as glândulas acessórias presentes em cada espécie e seqüência temporal com respeito ao lançamento das suas respectivas secreções, o local de deposição do sêmen, a forma de coleta, e as variações entre sucessivas ejaculações (MAN e LUTWAK-MANN, 1981; SETCHELL *et al.*, 1991).

A presença, ausência ou variações na concentração de proteínas e outros componentes do plasma seminal estão provavelmente relacionadas com a

variabilidade de resultados nos estudos sobre efeitos do plasma seminal na fertilização. Embora recentes estudos tenham começado a revelar os segredos das proteínas do plasma seminal, o papel da maioria das proteínas secretadas no trato reprodutivo masculino não está bem elucidado.

Quadro 1 – Composição do plasma seminal de algumas espécies domésticas

Componente	Cavalo	Touro	Cachorro	Coelho	Carneiro	Galo
Proteínas totais ^a	1.2-12	30-80	21-37	-	50	18-28
Frutose ^a	0.02-0.08	1.2-6.0	<0.01	0.4-1.5	1.5-6.0	0.04
Glicose ^a	0.82					
Sorbitol ^a	0.2-0.6	0.1-1.4	<0.01	0.8	0.26-1.7	0-0.1
Ac. Cítrico ^a	0.08-0.53	3.57-10	0.04	-	1.1-2.6	0.0
Inositol ^a	0.19-0.47	0.25-0.46	-	-	0.07-0.15	0.16-0.2
Ac. Ascórbico ^a	-	0.09	-	-	0.05	-
Glicerilfosforilcolina ^a	0.4-3.8	1.1-5.0	1.8	2.5-3.7	11-21	0-0.4
Ac. Glutâmico ^a	-	0.35-0.41	-	-	-	-
Sódio ^a	2.57	2.25	3.32	-	1.78	3.52
Potássio ^a	1.03	1.55	0.31	-	0.89	0.61
Fósforo ^a	0.02-0.07	-	-	-	-	-
Cálcio ^a	0.26	0.4	0.05		0.06	0.1
Magnésio ^a	0.09	0.08	0.04	-	0.06	0.14
Cloro ^a	4.48	1.74-3.2	4.4	-	0.86	1.47
Bicarbonato ^b	-	7.1	2.9	-	7.1	-
α -Manosidase ^c	-	400	-	-	50	-
β -N-acetilglucosamidase ^c	625	15000	-	-	16000	-
pH	6.2-7.8	6.48-7.8	6.1-7.0	6.5-7.5	5.9-7.3	7.2-7.6
Osmolaridade ^d	142-334					

^a valores em mg mL⁻¹

^b valores em mmol L⁻¹

^c valores em unidades mL⁻¹

^d valores em mOsm Kg⁻¹

Fonte: MOREL, 1999.

Os espermatozóides são células altamente diferenciadas que apresentam duas regiões morfológica e funcionalmente diferentes: a cabeça (que contém o núcleo, o acrossoma e escasso citoplasma) e a cauda (onde se localiza o aparelho flagelar). Entre estas duas regiões localizam-se as estruturas da peça de conexão (Fig. 3). A cabeça do espermatozóide eqüino é de forma elíptica, ligeiramente mais

grossa na parte posterior com inserção paraxial do flagelo (LÓPEZ e DE SOUZA, 1991). O núcleo, de cromatina compacta, é delimitado pelo envelope nuclear. Diferentemente dos núcleos somáticos, os poros nucleares são ausentes, exceto na região do envoltório nuclear redundante. Esta re-localização dos poros nucleares coincide com a baixa atividade metabólica do espermatozóide maduro. Só na região basal da cabeça, perto da peça de conexão, há uma pequena área da cromatina descondensada onde a transcrição, tradução e síntese de proteínas ainda são possíveis (DADOUNE, 2004). O acrossoma, uma vesícula especializada derivada do Golgi (MORENO *et al.*, 1998, 2000; RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2002), circunda a matriz acrossomal e contém diversas proteínas e enzimas, entre elas a pró-acrosina/acrosina, hialuronidase, esterases, hidrolases ácidas, as quais estão envolvidas no processo de fertilização (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

A cauda ou flagelo apresenta três regiões denominadas peça intermediária, peça principal e peça terminal. A peça intermediária caracteriza-se por apresentar um envoltório mitocondrial organizado em hélice, ao redor das fibras densas externas (ODF) do axonema. Postula-se que proteínas presentes nesta estrutura, como as VDAC (canais aniônicos dependente de voltagem) poderiam exercer um papel na regulação da motilidade espermática ou integridade estrutural do flagelo (HINSCH *et al.*, 2004; DIAS, 2006). Sampson e colaboradores (2001) demonstraram que a falta de VDAC3 leva a defeitos no axonema, produzindo espermatozóides imóveis e por conseqüência inférteis. Vários pesquisadores apóiam a hipótese de que VDACS transportariam ATP das mitocôndrias para as dineína ATPases mais distais, na peça principal do flagelo, e/ou protegeriam o ATP de hidrólise prematura. Devido à proximidade da região do axonema, que demanda energia, as ODF poderiam servir como uma bateria de armazenamento que proveria ATP quando necessário (HINSCH *et al.*, 2004).

O axonema caracteriza-se pela presença de um par de microtúbulos centrais rodeados por nove pares de microtúbulos periféricos. Entre a peça intermediária e a principal do flagelo localiza-se o annulus ou anel de Jensen. Na peça principal, perde-se a bainha mitocondrial e surge a capa fibrosa. Na peça terminal permanece o complexo do axonema (EDDY e O'BRIAN, 1994).

A membrana plasmática do espermatozóide é uma estrutura de natureza heterogênea que apresenta domínios restritos em composição e função como os domínios acrossomal, do segmento equatorial e pós-acrossomal, na região da

cabeça; e os domínios da peça intermédia, da peça principal e da peça terminal do flagelo (Fig. 3) (PARKS e GRAHAM, 1992; FLESCHE e GADELLA, 2000; CUNHA, 2000).

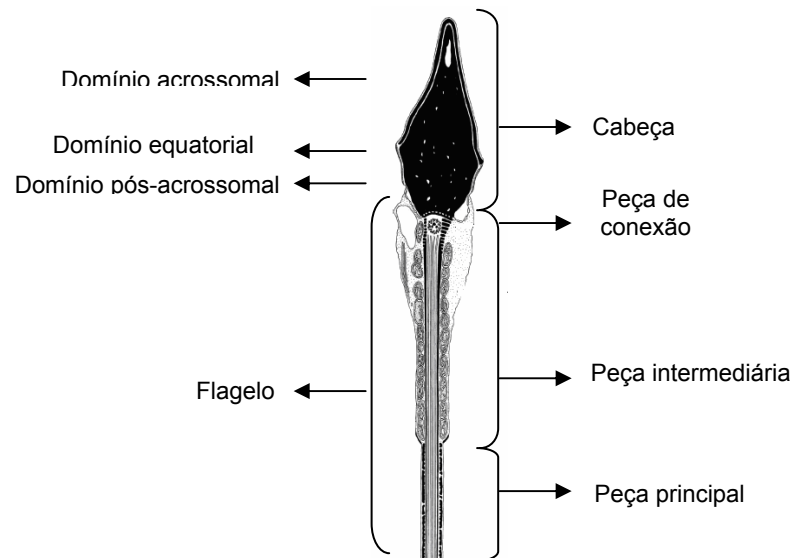


Figura 3 - Esquema de um espermatozóide de mamífero (PESCH e BERGMANN, 2006).

Estes domínios são dinâmicos e experimentam transformações, não só durante a gametogênese ou na maturação do gameta no epidídimo, mas também durante sua exposição aos produtos das glândulas anexas, na ejaculação, e no trato genital da fêmea (EDDY e O'BRIAN, 1994; YANAGIMACHI, 1994; DACHEUX, *et al.*, 1998). A maior parte destes compartimentos é relativamente estável, embora haja evidência de troca de componentes entre eles (COWAN *et al.*, 1987; GADELLA *et al.*, 1994; HUNNICUTT *et al.*, 1997; SHADAN *et al.*, 2004). Existe a hipótese de que a localização de proteínas integrais de membrana em seus respectivos domínios seria regulada em parte pós traducionalmente, e que o sinal da expressão e talvez a síntese da proteína pudesse controlar o destino das proteínas de superfície (MYLES *et al.*, 1990; BARTLES, 1995). Diferenças na densidade e distribuição de proteínas intramembrana, oligossacarídeos de superfície, bem como de moléculas lipídicas (fosfolipídios e colesterol) têm sido observado nos diferentes domínios topográficos de espermatozóides maduros e imaturos de eqüinos, através de estudos de cargas de superfície, citoquímica de glicoproteínas e lipídeos de membrana e pela análise de réplicas de superfície obtidas por criofratura (LÓPEZ *et al.*, 1987; LÓPEZ e DE

SOUZA, 1991; RETAMAL *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2007). A significância dessas modificações não tem sido elucidada, mas a remodelação de componentes de membrana durante os processos de desenvolvimento e maturação do gameta constitui um fino mecanismo de controle que assegura que moléculas-chave estejam na posição correta e no tempo apropriado para mediar diferentes etapas que levam a fertilização (LÓPEZ *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas tem sido postulada a presença de microdomínios e 'rafts lipídicos', estruturas altamente dinâmicas, que variam de 10 moléculas a 100nm de tamanho (SIMONS e TOOMRE, 2000). Khalil e colaboradores (2006) têm demonstrado que o número de 'rafts lipídicos' em suínos aumenta durante a capacitação, juntamente com um aumento de afinidade entre a membrana espermática e a zona pelúcida.

Os mecanismos que mantêm a heterogeneidade da membrana espermática são complexos e pouco se sabe de como esses domínios são mantidos em um ambiente essencialmente fluido (EDIDIN, 1993; JACOBSON *et al.*, 1995; TÖPFER-PETERSEN e WABERSKI, 2001; VEREB *et al.*, 2003). Provavelmente diversos fatores, entre eles associações espontâneas de proteínas ou de outras moléculas que restringem sua difusão, partição termodinâmica, interações de proteínas transmembrana com o citoesqueleto e confinamento de proteínas em regiões determinadas formando barreiras de difusão, participam neste processo (JAMES *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2007).

3. MANOSIDASES NO TRATO REPRODUTIVO

Desde que fora postulado que resíduos de manose presentes na zona pelúcida de ratos e camundongos poderiam estar envolvidos na ligação espermatozóide - ZP (LAMBERT, 1984; SHALGI *et al.*, 1986; AMARI *et al.*, 2001) diversos estudos foram direcionados na detecção de manosidase em espermatozoides de mamíferos (TULSIANI *et al.*, 1989; CORNWALL *et al.* 1991; TULSIANI *et al.*, 1992; DIAS *et al.*, 2004).

As glicosidases são enzimas intracelulares que degradam oligossacarídeos ou glicoconjugados destinados à via lisossomal/endocítica (MILLER *et al.*, 1993a). Contudo, as glicosidases podem também ser secretadas extracelularmente.

Secreções de glicosidases por células epididimárias, como a manosidase, tem sido encontrada em várias espécies, ratos (TULSIANI *et al.*, 1989), eqüinos (DIAS, 2002), suínos (JIN *et al.*, 1999), carneiro (BESANÇON *et al.*, 1985) incluindo o homem (TULSIANI *et al.*, 1990). Essas enzimas têm sido relacionadas com a remodelação de glicoproteínas ou glicolipídios da superfície espermática, dado a sua alta afinidade com o substrato (TULSIANI *et al.*, 1995; CASTELLÓN e HUIDOBRO, 1999; DIAS, 2002; DIAS *et al.*, 2004).

Pelo menos três isoformas da α -manosidase (α -D-manosidase manohidrolase, EC 3.2.1.24) foram descritas em humanos e bovinos. As três formas da enzima diferem em estabilidade, pH ótimo, resposta a ativadores e inibidores e comportamento cromatográfico. A forma α -manosidase ácida é uma enzima lisossomal típica (pH ótimo 3,8-4,6) e em muitos casos tem sido estabilizada ou estimulada com íons Zn^{2+} (PHILLIPS *et al.*, 1974; GRABOWSKI *et al.*, 1980). A forma α -manosidase neutra (pH ótimo 6,0 – 7,0) tem origem citoplasmática e é ativada ou estabilizada por Co^{2+} , Fe^{2+} ou Mn^{2+} (PHILLIPS *et al.*, 1974; SNAITH, 1977). Esta enzima é maior e mais instável do que as outras manosidases. O terceiro tipo de α -manosidase tem um pH ótimo entre o pH ácido e ou neutro (pH 5.3 - 6.0) e é muito sensível a íons Co^{2+} (HIRANI e WINCHESTER, 1979).

Quanto à forma neutra, também presente em espermatozóides humanos e de outras espécies, tem-se sugerido uma ação tipo-ligante no reconhecimento e ligação a moléculas complementares da zona pelúcida, uma vez que a incubação de espermatozóides na presença de concentrações crescentes de açúcares inibidores promove uma redução dose-dependente do número de espermatozóides ligados à zona pelúcida (TULSIANI *et al.*, 1990; CORNWALL *et al.*, 1991).

Os trabalhos de Tulsiani e colaboradores (1989; 1990; 1992) demonstram a presença da enzima α -D-manosidase na superfície espermática de vários mamíferos (ratos, camundongos, hamsters, homens). Esses autores demonstraram que em contraste com a manosidase presente no acrossoma, que apresenta mais atividade a pH 4,4; o pH ótimo da manosidase presente na membrana espermática é de 6,5 (TULSIANI *et al.*, 1989; TULSIANI *et al.*, 1990).

Em eqüinos, resultados obtidos em nosso laboratório (DIAS, 2002, 2004; LANZANA, 2007) mostraram a ocorrência e características da α -manosidase ao longo das vias seminais superiores de *Equus caballus*. Esses trabalhos mostraram que a enzima presente em espermatozóides e fluido epididimário apresenta

diferenças regionais significativas na expressão de sua atividade, sendo mais alta na região da cauda do epidídimo. A atividade enzimática em função do pH e as análises eletroforéticas sugeriram a presença de duas formas moleculares para esta enzima. A presença de várias bandas co-migrando com a banda da enzima em estudo sugere que esta proteína pode estar formando agregados transitórios (DIAS, 2002).

Tendo em consideração os baixos níveis de atividade enzimática nas amostras de fluido epididimário da região de conduto eferente e o aumento significativo na região de corpo e cauda epididimária, tem se postulado que estas enzimas seriam secretadas e/ou ativadas no epitélio epididimário (DIAS, 2002).

A presença desta enzima em forma solúvel e associada à membrana espermática sugere que a enzima presente no fluido possa se associar ao espermatozóide ou modificar proteínas de superfície durante o processo de maturação espermática. O papel desta glicosidase no epidídimo de eqüinos não está estabelecido, mas baseado na sua capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas e o fato de serem ativas no pH do conduto epididimário, permite postular que *in vivo* poderiam estar envolvidas na degradação e/ou modificação de glicoconjugados da superfície espermática ou do fluido epididimário, modificando suas propriedades físicoquímicas e participando assim no processo de maturação espermática e proteção do gameta durante o percurso epididimário. No entanto, são necessários novos estudos visando elucidar seu papel fisiológico.

4. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A criopreservação de espermatozoides é um processo que visa manter a função espermática, por um longo período de tempo, mediante o congelamento e armazenamento destas células a temperaturas muito baixas. Este processo surgiu no fim do século XVIII; porém os primeiros relatos sobre o efeito de baixas temperaturas nos espermatozoides foram feitos por Lazaro Spallanzani em 1776 (citado por Gonzáles, 2006). No entanto, este procedimento só começou a ser aplicado após a difusão dos trabalhos de Polge e colaboradores (1949) que verificaram acidentalmente que as células espermáticas se recuperavam após o congelamento em presença de glicerol. O descobrimento das propriedades

crioprotetoras do glicerol e a disponibilidade de gases líquidos, especialmente o nitrogênio, estimulou a criação de bancos de espermatozoides e a pesquisa nesta área.

O efeito crioprotetor do glicerol relaciona-se a sua capacidade de ligação com a água e a baixa dissociação com sais. Estas propriedades são favorecidas pela sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa. Kundu e colaboradores (2000) acreditam que o mecanismo de proteção desta molécula se deve à capacidade de interação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila do glicerol com átomos de oxigênio dos grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana espermática. Porém, a concentração de glicerol deve ser limitada devido a sua toxicidade (AMANN e PICKET, 1987). Parks e Graham (1992) resumiram alguns efeitos do glicerol sobre a membrana plasmática: redução da fluidez de membrana através da ligação com os fosfolipídios, alterações nos microtúbulos do citoesqueleto, aceleração ou indução da reação acrossomal.

A grande vantagem da criopreservação de espermatozoides é a possibilidade de armazenamento dessas células por tempo indefinido, permitindo sua utilização no momento determinado, além de garantir a conservação das características genéticas de um reprodutor que por afecções, doenças ou morte poderiam ser perdidas. Apesar da diminuição na motilidade dos espermatozoides criopreservados, os avanços nas técnicas de fertilização assistida têm permitido conseguir resultados promissores.

Na agroindústria, esta metodologia tem sido especialmente utilizada na produção de bovinos, suínos, caprinos, aves de granja, bem como para perpetuar linhagens de animais geneticamente superiores, de espécies exóticas ou em vias de extinção. O congelamento de sêmen possibilita a redução nos custos de transporte de material genético animal, facilitando procedimentos de importação e exportação desse material. No entanto, a utilização em eqüinos é mais limitada, já que o índice de nascimentos obtido tem desanimado os produtores de eqüinos (ROBAIRE e VIGER, 1995 e CURRY, 2000).

O primeiro relato de prenhez obtida com sêmen congelado de garanhão foi publicado por Baker e Gandier (1957). No Brasil, o método de congelamento e armazenamento de sêmen eqüino foi introduzido na década de 80, sendo desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal da UNESP (PAPA, 1988).

Desde a primeira criopreservação de espermatozoides, o conhecimento sobre mecanismos de crioinjúria tem sido crescente e conseqüentemente a procura de

métodos de criopreservação tem sido mais intensa. Contudo, ainda é pouco o que se conhece sobre os eventos físicos e químicos que ocorrem durante o congelamento, armazenamento e descongelamento das amostras (HOLT, 2000).

No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado (da temperatura corpórea para a temperatura ambiente). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozóides, desde que estejam diluídos em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura (entre 30 e 0°C) de refrigeração na qual a célula pode sofrer choque térmico e ser severamente danificada, perdendo a motilidade e potencial fertilizante (WATSON, 1981; 1995). Os danos causados pelo choque térmico incluem lesões na membrana espermática, redução do metabolismo de carboidratos e perda de componentes (proteínas, lipídeos, enzimas), entre outros (DROBINSK *et al.*, 1995). Estes danos podem ser minimizados através de um resfriamento controlado e do uso de crioprotetores no meio diluente (WATSON, 1995).

A água pura se congela e forma cristais a 0°C, enquanto o ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de solutos nela contida. Conforme as moléculas de água pura do meio extracelular se cristalizam, a concentração de solutos nas frações fluidas remanescentes do meio, aumenta, diminuindo assim o seu ponto de congelamento.

A membrana plasmática atua como uma barreira para prevenir a formação intracelular de cristais de gelo e conseqüentemente danos às células. Quando a água do meio extracelular congela, os espermatozóides tornam-se presos em canais de líquido do diluente não congelado entre os cristais de gelo (Fig. 4).

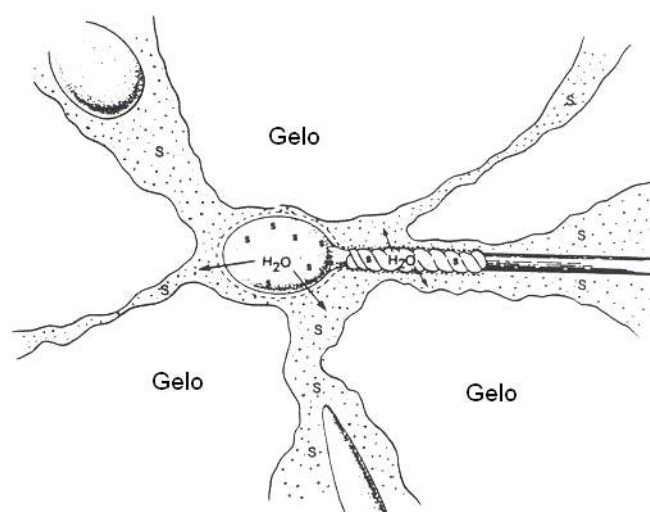


Figura 4 - Movimentação da água intracelular para o meio extracelular. S – soluto. (SILVA *et al.*, 2002).

Mesmo a -196°C (temperatura do nitrogênio líquido), existem canais de água não congelada contendo uma concentração extremamente alta de sais. Inicialmente a água no interior dos espermatozóides não congela, resfriando abaixo do ponto de congelamento da água (super-resfriamento). Conforme a temperatura continua baixando a concentração do meio extracelular aumenta, provocando uma desidratação das células espermáticas, causado pela diferença de osmolaridade entre os meios intracelular e extracelular, provocando assim um aumento da concentração intracelular de solutos.

O que acontece a partir desse ponto depende da curva de resfriamento (Fig. 5) (SILVA *et al.*, 2002). Acredita-se que a taxa ideal para congelamento de células seja lenta o suficiente para prevenir um desfecho letal, mas veloz o bastante para minimizar os efeitos deletérios da exposição prolongada ao meio hipertônico (HOLT, 2000). Essa taxa ótima para o congelamento depende de sua razão superfície/volume e da permeabilidade da membrana plasmática a água. Numa curva de resfriamento lenta ($< -0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$), a água se difunde para o exterior da célula para atingir o equilíbrio osmótico devido à alta concentração de solutos no meio extracelular. Desta forma, os espermatozóides se desidratam e não formam grandes cristais intracelulares de gelo (AMMAN e PICKETT, 1987). Esta desidratação pode resultar em altas concentrações de soluto, provocando o chamado efeito solução, que também é prejudicial à célula (WATSON, 1995). Segundo Amman e Pickett (1987), o descongelamento deve seguir a curva de congelamento, assim o descongelamento do sêmen deve ser de tal forma que o descongelamento dos cristais provoque a diluição dos solutos e lentamente ocorra a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células, causando danos à membrana plasmática.

Por outro lado, numa curva de congelamento rápida ($> -0,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$) não há tempo suficiente para que ocorra a desidratação celular e, em alguma temperatura abaixo de -10°C ocorrerá o congelamento da solução intracelular. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular dependerá do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais. Grandes cristais de gelo podem causar danos mecânicos às células, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento, enquanto os pequenos cristais podem não ser deletérios. O sêmen congelado rapidamente deve ser também descongelado rapidamente de forma que o gelo

intracelular formado durante o congelamento não tenha tempo de recrystalizar (AMMAN e PICKETT, 1987; WATSON, 1995).

Os danos causados durante os processos de congelamento e descongelamento podem ser ocasionados pela formação intracelular de cristais de gelo, pela concentração de solutos resultante do congelamento da água pura e a interação destes dois fatores. No entanto, a adição de crioprotetores ao meio de congelamento faz com que diminua o efeito de solução sobre a célula espermática diminuindo o ponto eutético, ou seja, o ponto que se dá o congelamento, reduzindo assim o tamanho dos cristais de gelo conseqüentemente reduzindo a crioinjúria. A crioinjúria está relacionada com a velocidade de resfriamento (MAZUR, 1984; LEIBO, 1976; WATSON, 1995), sendo recomendável a construção de curvas ótimas de congelamento. O cálculo dos fluxos de água através da membrana depende da derivação de parâmetros específicos da membrana, da condutibilidade hidráulica e da energia de ativação. No espermatozóide estes parâmetros variam em diversos domínios da membrana plasmática. Além disso, interações dos lipídeos de membrana com crioprotetores como o glicerol, podem, afetar esses parâmetros.

Diversos estudos propuseram modelos que predizem o comportamento osmótico celular durante a criopreservação. Em particular, observações de células espermáticas criopreservadas em glicerol não atendem a esses modelos (CURRY *et al.*, 1995; GILMORE *et al.*, 2000; MAZUR e KOSHIMOTO, 2002). Os modelos assumem que o dano celular durante o congelamento rápido é devido à formação de gelo intracelular. No entanto, em trabalhos de Morris e colaboradores (2006, 2007) demonstraram que em espermatozóides humanos não há formação de gelo intracelular e propuseram que a crioinjúria que ocorre durante o congelamento rápido é causada pelo estresse osmótico sofrido durante o descongelamento.

A velocidade de resfriamento ótima é aquela que minimiza a ação deletéria, tanto do efeito de solução como o da formação de grandes cristais de gelo intracelular. As células espermáticas são congeladas a uma taxa de 15-60°C/min, a qual foi empiricamente determinada por dar melhor taxa de sobrevivência (WATSON, 2000). Se a permeabilidade celular e sua energia de ativação fossem conhecidas seria possível prever melhor a taxa de resfriamento compatível com o equilíbrio osmótico e determinar com maior embasamento o protocolo de criopreservação.

Diversos protocolos de congelamento / descongelamento para o sêmen equino têm sido propostos, porém não há ainda uma metodologia que garanta bons índices de prenhez. Além disso, as características dos espermatozóides sobreviventes são diferentes daqueles que não foram submetidos à criopreservação, diminuindo o potencial fertilizante da amostra (WATSON, 1995). A fertilização requer que o espermatozóide e ovócito se encontrem na ampola do oviduto, tendo completado seu processo de maturação. Para espécies que apresentam ovulação induzida, como coelhos ou gatos, a ovulação é desencadeada pelo coito permitindo que a maturação e capacitação dos gametas sejam sincronizadas. Porém, para muitas espécies a situação é mais complexa. A fêmea pode ser receptiva por um período de estro prolongado e a ovulação pode ocorrer em qualquer momento dentro deste período ou após. Com tempos de inseminação e ovulação variáveis, os espermatozóides devem sobreviver no trato da fêmea e ser funcionalmente competentes por vários dias. A heterogeneidade da população espermática, quanto ao grau de maturidade de cada gameta, favorece a fertilização em condições de monta natural, mas não está esclarecido se esta característica se mantém após congelamento e descongelamento das amostras (CURRY, 2000).

Análises de espermatozóides pós-descongelamento mostram diferenças nas características de superfície, quando comparadas com amostras frescas, que poderiam estar relacionadas com uma menor heterogeneidade da população espermática (OLLERO *et al.*, 1998). A perda da heterogeneidade pode ocorrer de duas formas: a) o processo de congelamento/descongelamento pode afetar diferencialmente uma subpopulação de células (mais sensíveis) selecionando uma outra criorresistente, mas não necessariamente fértil; b) a criopreservação pode afetar todas as células de tal forma que mascare as pequenas diferenças entre elas, tornando-se uma população mais homogênea (CURRY, 2000).

Espermatozóides criopreservados sofrem capacitação prematura, o que diminui a capacidade de interação com as células epiteliais do oviduto (CURRY, 2000) interferindo na sua sobrevivência, já que têm se demonstrado que as interações com este epitélio prolongariam a vida dos espermatozóides (THOMAS *et al.*, 1995; DROBINSKI *et al.*, 1995; SUAREZ *et al.*, 2001). Problemas de fertilidade derivados dessas alterações podem ser diminuídos sincronizando inseminação e ovulação (CURRY, 2000).

O grande desafio para a célula espermática no processo de criopreservação, não é a capacidade de resistir à temperatura de armazenamento de -196°C , mas suportar as mudanças ocorridas na faixa crítica de formação de cristais de gelo, zona intermediária de temperatura, (-15 a -60°C), na qual elas passam duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento. Isto é difícil não só pela diversidade das estruturas espermáticas, as quais respondem de forma diferente ao congelamento, mas também por estarem expostas à ação de radicais superóxido durante as mudanças de temperatura (MAZUR, 1984).

Baseado em análises de motilidade e integridade de membrana, aproximadamente 50% dos espermatozóides, de diferentes espécies, sobrevivem às condições do congelamento. As membranas acrossomal e plasmática são mais sensíveis ao congelamento do que a membrana nuclear (SALAMON e MAXWELL, 2000). Os elementos do citoesqueleto também são muito sensíveis à criopreservação. O resfriamento resulta em uma despolimerização prematura dos filamentos de actina (SAUNDER E PARKS, 1999). Spungin e colaboradores (1995) postularam que essa despolimerização dos filamentos de actina é um passo necessário para permitir a reação acrossomal. Proteínas integrais de membrana e canais iônicos são também afetadas pelas mudanças de temperatura, que afetam a fase de transição dos lipídeos e alteram o estado funcional das membranas (DROBNIS *et al.*, 1993). Mudanças bioquímicas, que incluem perda de lipoproteínas e aminoácidos, aumento do sódio, diminuição do potássio, inativação de enzimas como a hialuronidase e acrosina, redução da atividade proteolítica acrossomal, diminuição da atividade de fosfatases, transaminases e desnaturação do DNA, têm sido descritas em espermatozóides criopreservados de bovinos, suínos, felinos, ovinos e humanos (SALAMON e MAXWELL, 1995).

No intuito de maximizar a sobrevivência do gameta, diversos protocolos de congelamento têm sido estudados, buscando minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais, desidratação celular e estresse osmótico (JASKO, 1994). Porém, maiores esforços devem ser realizados não só para compreender as causas da crioinjúria, mas também no intuito de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação, procurando protocolos mais eficientes para cada espécie em particular.

Tendo em vista os antecedentes expostos é de nosso interesse verificar o efeito da criopreservação no perfil protéico e na atividade manosidásica de

espermatozoides maduros de eqüinos; visando contribuir com o estudo de proteínas chave na fertilização ou nos processos que lhe antecedem.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do congelamento no sêmen de eqüinos (*Equus caballus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o efeito do congelamento sobre parâmetros convencionais do espermograma;

Analisar o efeito do congelamento no perfil eletroforético de proteínas espermáticas;

Detecção de atividade manosidásica em plasma seminal e espermatozóides *in natura* diluídos e criopreservados;

Estudar o efeito do pH, ação de ativadores e de inibidores na atividade da manosidase presente em espermatozóides e plasma seminal de eqüinos;

Avaliar o efeito da criopreservação na atividade da enzima α -manosidase;

Relacionar o efeito do congelamento sobre os parâmetros convencionais do espermograma, perfil protéico e atividade manosidásica em amostras seminais de boa, moderada e baixa congelabilidade.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

Os reagentes utilizados foram obtidos de: Bio Rad (Hercules, CA, USA) [EDTA, acrilamida, persulfato de amônio, Temed, Tris, beta-mercaptoetanol, glicina, padrões de massa molecular conhecida para SDS-PAGE]; Sigma (St. Louis, MO, USA) [Bis acrilamida, azul de bromofenol, azul de coomassie R-250, azul brilhante de coomassie G, triton X-100, ácido periódico, dodecil sulfato de sódio, 4-methylumbelliferyl-alpha-D-mannopyranoside, Swainsonine]; Nutricell (Campinas, SP, Bra) [Equimix, FR-5]; IMV Technologies (Fra) [palhetas plásticas de 0,5 mL]. Reagentes de uso geral como ácido clorídrico, glicerol, metanol, etanol, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, formaldeído, fucsina ácida, metabissulfito de sódio, arsenito de sódio, citrato de sódio, frutose etc. foram obtidos da Merck (RJ, Bra) ou VETEC (RJ, Bra).

2. METODOLOGIAS

2.1. OBTENÇÃO DOS EJACULADOS

Foram utilizados 25 garanhões, com idade entre 3 e 12 anos, de bom estado sanitário e nutricional, pertencente a haras da região ou à Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF). Um médico veterinário realizou a avaliação clínica dos animais e a coleta das amostras. O sêmen foi obtido com o auxílio de uma vagina artificial, modelo HANNOVER, seguindo os procedimentos de rotina. Foram realizadas duas coletas de sêmen por animal durante o período experimental. O ejaculado foi transferido para tubos graduados, protegidos da luz e acondicionados em uma caixa de isopor.

2.2 ANÁLISE SEMINAL

Após a coleta e retirada da porção gelatinosa por filtração dos ejaculados, as amostras foram divididas em duas partes, uma parte foi diluída na proporção 1:1 em meio Equimix (Nutricell, SP-Bra) e a outra parte foi mantida em condições *in natura*. As amostras foram transportadas ao laboratório e a fração *in natura* foi colocada em

banho-maria a 37°C, procedendo-se o exame do ejaculado tanto na diluída quanto na *in natura*. Nesta análise foram considerados os seguintes parâmetros:

Volume: a medida do sêmen livre de gel foi feita, à temperatura ambiente, com o auxílio de uma proveta graduada.

Concentração espermática: a concentração espermática das amostras de sêmen (diluído numa proporção 1:200 em solução formol citrato) foi determinada com o auxílio da câmara de Neubauer, sob microscópio óptico com aumento 400x.

Motilidade espermática: A motilidade foi avaliada após a diluição do sêmen em Equimix (1:1) e após o descongelamento das amostras, com auxílio de um microscópio óptico, sob aumento de 400x, colocando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula. A motilidade foi expressa em porcentagem de células móveis, pela avaliação de pelo menos cinco campos. Consideraram-se espermatozóides com motilidade progressiva aqueles que descreveram um deslocamento linear ou um círculo amplo, cujo raio excedia o campo de visualização do microscópio. Os animais estudados foram divididos em três grupos de acordo com a suscetibilidade de seus gametas ao processo de criopreservação: Grupo de boa congelabilidade (motilidade progressiva após o descongelamento $\geq 30\%$); grupo de moderada congelabilidade (motilidade progressiva $\leq 30\%$ e $\geq 20\%$ pós-descongelamento) e grupo de baixa congelabilidade (motilidade progressiva $\leq 20\%$).

Vigor: o vigor do movimento dos espermatozóides foi classificado, com auxílio de um microscópio óptico (400x), em um *ranking* de 0 (ausente) a 5 (vigor máximo).

Integridade da membrana plasmática: A integridade da membrana plasmática foi determinada com as sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (PI), segundo a técnica proposta em Cunha, (2002). Foram contabilizadas 100 células e classificadas como: células com membrana plasmática íntegra (fluorescência verde); células com membrana plasmática lesada (fluorescência vermelha); células com membrana plasmática semi-lesada (fluorescência verde na região acrossomal e vermelho na região equatorial) com o auxílio de um microscópio óptico de fluorescência (400x).

Patologias: esfregaços de espermatozoides foram fixados e corados com rosa de bengala. A figura 6 mostra esquematicamente alguns tipos de alterações na morfologia espermática que podem ser observados em amostras de sêmen.

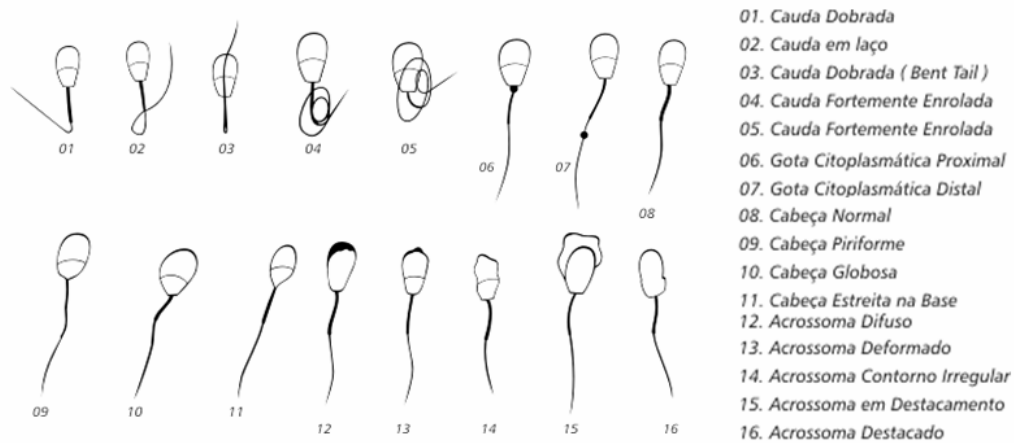


Figura 5 - Esquema de anormalidades espermáticas. Fonte: UFRGS, 2007.

2.3 OBTENÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES E FLUIDO EPIDIDIMÁRIO

Os epidídimos utilizados neste estudo foram obtidos de 3 animais sadios, sexualmente maduros, destinados a castração em haras da região Norte Fluminense. As castrações cirúrgicas foram realizadas utilizando procedimentos de rotina. O transporte dos epidídimos do local da castração ao laboratório foi em média por 2 horas e 30 minutos. Os epidídimos foram cuidadosamente dissecados e divididos em três regiões: (1) cabeça proximal, (2) corpo e (3) cauda (Fig. 7). Cada região foi colocada em uma placa de Petri contendo PBS, pH 7,0 e fragmentada de forma a liberar o conteúdo luminal em 5mL de tampão na região de cabeça proximal e em 10 mL nas regiões de corpo e cauda epididimária. Este foi filtrado em gaze dupla e centrifugado a 700x g por 30 minutos a 4°C, numa centrífuga Hitachi. Neste estudo utilizaram-se apenas os espermatozoides da região de cauda epididimária e o fluido de todas as regiões.

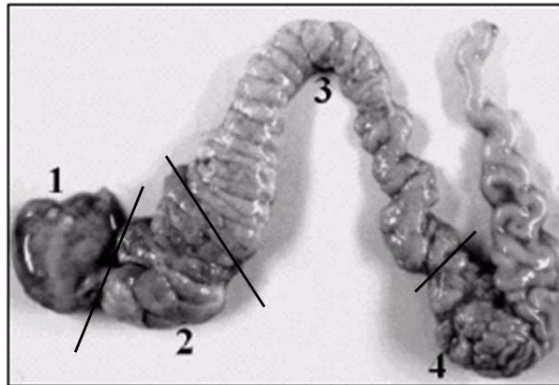


Figura 6 - Fotografia demonstrando as diferentes regiões do epidídimo de *E. caballus*. Regiões de Cabeça Proximal (1); Cabeça Distal (2); Corpo (3); Cauda (4).

2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

O sêmen *in natura* e parte do sêmen diluído foram centrifugados a 500x g de modo a separar os espermatozóides da fração fluída. A fração fluída do sêmen *in natura* (plasma seminal) foi novamente centrifugada a 17000x g e o sobrenadante armazenado a -20°C.

2.5 CONGELAMENTO DO SÊMEN

As amostras foram congeladas segundo o procedimento recomendado por Papa e colaboradores (2002) adaptado no laboratório. O sêmen diluído foi centrifugado a 500x g para obter um pellet de espermatozóides ao qual foi acrescentado o meio de congelamento FR5, de modo a obter uma concentração final de 200×10^6 espermatozóides/mL. As amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5mL, as quais foram lacradas numa extremidade com álcool polivinílico e identificadas com o nome do garanhão e data do congelamento. As palhetas foram mantidas por 1h a 5°C e logo colocadas sobre um suporte dentro de uma caixa de isopor, a 4cm acima do nível de nitrogênio líquido. Após a estabilização no vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido e transferidas com o auxílio de uma pinça para um botijão criogênico (PAPA *et al.*, 2002).

As palhetas com sêmen congelado permaneceram no nitrogênio líquido durante 7 e 30 dias. Foi realizado um experimento preliminar a diferentes intervalos de tempo. Após o período estabelecido, foram descongeladas em banho-maria a 46°C por 20 segundos (DELL'AQUA, 2000). Em seguida, as palhetas foram seccionadas em uma de suas extremidades, coletando-se as amostras necessárias para realizar o espermograma de rotina, detecção da atividade da manosidase e análise do perfil eletroforético de amostras congeladas.

2.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os espermatozóides foram lavados três vezes em PBS, pH 7,0 e centrifugados 760x *g* por 10 min. O pellet obtido foi diluído em tampão de extração (Tris HCl 20mM, EDTA 1mM) com ou sem SDS 1%, sonificado em um equipamento Sonic Dismembrator 60 (Fisher Scientific) de alta intensidade (20 W) durante 15 min [15 ciclos de 30 segundos cada] e centrifugadas a 17000x *g* (4°C) por 30 min (RETAMAL *et al.*, 1999). Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para posterior determinação da concentração relativa de proteínas, análise eletroforética e fluorimétrica.

2.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras foram ensaiadas com as concentrações de BSA variando de 0 a 25µg/mL, com intervalos de 5µg. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (modelo UV-VIS spectrophotometer – Shimadzu), a 595nm de comprimento de onda.

2.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DAS AMOSTRAS DE SÊMEN *IN NATURA*, DILUÍDAS E CRIOPRESERVADAS

As amostras foram submetidas à minigéis sob condições desnaturantes [12 e 8%] (LAEMMLI, 1970). Após a migração eletroforética os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 0,1%, fotografados e as imagens foram guardadas em formato TIFF.

2.9 DETECÇÃO DA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA

2.9.1 Detecção da enzima por fluorimetria

A atividade manosidásica foi determinada fluorimetricamente utilizando como substrato 4-metilumbeliferil α -D-manopiranosídeo 2mM, conforme descrito por Dias (2002). O substrato foi diluído em tampão fosfato 0,2M, pH 6,0 (10 μ L de amostra, 4 μ L de substrato e 6 μ L de tampão). As amostras foram incubadas com o substrato por 1h a 37°C. A reação foi detida com 300 μ L de tampão glicina / NaOH 2M, pH 10,8. Desta solução foram retirados 100 μ L os quais foram adicionados 2mL de água mili-Q para realizar a leitura. A fluorescência emitida pelo produto da hidrólise do substrato [4-metilumbeliferona (4-MU)] foi medida com auxílio de um fluorímetro F 4500 (Hitachi), utilizando 360nm de comprimento de onda de excitação e 460nm de emissão. A intensidade de fluorescência foi convertida em μ moles de 4-MU liberados, por minuto, a 37°C, pela interpolação com uma curva de calibração (0 a 200 μ moles) de 4-metilumbiliferona. Uma unidade de enzima foi definida como a atividade que liberou 1 μ mol de produto (4-MU) por minuto, a 37°C. Os valores do branco foram subtraídos da média dos valores (obtidos em duplicata) das amostras analisadas.

2.9.2 Detecção da atividade enzimática em géis de poliacrilamida

Para padronização dos experimentos as amostras foram primeiramente submetidas a géis gradiente de poliacrilamida (4-16%) de poro transversal sob condições nativas e desnaturantes (RETAMAL e BABUL, 1988). Após a migração eletroforética os géis foram lavados em água destilada por três vezes e transferidos para uma solução de Triton X-100 2,5%, por 30 min. Logo foram lavados em água destilada e incubados com um tampão fosfato 0,2M pH 6,0 (15 min) (DIAS, 2002). Sobre o gel foi espalhada uma fina camada de tampão fosfato 0,2M pH 6,0 (200 μ L) contendo 7,5 μ L do substrato 4-MU ou uma fina camada de tampão acetato 0,2M, pH 4,0 (200 μ L) contendo 7,5 μ L do substrato 4-MU. A incubação foi realizada a 37°C durante 1h, ao abrigo de luz. Os géis foram colocados sobre um transluminador ultravioleta para fotografar a reação fluorescente das bandas com atividade enzimática. Posteriormente os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie

R-250 0,1%, fotografados e as imagens foram guardadas em formato TIFF para posterior sobreposição.

O ensaio em condições nativas permite determinar a massa molecular nativa da enzima, através da análise dos gráficos de Fergusson desenhado a partir das curvas formada pela proteína no gel poro transversal com relação ao gradiente de poliacrilamida imposto. Os valores da mobilidade relativa (R_f) foram graficados no modelo de Ferguson descrito por Retamal e Babul (1988). Os gráficos foram desenhados a partir do logaritmo dos valores do R_f da proteína [$100 \times \log (100 \times R_f)$] *versus* a concentração de poliacrilamida. O valor do coeficiente angular da reta gerada foi utilizado para inferir a massa molecular baseado nas retas obtidas a partir de experimentos realizados com proteínas de massas conhecidas nas mesmas condições (padrão).

Após a padronização as amostras foram submetidas à minigéis sob condições nativas [7, 8 e 10%] (DAVIS, 1964), desnaturantes [10 e 6%] (LAEMMLI, 1970) e nativo/desnaturante gradiente (6-12%) (DIAS, 2002). Após a migração eletroforética os géis foram tratados para visualização da atividade manosídica como descrito acima.

2.10 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

2.10.1 Efeito do pH, de ativadores e inibidores sobre a atividade enzimática presente em amostras de espermatozoides e plasma seminal.

Visando avaliar o efeito do pH através de análises fluorimétricas sobre a atividade da enzima α -manosidase foram utilizados diferentes tampões glicina/ácido clorídrico 0,2M (pH 3,0 – 3,5) acetato 0,2M (pH 4,0 – 5,5) e fosfato de sódio 0,2M (pH 6,0 – 8,0) com intervalos de pH de 0,5. Nos ensaios de inibição foi utilizado o swainsonine, inibidor da forma lisossomal ácida da α -manosidase (SKUDLAREK e ORGEBIN-CRIST, 1988). E nos ensaios de ativação da α -manosidase foram utilizados CoCl_2 e o CoZn_2 que ativam as formas neutra e ácida, respectivamente (JAUHAINEN e VANHA-PERTTULA, 1986).

Ensaio de inibição e ativação enzimática foram realizados também em géis de poliacrilamida desnaturantes 6% (LAEMMLI, 1970), com objetivo de verificar o efeito do cloreto de cobalto (CoCl_2) e cloreto de zinco (ZnCl_2) e swainsonine através de géis. Após a corrida eletroforética os géis foram preparados para incubação com o

substrato conforme descrito acima (item 2.9.2). A solução de CoCl_2 1mM e ZnCl_2 1mM foram utilizadas como ativadores e o swainsonine como inibidor da α -manosidase. A incubação com os inibidores e ativadores ocorreu por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida o substrato foi adicionado ao gel e a incubação ocorreu por uma hora a 37°C , ao abrigo de luz.

2.10.2 Análise do perfil eletroforético de proteínas seminais

As proteínas de espermatozóides e plasma seminal foram submetidas à eletroforese unidimensional em minigéis de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas [7%] (DAVIS, 1964) e desnaturantes [6 e 8%] (LAEMMLI, 1970). Os géis foram revelados com azul brilhante de Coomassie R-250 (REISNER, 1984) e PAS (ácido periódico – Schiff) (GANDER, 1984) para proteínas e glicoproteínas respectivamente. A todas as amostras foram acrescentados 10 μL de solução salina contendo NaCl 400mM, K_2HPO_4 8mM, no intuito de melhorar a resolução das bandas do gel. A eletroforese foi realizada a 90V durante a passagem pelo gel concentrador e 110V durante a migração pelo gel separador, a temperatura ambiente. Após a migração os géis foram tratados para visualizar a atividade manosidásica conforme descrito acima (item 2.9.2).

2.10.3 Detecção de atividade proteásica.

As amostras de plasma seminal foram também submetidas a eletroforeses em géis desnaturantes de poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970), na presença de 0,4 % de gelatina (MÉTAYER *et al.*, 2002 adaptado) e com acréscimo de 10% de β -mercaptoetanol no tampão de amostra. Os géis com gelatina foram incubados em Triton X-100 2,5%, diluído em H_2O , durante 3h e posteriormente foram lavados em água destilada e incubados com um tampão fosfato 0,2M pH 6,0 (15 min). Sobre o gel foi espalhada uma fina camada de tampão fosfato 0,2M, pH 6,0 (200 μL) contendo 7,5 μL do substrato 4-MU. A incubação foi realizada a 37°C durante 1h, ao abrigo da luz. Os géis foram colocados sobre um transluminador com ultravioleta para fotografar a reação fluorescente das bandas com atividade enzimática. Logo o mesmo gel foi incubado em tampão de incubação (Tris 50mM, NaCl 200mM, CaCl_2 4mM, pH 7,5) a 37°C por 72h (adaptado de MÉTAYER *et al.*, 2002) para detectar atividade proteásica. Posteriormente os géis foram visualizados através de luz ultravioleta em lâmpada *Vilber Loumat*, e logo corados com azul brilhante de coomassie R-250 e

descorados em água destilada em ciclos de lavagem de 2 min. em microondas (LG comercial) com potência máxima.

2.11 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

A quantidade relativa das proteínas presentes nos géis de amostras de espermatozóides e plasma seminal foi determinada usando o programa Gel-perfect (BOZZO e RETAMAL, 1991), a partir da imagem dos géis no formato TIFF obtidas em um scanner comercial em 400 dpi. O programa calcula a mobilidade relativa (R_f) de cada banda e a área ocupada por ela, dando também uma representação diagramática das bandas protéicas e sua concentração relativa em relação ao total de proteínas por canal. A massa molecular relativa das bandas protéicas foi calculada por comparação da sua mobilidade eletroforética com proteínas de massa molecular conhecida, que co-migraram no mesmo gel, utilizando o mesmo programa já assinalado.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados de integridade de membrana, e atividade manosidásica foram submetidos à estatística descritiva (médias, desvio padrão) e análise de variância utilizando o programa computacional Excel versão 7.0. Na análise de variância foi adotado o nível de 5% de significância para todos os parâmetros avaliados no experimento de atividade. Para interação não significativa entre os fatores, as médias dos níveis de cada fator foram comparadas pelo teste *t* student independente dos níveis do outro fator.

Os resultados de motilidade e vigor foram submetidos à análise da variância (ANOVA) inteiramente casualizado. A variância foi testada com teste F de Fisher utilizando um programa computacional SAEG 10. Na análise da variância o nível de significância adotado foi de 0,0001%.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1 EFEITO DA DILUIÇÃO E DA CRIOPRESERVAÇÃO NA MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO.

Em uma primeira etapa foi avaliado o efeito da diluição das amostras na motilidade, vigor e integridade do espermatozóide. Foi constatado que a diluição das amostras em meio Equimix (1:1) não só inibia a aglutinação dos espermatozóides, mas preservava melhor a motilidade, vigor e viabilidade da célula espermática. A motilidade espermática das amostras diluídas foi significativamente maior ($p < 0,0001$) que aquela das amostras *in natura* (Fig. 7). Contudo, observaram-se variações individuais entre garanhões e inclusive entre amostras de um mesmo garanhão. O vigor do batimento flagelar, também melhorou significativamente ($p < 0,0001$) nas amostras diluídas (Fig. 8). Nos ensaios de viabilidade espermática observou-se uma maior percentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra nas amostras diluídas quando comparadas com as amostras *in natura*. A análise estatística dos resultados obtidos demonstrou que essas diferenças foram significativas ($p < 0,05$) (Fig. 9).

Os ensaios realizados com as amostras criopreservadas por um período entre 2h e 30 dias indicam que motilidade progressiva e vigor diminuem de forma significativa logo após as duas primeiras horas de congelamento das amostras (Fig. 10 e 11). Em relação ao teste de viabilidade celular representado na figura 12, as análises das amostras *in natura* e criopreservadas demonstraram um aumento significativo de células com membrana plasmática lesada ($p < 0,05$).

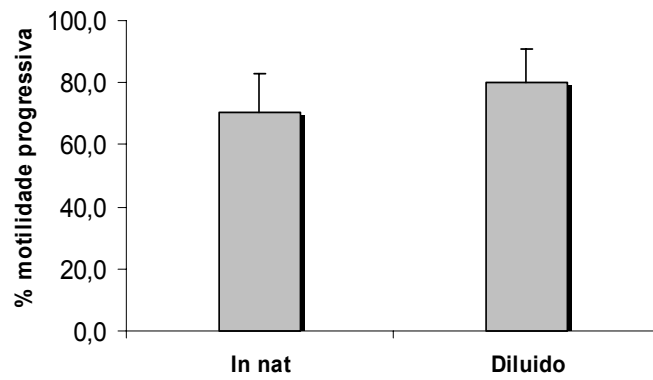


Figura 7 - Efeito da diluição na motilidade da célula espermática. ($p < 0,0001$)

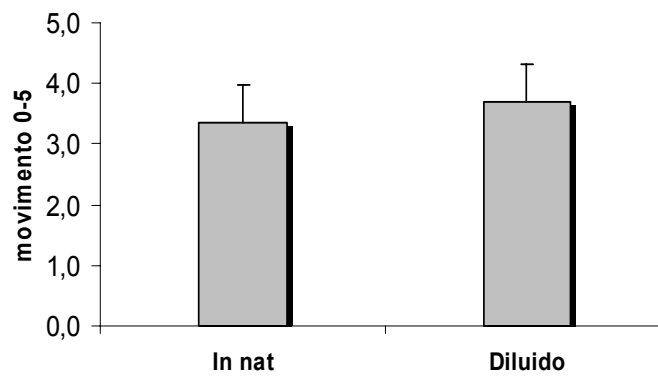


Figura 8 - Efeito da diluição no vigor da célula espermática. ($p < 0,0001$)

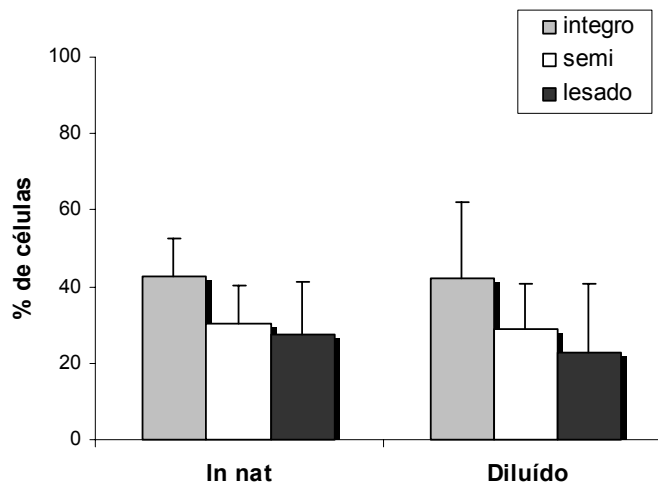


Figura 9 - Efeito da diluição na integridade da membrana espermática. O gráfico representa a percentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (barra cinza), semi-lesada (barra branca) e lesada (barra preta). ($p < 0,05$)

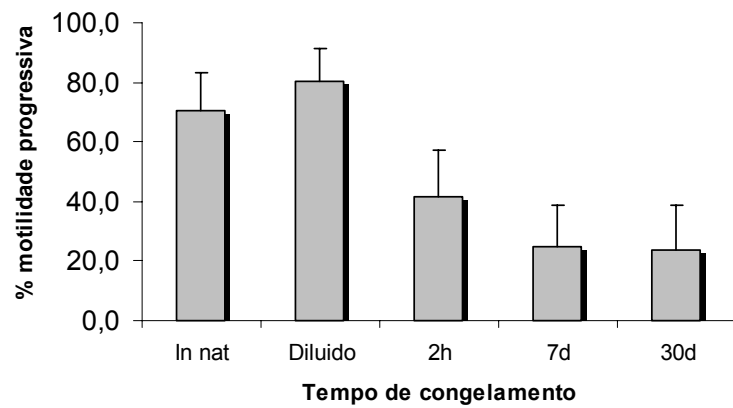


Figura 10 - Efeito da criopreservação na motilidade da célula espermática. O gráfico representa a motilidade versus tempo de congelamento. ($p < 0,0001$)

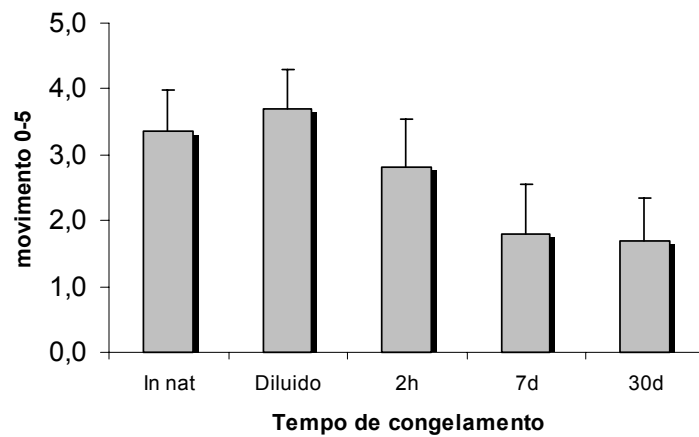


Figura 11 - Efeito da criopreservação no vigor da célula espermática. O gráfico mostra a relação do vigor do batimento flagelar versus tempo de criopreservação. ($p < 0,0001$)

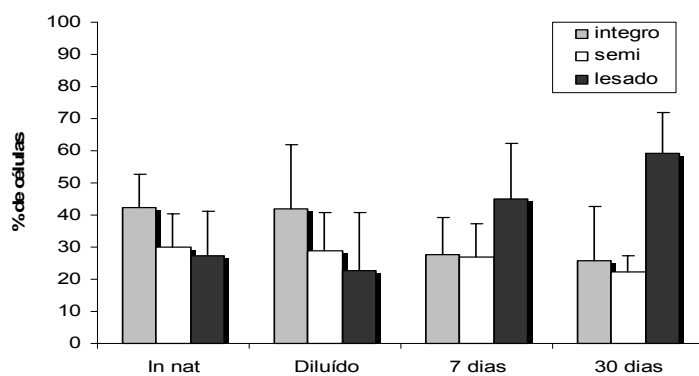


Figura 12 - Efeito da criopreservação na integridade da membrana espermática. O gráfico representa a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (barra cinza), semi-lesada (barra branca) e lesadas (barra preta). ($p < 0,05$)

Na figura 13 são mostradas microfotografias representativas de células marcadas com carboxifluoresceína e iodeto de propídio apresentando membrana plasmática íntegra (A); células com a membrana plasmática lesada (B); células com a membrana plasmática semi-lesada (C).

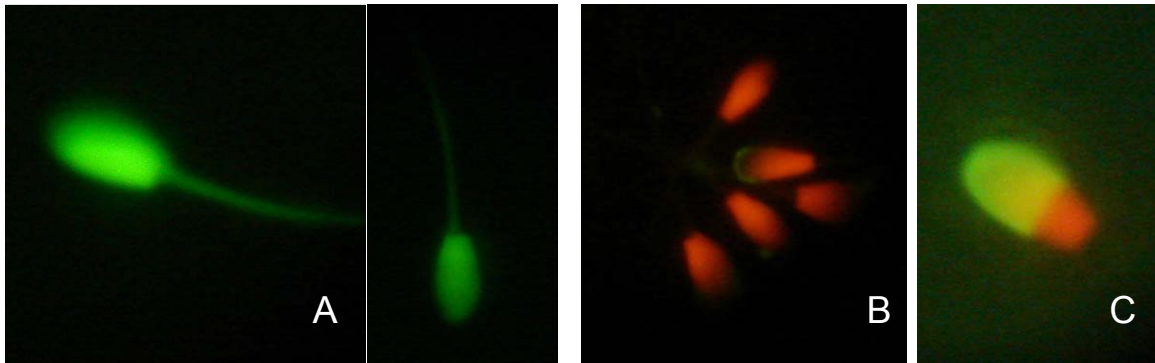


Figura 13 - Microfotografias de espermatozóides de *Equus caballus* tratados com diacetato de carboxifluoresceína – iodeto de propídio.

Como se observa no quadro 2 após 7 e 30 dias de congelamento a média de espermatozóides com motilidade progressiva decresce de 83% a 41% com 7 dias de congelamento mantendo-se nessa percentagem aos 30 dias de congelamento no primeiro grupo de animais (n=8) que foram classificados como animais de boa congelabilidade baseados na susceptibilidade de seus gametas ao processo de congelamento (motilidade progressiva $\geq 30\%$). Já no segundo grupo (n=9) a média de espermatozóides com motilidade progressiva diminuiu de 80% a 22% aos 7 dias de congelamento mantendo-se nesta condição aos 30 dias sendo classificado como grupo de animais com moderada congelabilidade (motilidade progressiva $\leq 30\%$ e $\geq 20\%$), e o terceiro grupo de animais (n=8) a motilidade decresce de 78% para 12% chegando a 8% aos 30 dias classificados como de baixa congelabilidade (motilidade progressiva $\leq 20\%$). A motilidade média dos 25 animais estudados foi 80% versus 25% após 7 dias de congelamento. Tomando em conjunto os 25 animais analisados, foi possível verificar que em 32% dos reprodutores o sêmen foi classificado como sêmen de 'boa congelabilidade', 34% de "moderada congelabilidade" e 32% de "baixa congelabilidade".

O vigor do batimento flagelar, nas amostras diluídas de sêmen de "boa congelabilidade" correspondia em média a um valor de 4 decrescendo a 2,7 após 7 e 30 dias de congelamento. As amostras classificadas como de "moderada

congelabilidade”, apresentaram em média o vigor 3,3 nas amostras diluídas e de 1,2 nas amostras congeladas. Nos animais que apresentaram baixa percentagem de células com motilidade progressiva após a criopreservação, o vigor também diminuiu de 3,8 para 1,6 pós-descongelamento.

Quadro 2
Análise seminal das amostras em estudo

	<i>In natura</i>				Diluído			Criopreservado			
	Vol. mL	[] x 10 ⁶	Mot. P	Vigor	Mot. P	Vigor	Pat	7 dias		30 dias	
								Mot. P	Vigor	Pat.	Mot. P
Boa congelabilidade (n=8)	35,9 ± 16,8	288 ± 461,5	70 ± 12,1	3,5 ± 0,5	83 ± 8,2	4 ± 0,5	15 ± 8,4	41 ± 15,1	2,7 ± 0,6	18 ± 7,7	41 ± 12,3
Moderada congelabilidade (n=9)	28,6 ± 11,4	176 ± 100,5	69 ± 10,1	3 ± 0,4	80 ± 9,4	3,3 ± 0,4	20 ± 5,5	22 ± 10,5	1,2 ± 0,7	19 ± 7,6	22 ± 2,6
Baixa congelabilidade (n=8)	38,1 ± 20,3	117 ± 61,9	73 ± 6,0	3,3 ± 0,4	78 ± 8,9	3,8 ± 0,4	15 ± 8,4	12 ± 9,6	1,6 ± 0,8	15 ± 7,1	8 ± 5,8
Total	34,2 ± 16,3	193 ± 267	70,8 ± 9,5	3,3 ± 0,1	80,3 ± 8,8	3,8 ± 0,5	17 ± 7,6	25 ± 16,8	1,8 ± 0,9	17,8 ± 7,3	23,7 ± 15,6

5.2 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS.

Os diferentes animais analisados mostraram um perfil eletroforético semelhantes, mostrando algumas diferenças na concentração relativa de proteínas e/ou na resolução de algumas bandas protéicas. As figuras 14, 15 e 16 apresentam géis SDS-PAGE e seus respectivos densitogramas de proteínas obtidas de espermatozóides maduros de eqüinos (*E. caballus*). A figura 14 mostra as bandas de proteínas espermáticas, obtidas do sêmen de seis garanhões, em um gel SDS-PAGE 8% v/v.

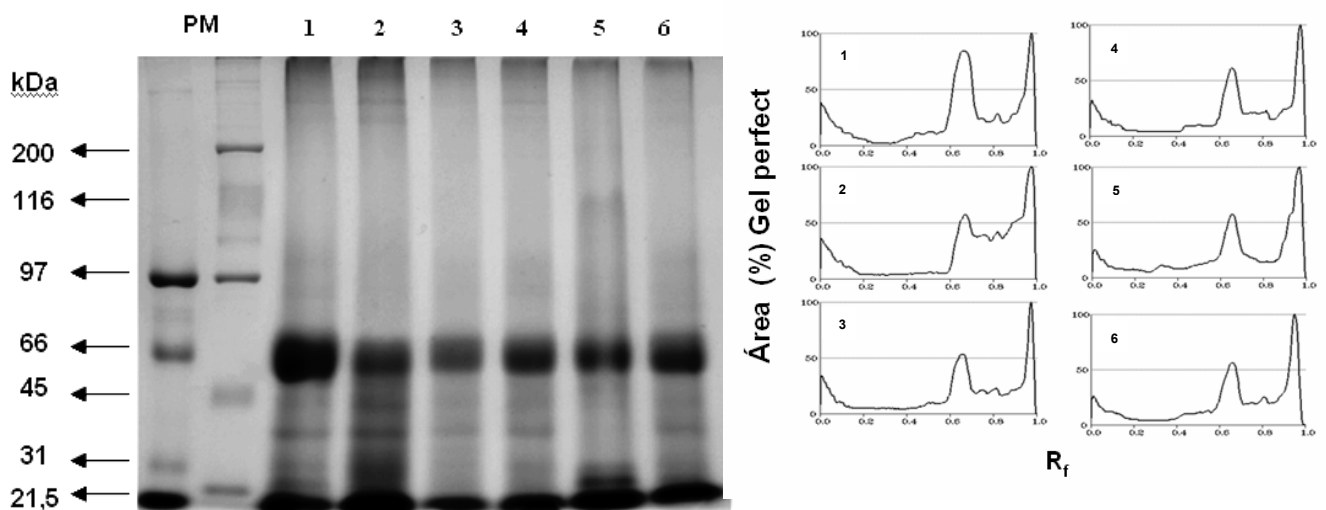


Figura 14 - Perfil de proteínas espermáticas obtidas de sêmen de *E. caballus*. Gel SDS-PAGE 8% v/v corado com azul brilhante de coomassie R-250 e os respectivos densitogramas. 1 - 6 animais diferentes- **PM** – padrão de peso molecular.

Várias bandas protéicas entre 200 e 14 kDa foram observadas, sendo majoritárias as proteína de 66, 31 e 21 kDa. Foram observadas ainda outras bandas de menor intensidade em torno a 51, 43, 36, 30 e 23 kDa. A concentração relativa de cada banda protéica em relação ao total de proteínas por canal foi calculada densitometricamente (Fig.14).

No gel SDS-PAGE 8% v/v observa-se o perfil de proteínas espermáticas *in natura* e criopreservadas representativo das amostras de sêmen de congelabilidade

moderada (Fig. 15). Algumas bandas protéicas após a criopreservação são mantidas, enquanto outras se rearranjam ou estão em menor concentração relativa (setas menores). Aparecem ainda outras bandas, de massas moleculares maiores e melhor resolvidas (setas maiores). A análise densitométrica mostra que algumas proteínas diminuem sua concentração relativa nas amostras criopreservadas (bandas de massa molecular de ~ 103, 90 e 85 kDa enquanto outras aparecem ou aumentam sua concentração relativa: 118, 80 e 76 kDa).

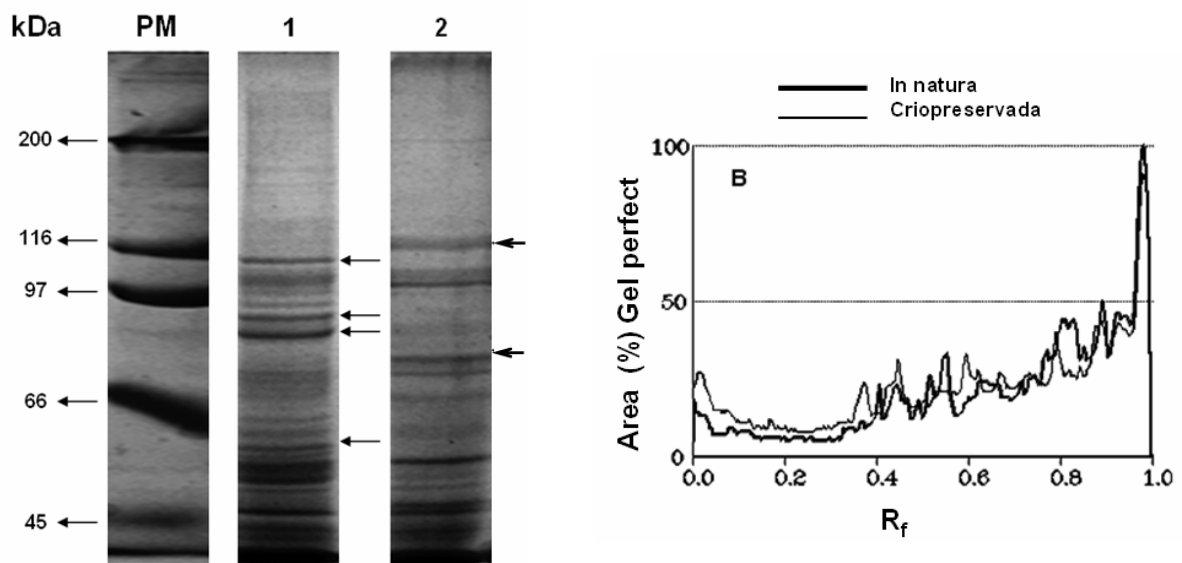


Figura 15 - Efeito da criopreservação sobre as proteínas espermáticas de sêmen eqüino. Gel SDS-PAGE 8% v/v corado com azul brilhante de coomassie R-250. 1 amostra *in natura*; 2 amostra criopreservada. Análise densitométrica correspondente. PM – padrão de peso molecular

As proteínas espermáticas obtidas de sêmen *in natura*, diluídas/resfriadas e congeladas de amostras classificadas como de boa congelabilidade; e de uma outra amostra de um animal representativo do grupo de baixa congelabilidade foram submetidas a um gel desnaturante 12% v/v (Fig. 16). Várias bandas protéicas entre 200 e 14 kDa podem se observadas nestes géis. As proteínas majoritárias são aquelas de massas moleculares: ~73, 63, 43, 30, 28, 21 e 14 kDa. O perfil eletroforético das proteínas presentes no sêmen *in natura* e diluído é similar, mostrando somente diferenças de concentração; entretanto quando se comparam estas amostras com as criopreservadas o perfil protéico se altera, como se observa nos densitogramas.

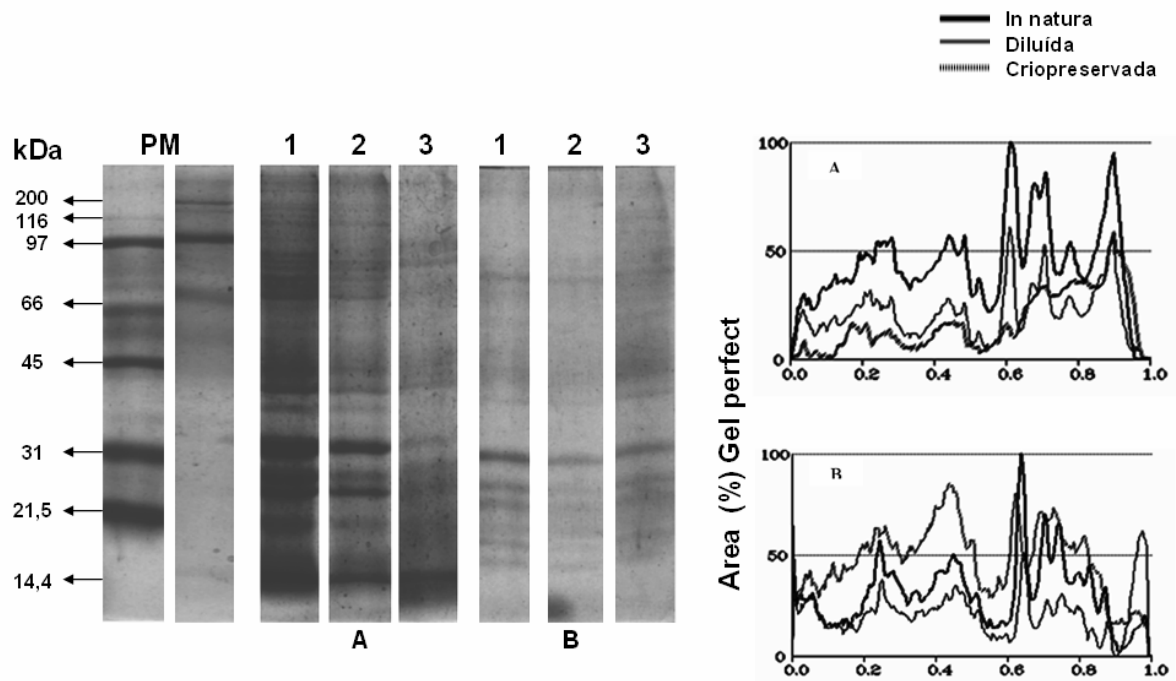


Figura 16 – Perfil protéico de espermatozóides *in natura*, diluídos e criopreservados de *E. caballus*. SDS-PAGE 12% v/v de proteínas obtidas de espermatozóides de sêmen de “boa congelabilidade” (A) e de sêmen de “baixa congelabilidade” (B) e as análises densitométricas correspondentes. Amostras *in natura* (1), diluídas (2) e criopreservadas durante 7 dias (3). **PM** – padrão de peso molecular.

As amostras de sêmen de baixa congelabilidade apresentam menor número de bandas e em menor concentração; assinalando provável proteólise de proteínas. A proteína de 21 kDa diminuiu após a criopreservação nos diferentes grupos de animais, porém parece estar em menor concentração relativa nos espermatozóides de animais, cujo sêmen considerou-se de baixa resistência aos processos de congelamento/descongelamento. Concomitantemente, em animais que apresentaram baixa resistência, apareceram outras bandas protéicas, de maior massa molecular (43, 36 e 28 kDa) Em animais cujos espermatozóides foram mais resistentes ao processo de congelamento esta proteína também diminuiu, porém não se observou a formação de bandas protéicas de maior massa molecular e sim de menor peso 22, 16 e 14 kDa (Fig. 16).

Alguns ensaios foram realizados com espermatozóides maduros obtidos da região da cauda do epidídimo. Os perfis eletroforéticos de espermatozóides epididimários *in natura* e criopreservados são relativamente similares, sendo

majoritárias as bandas de massa molecular ~ 66, 53, 44, 31, 27, 24 e 21 kDa. A figura 17 mostra que as proteínas de 31 e 24 kDa estão em menor concentração relativa nos espermatozóides criopreservados que nas amostras *in natura* (setas menores). Outras bandas protéicas, de maior massa molecular como as proteínas de 180, 90 e 70 kDa aparecem mais resolvidas nos espermatozóides criopreservados (setas maiores).

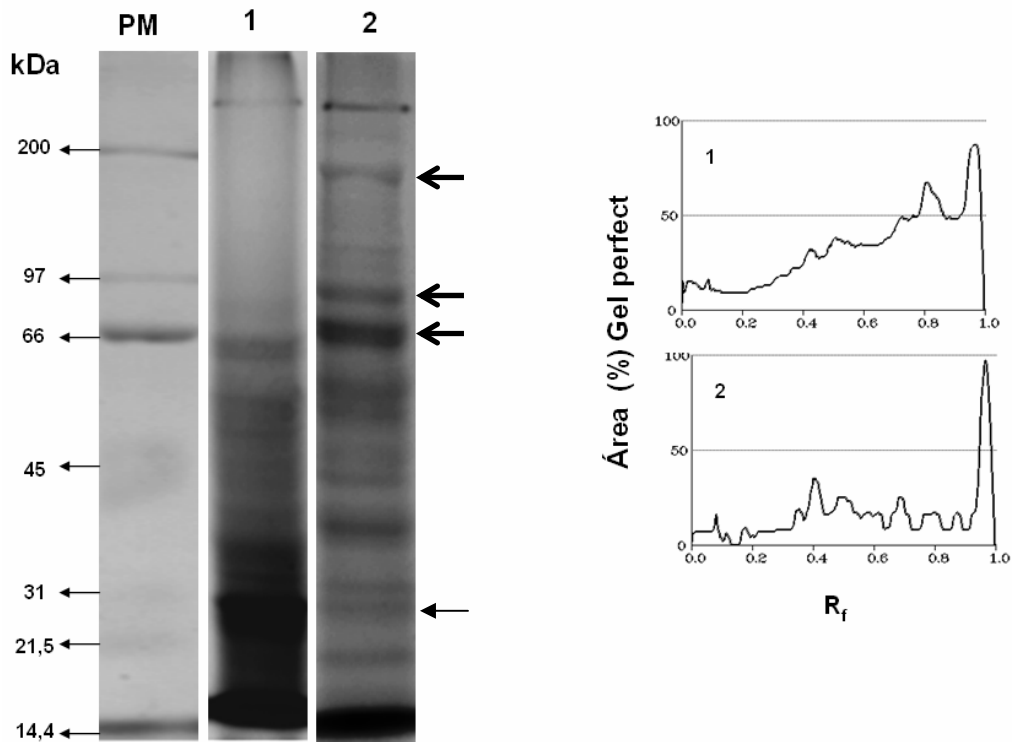


Figura 17 - Perfil de proteínas de espermatozóides da região de cauda epididimária de *E. caballus*. SDS-PAGE 8% v/v corado com azul brilhante de coomassie R-250. Amostra *in natura* (1); amostras criopreservadas por 30 dias (2). **PM** - padrão de peso molecular.

5.3 EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA

a) Análise fluorimétrica

A atividade manosidásica presente nas amostras foi determinada fluorimetricamente utilizando como substrato 4-metilumbeliferil manopiranosídeo (4-MU). Esta metodologia demonstrou a presença da enzima em espermatozóides maduros de ejaculado de eqüinos embora em menor concentração relativa que a atividade detectada em espermatozóides obtidos da região de cauda epididimária (dados não mostrados).

Os diferentes ensaios realizados demonstraram que a atividade específica da enzima é maior em plasma seminal, quando comparada com amostras de espermatozóides. Utilizando o substrato 4-MU, verificou-se uma atividade enzimática relativa de 36mmoles/min/mL/mg de proteína no plasma seminal, enquanto que em espermatozóides a atividade específica correspondeu a $3,07 \times 10^{-4}$ mmoles/min/mL/mg.

O congelamento não afetou de forma significativa ($p < 0,05$) a atividade manosidásica, verificou-se um aumento da atividade enzimática após o descongelamento das amostras de sêmen de boa congelabilidade, em amostras *in natura* foi de 1687×10^{-7} mmoles/min/mL/mg e criopreservadas por 30 dias 1848×10^{-7} mmoles/min/mL/mg (Fig.18). Os mesmos ensaios foram realizados em nosso laboratório no grupo de animais considerado de “baixa congelabilidade”, porém observou-se uma diminuição significativa da atividade específica da enzima nas amostras criopreservadas (Faria, 2004).

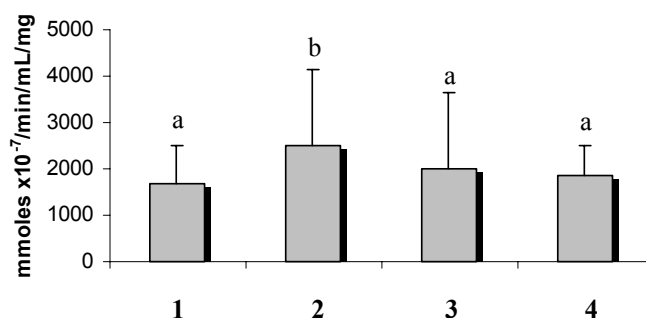


Figura 18 - Atividade manosidásica em proteínas espermáticas de *E. caballus*. O gráfico representa o efeito da criopreservação na atividade manosidásica com o substrato 4-MU. Amostras in natura (1); amostra criopreservada por 2h (2); amostra criopreservada por 7 dias (3); amostra criopreservada por 30 dias (4). ($p < 0,05$). Letras diferentes há significância.

b) Análise em géis de poliacrilamida

A detecção da atividade manosidásica também foi realizada em géis de poliacrilamida em condições nativas, desnaturantes, nativa/desnaturante e em géis condições nativas de poro transversal, no intuito de caracterizar parcialmente a enzima α -manosidase.

Em uma primeira etapa, durante a padronização da técnica, a detecção da atividade foi realizada em géis em gradientes de concentração de poliacrilamida de 4 - 16% em condições nativas e desnaturantes (Fig. 19 e 21). Os resultados obtidos permitiram recomendar a utilização de concentrações entre 6-10% de poliacrilamida na preparação dos géis. O ensaio em condições nativas permitiu também determinar a massa molecular nativa dessa enzima, através da análise dos gráficos de Ferguson, desenhados a partir das curvas formadas pela proteína no gel poro transversal com relação ao gradiente de poliacrilamida imposto, e inferir que a relação carga/massa dessa proteína é muito positiva. A massa molecular nativa da enzima α -manosidase foi de 60 kDa (Fig. 20). Este cálculo baseou-se na curva de massa molecular/motilidade eletroforética obtida dos dados de Retamal e Babul (1988).

O comportamento eletroforético da proteína no gel desnaturante permitiu afirmar que esta proteína é pequena, pois mesmo na presença do agente desnaturante SDS, que quebra ligações não covalentes, essa proteína não migrou

muito em géis com concentrações de poliacrilamida baixa (4%). O gráfico de Ferguson nos apresentou dois coeficientes angulares ($M1 = -13,37$ e $M2 = -1,75$) devido à presença de duas bandas de atividade, o que nos mostra a presença de duas espécies diferentes (Fig. 22). Foi possível observar também que a enzima apresenta uma alta atividade específica já que é necessária pouca quantidade de proteína para expressar uma alta atividade.

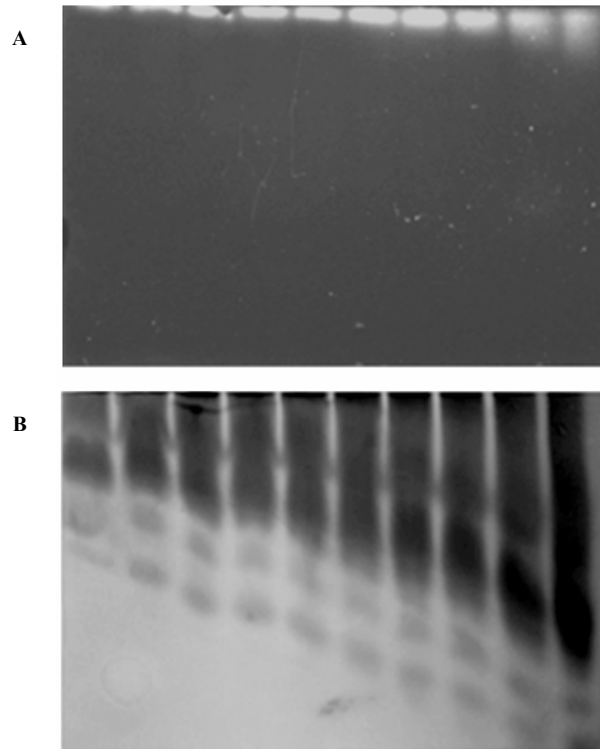


Figura 19 - Gel nativo gradiente (4-16% v/v) de poro transverso. Proteína de plasma seminal de *E. caballus*. Gel tratado para atividade manosidásica (A); gel corado com azul de coomasie R-250 (B).

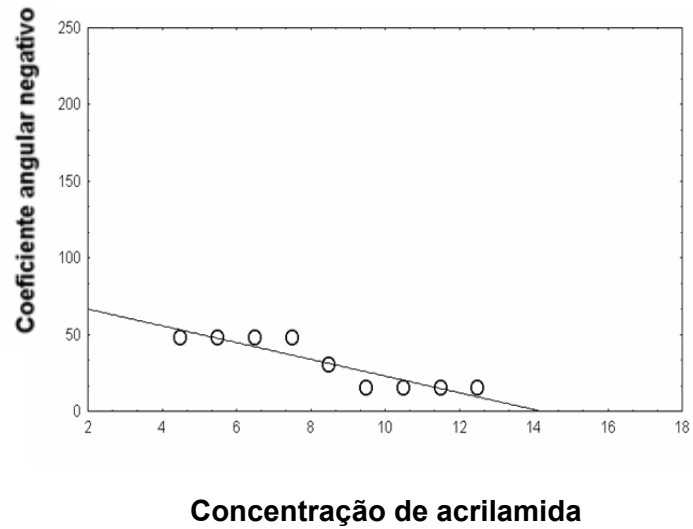


Figura 20 - Gráfico de Ferguson do gel nativo gradiente (4-16% v/v) de poro transverso. Coeficiente angular negativo 5,75.

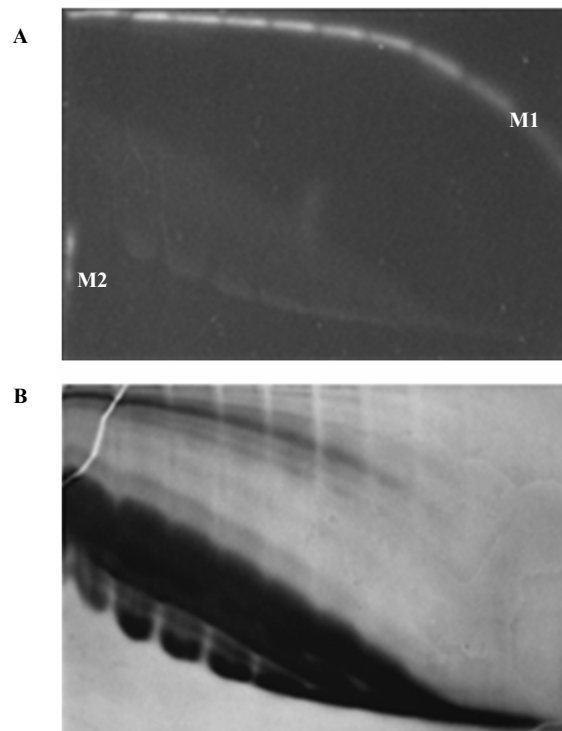


Figura 21 - SDS-PAGE gradiente (4-16% v/v) de poro transverso. Proteína de plasma seminal de *E. caballus*. Gel tratado para atividade manosidásica (A); gel corado com azul brilhante de coomassie R-250 (B).

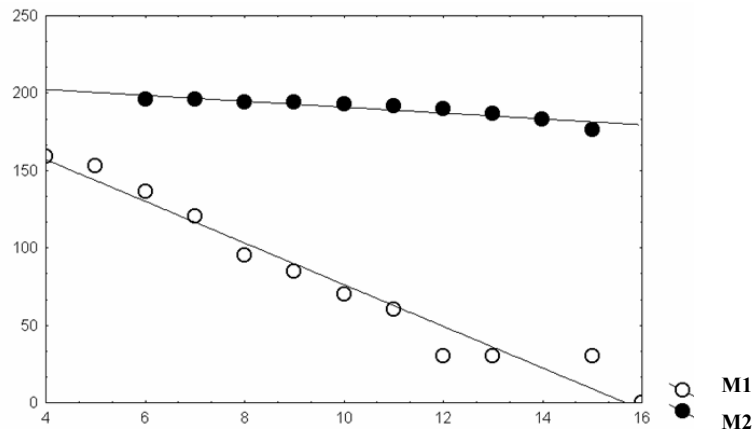


Figura 22 - Gráfico de Ferguson de SDS-PAGE gradiente (4-16% v/v) de poro transverso. Coeficiente angular negativo 13,37 e 1,75.

Durante os ensaios de padronização foi também verificado que a atividade enzimática diminui à medida que a concentração salina aumenta, logo, a atividade específica também aumenta (Fig. 23).

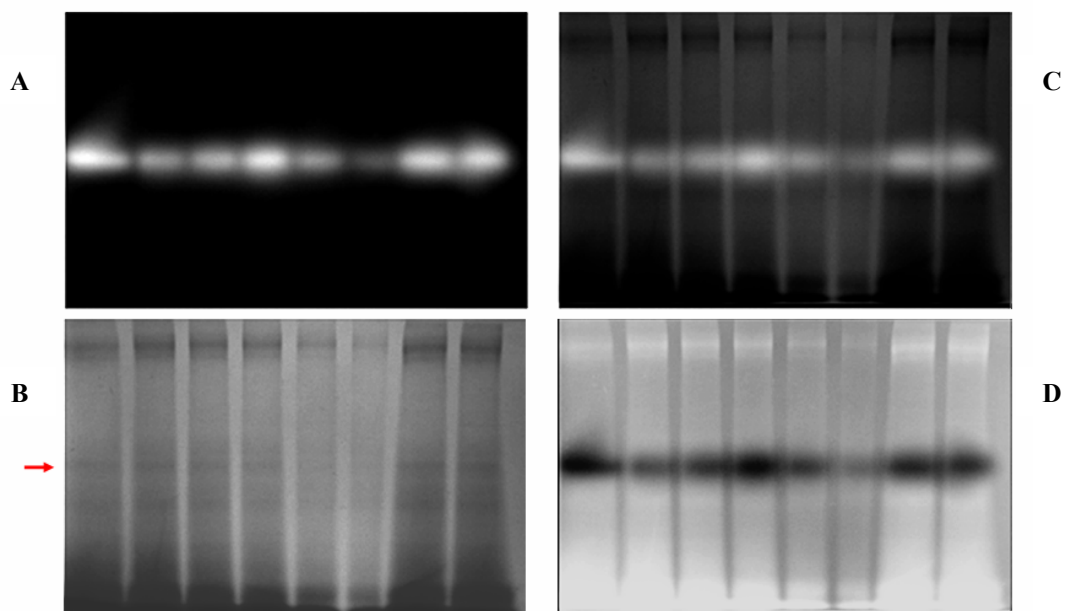


Figura 23 - Efeito da concentração salina na atividade manosidásica. SDS-PAGE 6% v/v de proteínas de plasma seminal de *E. caballus* tratado para atividade manosidásica (A); corado com azul brilhante de coomassie R-250 (B); Sobreposição de imagens (C); Inversão da sobreposição (D).

A atividade manosidásica presente no plasma seminal é menor que a detectada no fluido obtido das regiões de corpo e cauda epididimária (Fig. 24). Este resultado sugere que a enzima pode ser sintetizada e/ou ativada na região de corpo e cauda epididimária. Também foi possível notar a diferença na mobilidade relativa da proteína que apresenta a atividade manosidásica no fluido epididimário (R_f 0,39) e no plasma seminal (R_f 0,44).

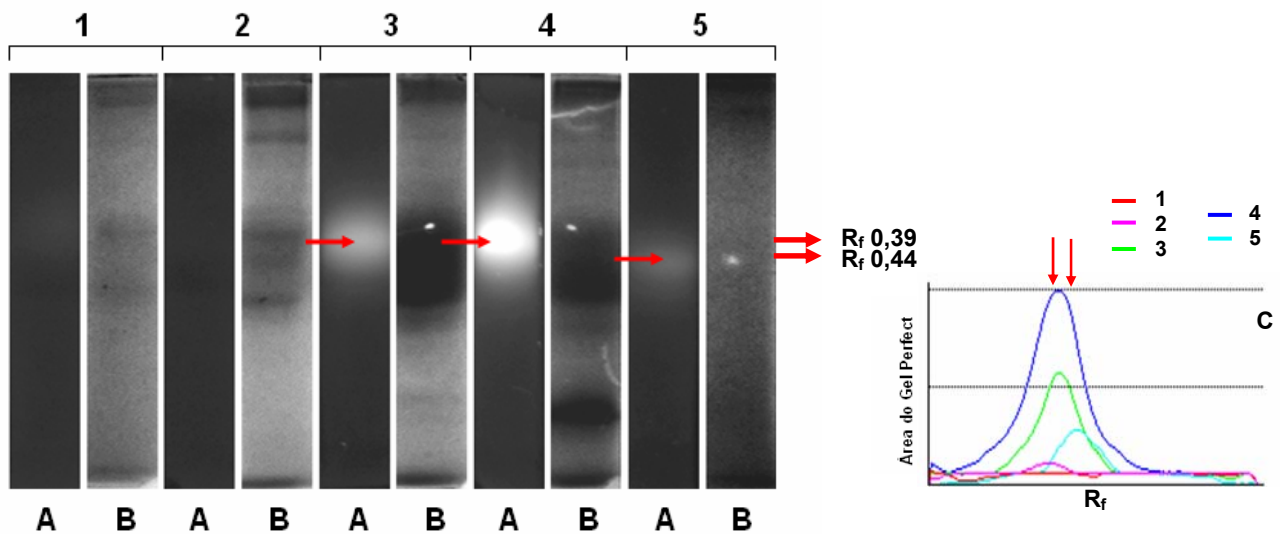


Figura 24 - Proteínas de fluido das diversas regiões epididimária e de plasma seminal de *E. caballus*. Gel nativo 7% v/v tratado para atividade manosidásica (A); corado com azul de coomassie (B); gráfico comparativo das mobilidades relativas (C); fluido da região de cabeça proximal (1); fluido da região de cabeça distal (2); fluido da região de corpo (3); fluido da região de cauda (4); plasma seminal (5).

As análises em géis de poliácridamida 8% v/v em condições não desnaturante, mostraram uma banda de atividade manosidásica com mobilidade relativa (R_f) 0,02 em amostras de espermatozóides e de plasma seminal de equinos (Fig. 25), sendo a atividade nas amostras de espermatozóides muito baixa. A análise densitométrica mostra que a banda de atividade nas amostras de espermatozóides corresponde a uma área aproximadamente três vezes menor que a área ocupada na amostra de plasma seminal.

Em géis 2D (nativo-SDS) gradiente de 6 -12% v/v de poliácridamida observamos uma extensa banda que apresentou atividade manosidásica com R_f 0,3 em condições desnaturantes (Fig. 26).

A atividade da α -manosidase também pôde ser visualizada em géis desnaturantes (Fig. 27), o que permitiu calcular a massa molecular relativa da enzima em 180 kDa.

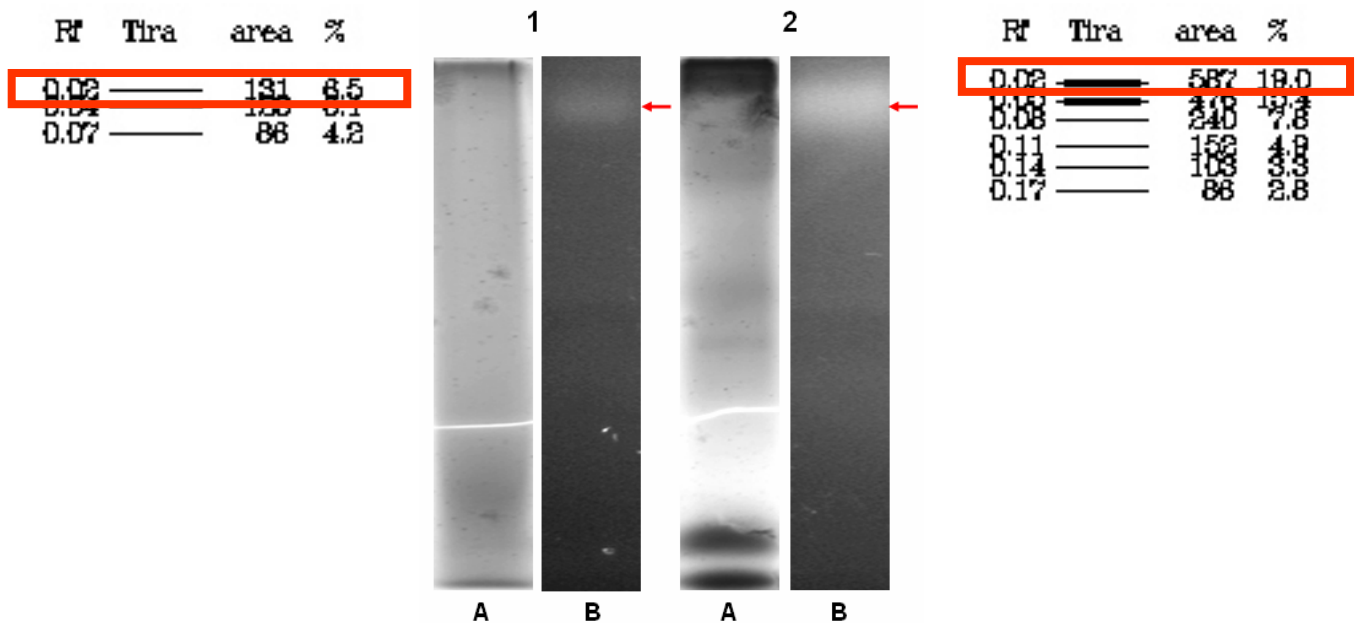


Figura 25 - Mobilidade relativa da α -manosidase em condições nativas. Gel nativo 8% v/v corado com azul de coomassie (A), tratado para atividade manosidásica (B). Proteínas de espermatozoides (1), proteínas de plasma seminal (2).

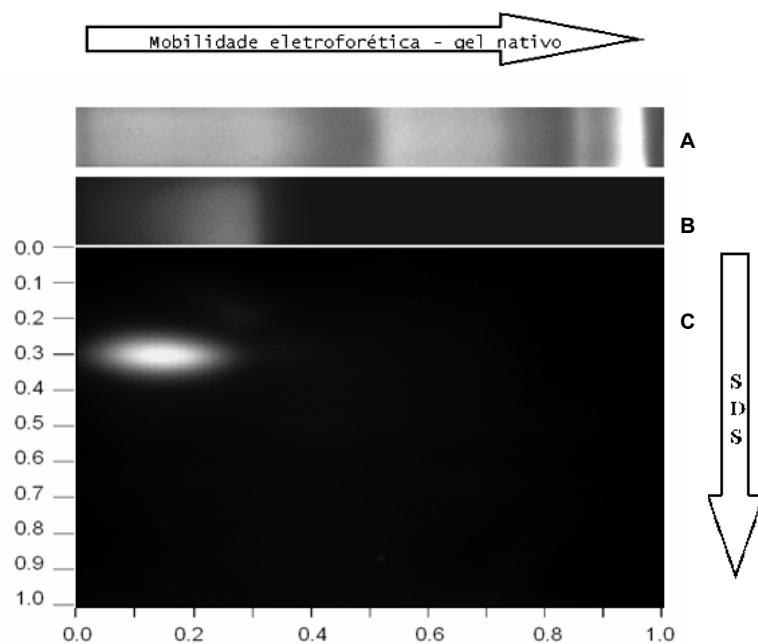


Figura 26 - Mobilidade relativa da proteína α -manosidase em condições desnaturantes. Gel nativo 7% v/v corado com azul de coomassie (A); tratado para atividade manosidásica (B). Gel nativo/desnaturante 2D gradiente 6 - 12% v/v tratado para atividade manosidásica (C).

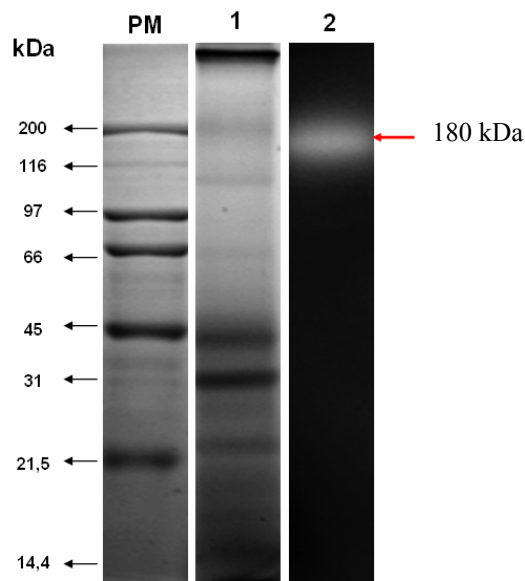


Figura 27 - Massa molecular relativa da proteína que apresenta atividade manosidásica. SDS-PAGE 10% v/v de proteínas de plasma seminal de *E. caballus* corado com azul brilhante de coomassie R-250 (1); tratado para atividade manosidásica (2).

Quando os géis foram tratados com a técnica de PAS (que identifica resíduos glicídicos) a banda protéica que apresentava atividade manosidásica, marcou-se intensamente, indicando seu caráter glicoprotéico (Fig. 28).

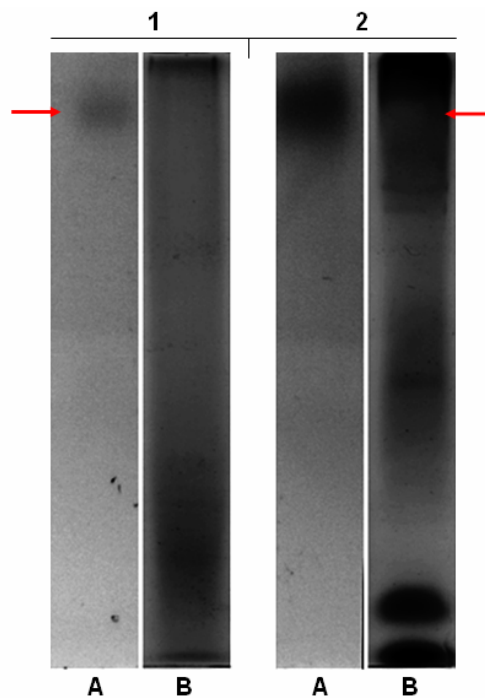


Figura 28 - Identificação da glicoproteína que apresenta atividade manosidásica. Gel nativo 8% v/v tratado para atividade manosidásica (A); tratado com PAS (B). Proteínas de espermatozóides (1), proteínas de plasma seminal (2).

Foi observado que em SDS-PAGE 10% v/v copolimerizado com 0,4% de gelatina (Fig. 29) nos quais se aplicou a técnica de detecção de atividade manosidásica e de atividade proteásica, a banda de atividade manosidásica (C) não co-migrou com as bandas de atividade proteolítica (A e B).

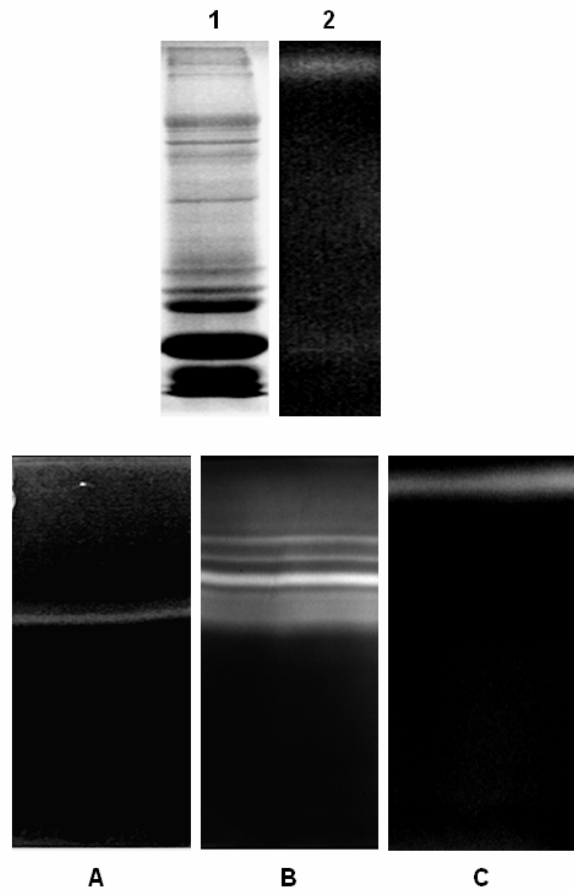


Figura 29 - Efeito da co-polimerização do SDS-PAGE com gelatina na atividade manosidásica. SDS-PAGE 10% v/v corado com azul brilhante de coomassie R-250 (1); tratado para atividade manosidásica (2). SDS-PAGE 10% v/v com 0,4% gelatina de proteínas de plasma seminal de *Equus Caballus* visualizado em luz ultravioleta (A); incubado com triton x-100 2,5% e tampão de incubação para protease (B); o mesmo gel tratado com 4-MU para atividade manosidásica (C).

Diversos ensaios foram realizados com amostras de espermatozoides criopreservados em minigéis em condições quer seja desnaturantes ou nativas, e não foi possível detectar a atividade manosidásica, provavelmente pela baixa concentração desta proteína nas amostras analisadas. Foram feitos alguns ensaios com espermatozoides criopreservados obtidos da região de cauda epididimária, que possuem uma alta concentração relativa da atividade α -manosidase em amostras *in natura* e também não foi possível detectar a atividade dessa enzima. As amostras *in natura* mostraram atividade enzimática, mas após a criopreservação das amostras não foi possível detectar a atividade em géis (Fig. 30). Cabe ressaltar a diferença encontrada no R_f da proteína que apresenta atividade manosidásica, tanto em amostras de espermatozoides e fluidos de epidídimo (R_f 0,12), quanto em amostras de espermatozoides de ejaculado e plasma seminal (R_f 0,20).

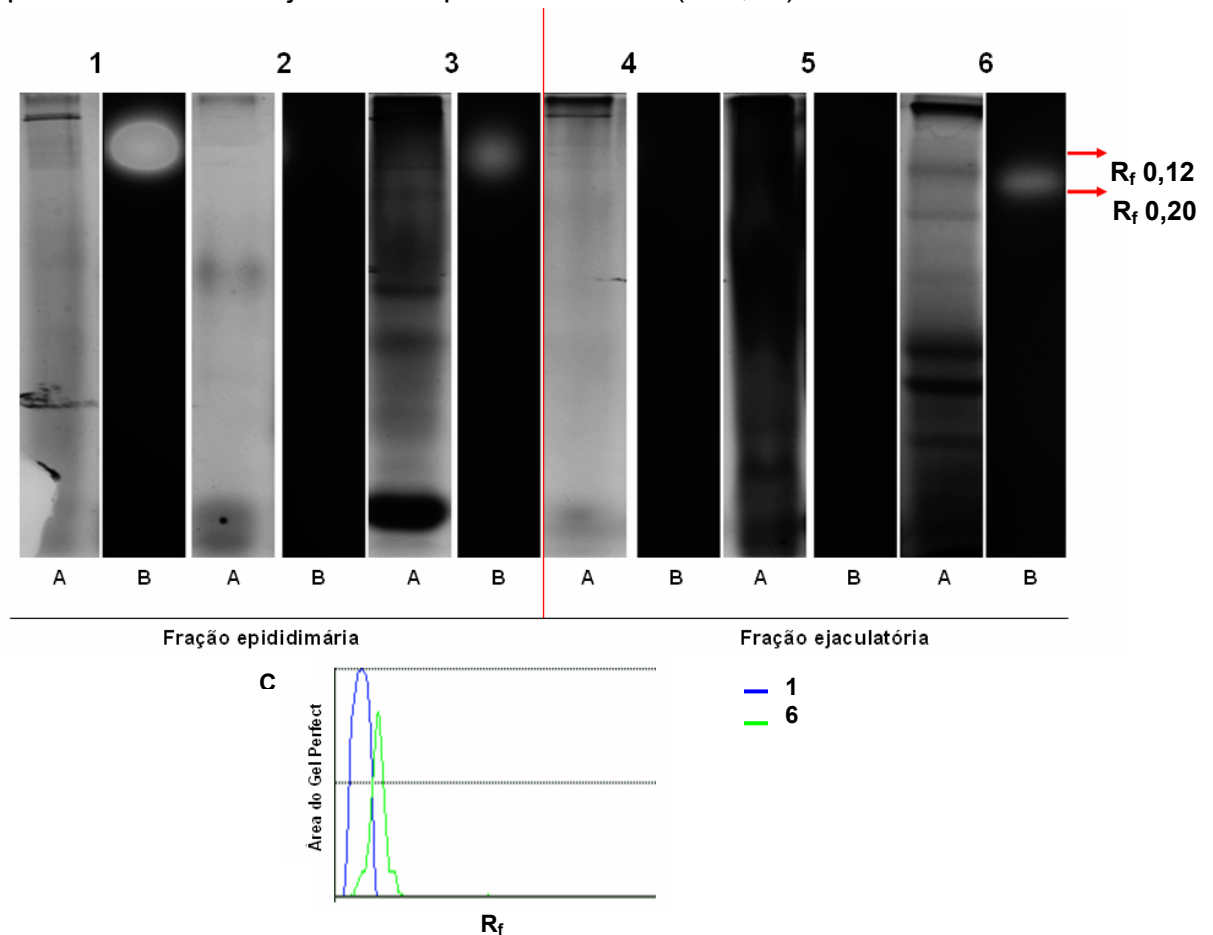


Figura 30- Efeito da criopreservação na atividade manosidásica. Gel nativo 10% v/v corado com azul de coomassie R-250 (A), e tratado para atividade manosidásica (B). Gráfico representando a mobilidade relativa (C); espermatozóide da região de cauda epididimária diluído (1); espermatozóide da região de cauda epididimária congelado 30 dias (2); fluido da região de cauda epididimária (3); espermatozóide de ejaculado diluído (4); espermatozóide de ejaculado congelado 30 dias (5); plasma seminal (6).

5.4 EFEITO DO pH, ATIVADORES E INIBIDORES NA ATIVIDADE MANOSIDÁSICA

a) Análise fluorimétrica

As análises fluorimétricas de atividade manosidásica em amostras de espermatozoides e plasma seminal demonstraram atividade numa ampla faixa de pH, sugerindo a presença de pelo menos duas formas da enzima (ácida e neutra), indicam também que a atividade específica da α -manosidase em espermatozoides é significativamente menor que a atividade detectada em plasma seminal (Fig. 31 e 32) ($p < 0,05$).

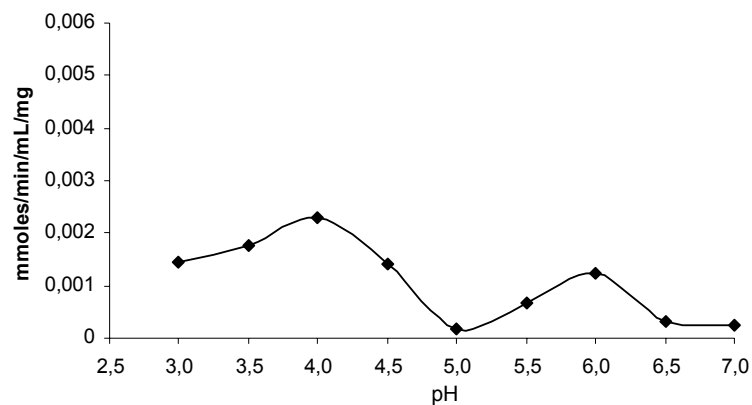


Figura 31 - Atividade da α -manosidase em proteínas de espermatozoides de *E. caballus* – O gráfico representa a curva de pH realizada com o substrato 4-MU. (n=5).

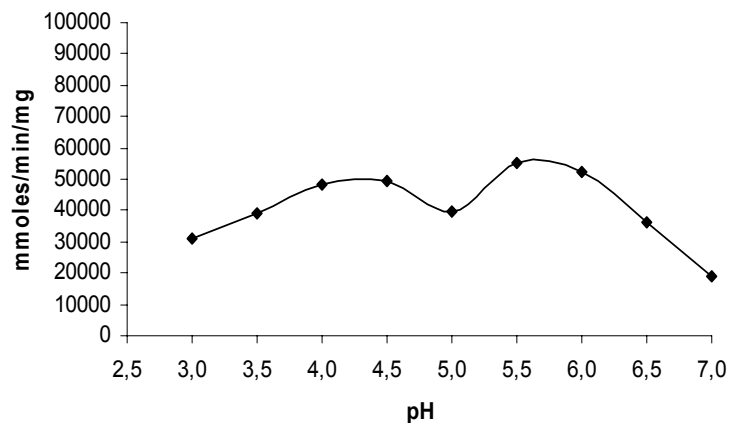


Figura 32 - Atividade da α -manosidase em proteínas de plasma seminal *E. caballus* – O gráfico representa a curva de pH realizada com o substrato 4-MU. (n=5)

No intuito de verificar a ação de ativadores e inibidores na atividade da enzima, em alguns ensaios foram adicionados CoCl_2 , ZnCl_2 e Swainsonine ao meio de incubação da enzima. O CoCl_2 estabilizou a atividade manosidásica entre pH 5,0 e 6,5 nas amostras de espermatozóides (Fig. 33) e nas amostras de plasma seminal observou um aumento da atividade enzimática, entre pH 5,5 e 8,0 (Fig. 34).

O ZnCl_2 aumentou a atividade manosidásica, tanto nas amostras de plasma seminal quanto de espermatozóides, sendo no plasma seminal em todo o espectro de pH analisado e em espermatozóide até o pH 7,0 (Fig. 33 e 34).

O swainsonine inibiu totalmente a atividade manosidásica entre pH 3,0 - 8,0 tanto nas amostras de plasma seminal quanto nas de espermatozóides (Fig. 33 e 34).

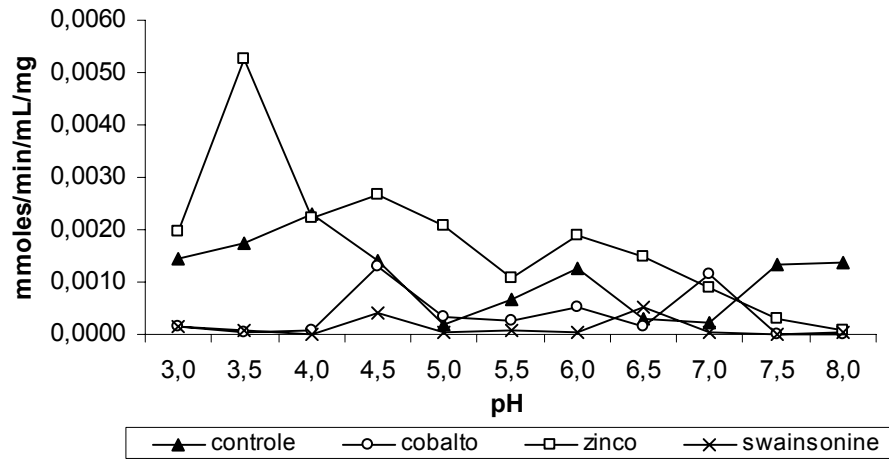


Figura 33 - Curva de pH da atividade manosidásica - Proteínas de espermatozóides com diferentes ativadores e inibidor.

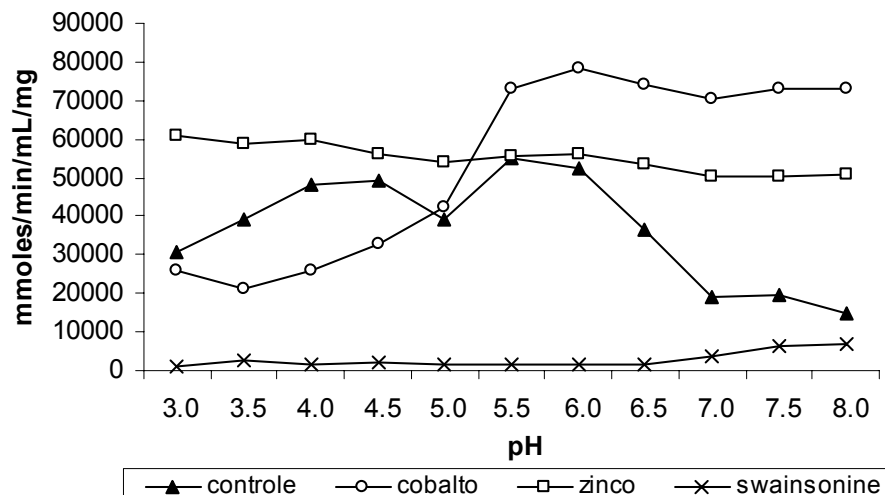


Figura 34 - Curva de pH da atividade manosidásica - Proteínas de plasma seminal com diferentes ativadores e inibidor.

b) Análise eletroforética

O efeito do pH na atividade manosidásica também foi verificado em géis de poliacrilamida em condições nativas e desnaturantes. A figura 35 mostra atividade da forma ácida e neutra da manosidase em plasma seminal, observa-se que em pH ácido a expressão da atividade da enzima α -manosidase é menor quando comparada com a atividade obtida em pH neutro.

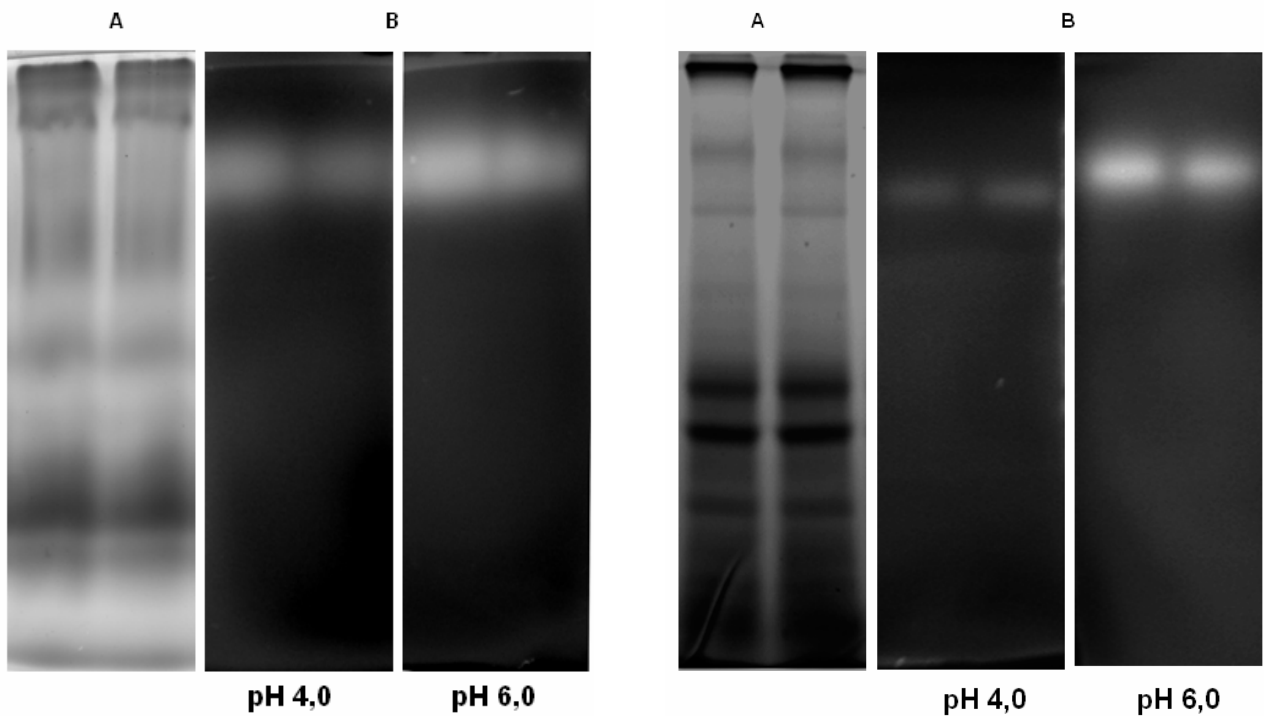


Figura 35 - Efeito do pH na atividade manosidásica em géis. Proteínas de plasma seminal de *E. caballus*. Gel nativo 7% v/v (I) SDS-PAGE 10% v/v (II) corado com azul brilhante de coomassie R-250 (A); tratado para atividade manosidásica (B).

Também foi analisada a ação do CoCl_2 , ZnCl_2 e Swainsonine em minigéis desnaturantes a pH 4,0 e 6,0. A atividade a pH 4,0 foi muito fraca, sendo difícil detectá-la através de análises eletroforéticas, como visto anteriormente. Em pH 6,0 a atividade foi detectada sendo possível analisar o efeito do CoCl_2 , ZnCl_2 e do swainsonine. As imagens sugerem que swainsonine inibe parcialmente a atividade da enzima em amostras de plasma seminal em pH neutro. O CoCl_2 aumentou a atividade da enzima e o ZnCl_2 estabilizou (Fig. 36).

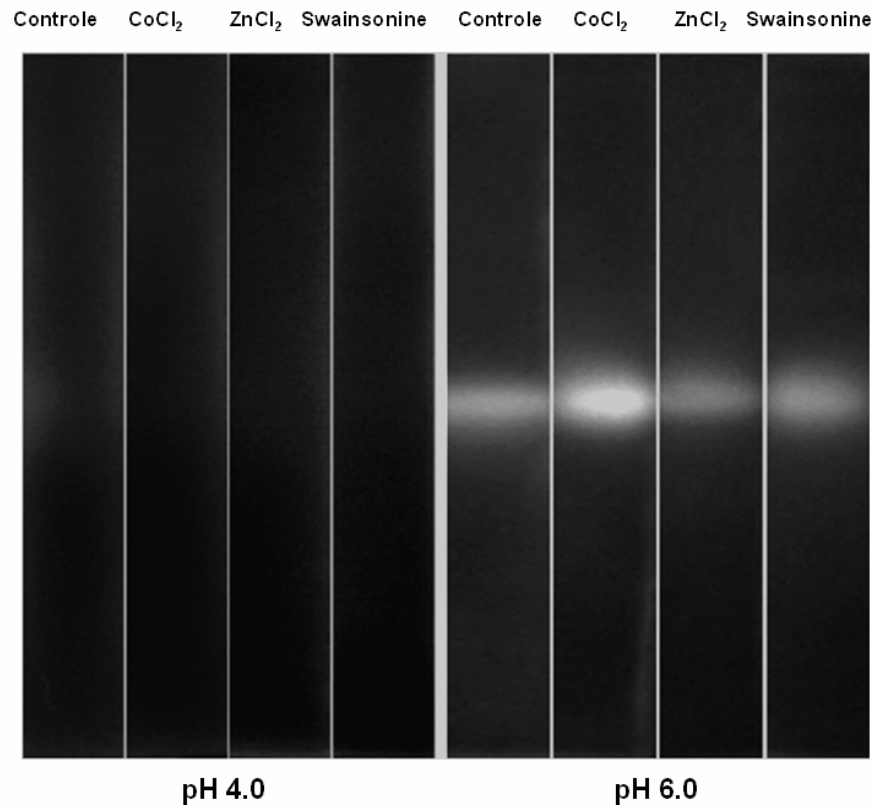


Figura 36- Efeito de ativadores (CoCl₂, ZnCl₂) e swainsonine na atividade manosidásica. SDS-PAGE 6% v/v de proteínas de plasma seminal de *E. Caballus* tratado para atividade manosidásica a diferentes pH (4.0 e 6.0).

VI. DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS:

No Brasil, a criação de cavalos, quer seja de raças destinadas a competições esportivas ou de animais que auxiliam na execução de trabalhos de campo, tem aumentado consideravelmente. Conseqüentemente é necessário ter um número proporcional de bons reprodutores e tecnologias padronizadas que permitam a importação/exportação de sêmen criopreservado que garanta um alto potencial reprodutivo. Diversos pesquisadores têm concentrado seus estudos no desenvolvimento de técnicas que permitam explorar o potencial reprodutivo de animais de alto padrão genético. Sincronização do cio, inseminação artificial (com a utilização de sêmen fresco, resfriado ou congelado) e transferência de embriões são exemplos de biotécnicas que vêm se aplicando em diferentes haras do país. Outras serão aplicadas no futuro próximo, como à fecundação *in vitro*, sexagem, clonagem e transferência de genes. Entretanto, apesar da intensa procura e avaliação das metodologias descritas, a criopreservação de sêmen eqüino ainda é um tema controverso; não existindo um procedimento padrão que permita obter uma população de espermatozoides com motilidade e vigor similar aos espermatozoides diluídos e resfriados (NALLELLA *et al.*, 2004).

A susceptibilidade do gameta à criopreservação difere entre as espécies. Assim, a diferença do que ocorre em clínica humana onde a criopreservação de sêmen é um procedimento de rotina em centros de reprodução assistida e laboratórios de andrologia (antes de quimioterapia, radioterapia e/ou tratamentos cirúrgicos que possam conduzir a falha testicular ou a disfunção ejaculatória) (DONNELLY *et al.*, 2001; ANGER *et al.*, 2003) o menor potencial fertilizante do sêmen criopreservado tem limitado o uso desta metodologia na inseminação artificial de eqüinos (LOOMIS, 2001). Estas diferenças poderiam estar relacionadas com diferenças estruturais, fisiológicas e bioquímicas dos gametas e/ou variações na anatomia e fisiologia do transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea em cada espécie (HOLT, 2000).

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram alterações significativas em algumas características do espermatozoide eqüino, pós-congelamento/descongelamento das amostras, entre elas diminuição da percentagem de células com motilidade progressiva e perda da integridade da membrana plasmática, detectada com testes que avaliam integridade da membrana plasmática:

teste hiposmótico (HOS) (dado não mostrado) e CFDA – PI. No entanto, a diminuição da qualidade espermática após criopreservação parece ser altamente dependente da susceptibilidade das células espermáticas de cada indivíduo, às baixas temperaturas.

O espermatozóide a ser inseminado deve conservar sua atividade metabólica, estrutura e funcionalidade. Porém, os espermatozóides são células frágeis e a qualidade do sêmen se vê afetada quando é mantido a temperatura ambiente e sem diluentes (PICKETT e AMANN, 1993; SNOECK e HENRY, 2001) ou quando é submetido a baixas temperaturas. A perda da motilidade após o transporte e armazenamento das amostras tem sido associada a efeitos osmóticos e estresse oxidativo, entre outras injúrias que o congelamento e descongelamento das amostras produzem. Ambos os efeitos podem ser parcialmente prevenidos utilizando diluentes apropriados nos protocolos de criopreservação. A adição de diluente proporciona substratos energéticos, pressão osmótica e eletrolítica apropriada, e proteção contra choque térmico e ação bacteriana (CARNEIRO, 2002).

Em nosso estudo, observou-se que a diluição das amostras preservou melhor a estrutura e motilidade espermática. Contudo, deve-se ter em mente que alguns componentes do diluente também podem estimular o dano peroxidativo. Na tentativa de impedir danos peroxidativos durante a criopreservação de sêmen, vários protocolos têm sido ensaiados; alguns adicionam antioxidantes e agentes quelantes no meio, enquanto outros enfatizam as condições anaeróbicas requeridas durante o processo. Porém, a efetividade destas estratégias não tem sido confirmada. Uma leve peroxidação da célula promove a capacitação, porém uma oxidação excessiva altera a estrutura da membrana plasmática com conseqüente perda da motilidade e capacidade fertilizante do sêmen (SALAMON e MAXWELL, 1995; AITKEN e BAKER, 2004). A fertilidade reduzida de alguns garanhões após criopreservação provavelmente está relacionada, não só com a tolerância espermática ao processo de resfriamento em termos de longevidade e motilidade, mas também a fatores individuais (SQUIRE *et al.*, 1998, CARNEIRO, 2002). Os valores médios de motilidade do sêmen *in natura* e diluído encontrados neste trabalho são concordantes com os relatos da literatura.

Nossos resultados mostraram que motilidade progressiva e vigor da célula espermática diminuíram aproximadamente 50% (80% *versus* 25%) após congelamento das amostras. Cabe ressaltar a grande variabilidade observada entre garanhões quanto à susceptibilidade dos gametas ao processo de criopreservação,

corroborando os achados de Holt (2000). Nossos dados demonstram que 32% dos garanhões poderiam ser classificados como animais cujos espermatozoides apresentam “boa congelabilidade”, 34% de “moderada congelabilidade” e 32% de baixa congelabilidade. Dados obtidos da literatura mostram que de uma população de 341 animais 35% dos garanhões produziram sêmen que congela bem, 25% dos garanhões congelaram moderadamente, enquanto que em 40% dos animais o congelamento afetou de forma drástica a motilidade (PICKETT e AMANN, 1993). Segundo Carneiro (2002), baseado em dados pessoais e da comunidade científica norte-americana e européia, 30% dos garanhões produzem sêmen que congelam bem, 40% são satisfatórios e em 30% deles os espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelamento. Nesses estudos foram utilizados diferentes protocolos de congelamento e um número considerável de garanhões. A razão para esta variação individual na resistência ao congelamento/descongelamento não está estabelecida. A complexidade estrutural da membrana espermática e variações interespecies e entre indivíduos da mesma espécie podem ser uma das causas do problema. A motilidade aceitável pós-congelamento varia de acordo com os autores. A maioria deles sugere que esta taxa deveria ser de aproximadamente 30%. Estes dados são importantes e devem ser levados em consideração na seleção dos garanhões candidatos ao congelamento de sêmen.

Apesar da análise da motilidade espermática ser utilizada usualmente na avaliação de sêmen pré e pós-congelamento das amostras, outras metodologias devem ser associadas a este exame, já que a motilidade não tem demonstrado alta correlação com a taxa de prenhez (r : 0,3 - 0,65) (GRAHAM, 1996, SAMPER e MORRIS, 1998; DiGRASSIE, *et al.* 2000).

O teste hiposmótico (HOS), que avalia integridade funcional (permeabilidade) da membrana plasmática, principalmente do flagelo, também mostrou uma queda significativa nas amostras congeladas (dado não mostrado). A baixa tolerância osmótica do espermatozoide equino a condições não-osmóticas tem sido também assinalada por outros autores (BALL e VO, 2001). Smith e colaboradores (1992) mostraram que indivíduos de fertilidade comprovada respondem ao teste de HOS de forma positiva; enquanto indivíduos oligo, asteno ou oligoastenospérmico mostraram um grau de resposta significativamente menor ($p < 0.001$).

A avaliação da integridade celular que utiliza iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) mostrou ser de grande utilidade na

avaliação da viabilidade espermática. Nossos dados mostraram que a criopreservação aumenta significativamente a porcentagem de espermatozóides com membrana lesada, o que pode estar relacionado às mudanças volumétricas, produzidas pela desidratação celular e danos nos mecanismos de permeabilidade seletiva da membrana plasmática. Tais condições têm sido enfatizados como fatores de estresse no congelamento (SALAMON e MAXWELL, 1995). Também a ocorrência de danos estruturais atribuídos à formação intracelular de cristais de gelo e peroxidação de lipídeos, entre outros mecanismos bioquímicos, podem levar a alterações descritas no gameta (MAZUR, 1984; LEBOEUF *et al.*, 2000).

Embora a aplicação da eletroforese de proteínas não seja um procedimento de rotina nos laboratórios de andrologia, as informações que aporta sugere investir mais nessa linha de pesquisa. Os ensaios realizados visando determinar o perfil eletroforético de proteínas espermáticas de amostras *in natura* e criopreservadas mostraram algumas diferenças no perfil eletroforético das amostras de espermatozóides criopreservados, especialmente na concentração e proteólise de algumas proteínas. Em média, foram detectadas 14 bandas protéicas entre ~200 e 14 kDa. As majoritárias foram as de massa molecular de 63, 51, 43, 31 e 21 kDa. Zhan e colaboradores (2006) encontraram 43 bandas de proteínas em frações enriquecidas de membrana espermática, entre ~220 e 4 kDa. As proteínas de massa molecular 44 e 16 kDa estavam presentes nos três grupos de animais estudados (classificados como “alta congelabilidade”, “moderada congelabilidade” e “baixa congelabilidade”), enquanto que a proteína de 46 kDa só foi encontrada no grupo de bons congeladores. Em nossas análises observou-se que uma banda protéica de ~21 kDa encontrada nos três grupos de animais, era notoriamente menor nas amostras pertencentes ao sêmen classificado como de baixa congelabilidade. Esta proteína é altamente glicosilada. Zahn e colaboradores (2006) também assinalaram que as proteínas de 28, 26 e 21 kDa decrescem notoriamente após a criopreservação. Descreveram ainda que no grupo de “boa congelabilidade” foi detectada uma maior concentração de proteínas de baixo peso molecular (22, 16 e 14), enquanto no sêmen de “baixa congelabilidade” foram detectadas proteínas de maior massa molecular o que poderia ocorrer devido à precipitação de algumas proteínas e dissociação de agregados protéicos durante o processo de criopreservação. Já no grupo de amostras consideradas de “moderada congelabilidade” verificou-se a formação de novas bandas protéicas tanto de alto

peso (118, 80 e 76) quanto de baixo peso (51 e 43). Nestas amostras as proteínas de 90 e 85 kDa decrescem após criopreservação.

Estudos recentes relatam que as principais proteínas de plasma seminal bovino, BSP-A1/-A2, BSP-A3, de massa molecular entre 15-16,5 kDa e pl 4.7-5.2 e a BSP-30, que possui uma massa de 28-30 kDa e pl 3.9-4.6 ligam-se aos espermatozoides durante a ejaculação via interação de fosfolipídios de colina da membrana espermática (DESNOYERS e MANJUNATH, 1992; MANJUNATH, 1994). Nauc e Manjunath (2000) relataram que a criopreservação diminui em média 10% do total de proteínas da superfície espermática, e dentre esses 10%, 70-80% são proteínas BSP. Lessard e colaboradores (2000) demonstraram em bovinos que a criopreservação diminui os níveis da proteína P25b. Huang e colaboradores (1999) verificaram o efeito do congelamento em uma proteína de 90 kDa conhecida como HSP90 em suínos e notaram um decréscimo significativo dessa proteína durante o resfriamento a 5°C, no entanto as características seminais (motilidade e integridade) não decrescem significativamente até os espermatozoides serem congelados a -100°C, e essa diminuição precede o declínio da motilidade espermática durante o resfriamento de espermatozoides de suínos. Em 1998, Garcia-Gardena e colaboradores reportaram que HSP90 ativa a óxido nítrico sintase (NOS), a qual é benéfica para motilidade espermática. Watson, (1981) relatou que os níveis de ATP diminuem após o choque térmico e este não é re-sintetizado. A diminuição de níveis de ATP pode resultar na perda da motilidade. A motilidade espermática, integridade do acrossoma e da membrana espermática, morfologia espermática, e conteúdo enzimático do acrossoma têm sido usados para avaliar a qualidade de congelamento/descongelamento dos espermatozoides (AMANN, 1982). Zilli e colaboradores (2005) relatam que o desaparecimento ou diminuição de algumas proteínas espermáticas após a criopreservação deve estar relacionado com a dissolução dessas proteínas espermáticas no meio extracelular ou com a degradação seguida do estresse de congelamento/descongelamento. No entanto, um estudo mais abrangente deve ser feito para determinar a existência de proteínas que possam ser utilizadas como marcadores da resistência do espermatozoide ao congelamento.

Diversos autores têm procurado marcadores para fertilidade em machos de várias espécies, tanto no plasma seminal (MARCHINI *et al.* 1990; KILLIAN *et al.*, 1993), como na membrana de espermatozoides (HALL e KILLIAN, 1989; OLLERO

et. al., 1998). Esses trabalhos sugerem que proteínas entre 15 e 17kDa e 26 e 24 kDa de plasma seminal bovino, que se ligam a membrana espermática durante a ejaculação, seriam bons marcadores de fertilidade (MILLER *et al.*, 1990; KILLIAN *et al.*, 1993). As proteínas P25b, P34H e P26h em búfalos, humanos e hamster, respectivamente (BOUE´ *et al.*, 1996; PARENT *et al.* 1999; SULLIVAN, 1999) também têm sido descritas como potenciais marcadores de fertilidade.

Durante o presente trabalho foi realizada uma caracterização parcial da enzima α -D-manosidase presente no sêmen de eqüinos. A enzima detectada no plasma seminal possui uma atividade específica significativamente maior que a detectada em espermatozóides. A α -D-manosidase foi detectada em espermatozóides maduros obtidos da região da cauda de epidídimo e de ejaculado bem como no fluido epididimário e plasma seminal. Nossos resultados corroboram com dados prévios de nosso laboratório que indicam uma expressão diferencial da atividade da enzima ao longo do conduto epididimário de *E. caballus* (DIAS, 2002; Lanzana, 2007). Tendo em consideração os baixos níveis de atividade α -manosidase nas amostras de fluido epididimário da região da cabeça proximal, e seu aumento significativo nas regiões de corpo e cauda epididimária foi postulado que esta enzima poderia ser secretada e/ou ativada pelo epitélio epididimário, corroborando o sugerido por Dutta e Majunder (1984).

A caracterização parcial da enzima no plasma seminal de eqüinos nos permite assinalar que esta proteína tem uma mobilidade eletroforética (R_f) 0,02 em géis nativos 8% v/v de poliacrilamida e de 0,3 em géis desnaturantes 7% v/v de poliacrilamida. A massa molecular relativa determinada foi de 180 kDa, e a massa nativa de 60 kDa e trata-se de uma glicoproteína (PAS - ácido periódico - Schiff) com carga altamente positiva, que mesmo em presença de SDS e concentrações pequenas de poliacrilamida não consegue migrar facilmente na malha, provavelmente pela parte glicídica ser muito grande o que dificulta na migração. Os ensaios realizados indicam que a banda protéica correspondente à enzima não apresenta atividade gelatinolítica por não comigrar com a banda que apresenta atividade proteásica. Cabe ressaltar a diferença na mobilidade relativa da α -D-manosidase presente em espermatozóides e em fluido epididimários em relação à forma presente em plasma seminal, R_f 0,12 e 0,20 respectivamente em géis nativo 10% v/v.

Nossos resultados de comportamento da atividade manosidásica após a criopreservação mostraram uma drástica diminuição da atividade específica de α -D-manosidase (aproximadamente 50%) em amostras de espermatozóides obtidos tanto de ejaculado (em especial, no sêmen de baixa resistência ao congelamento) bem como de espermatozóides maduros obtidos da região da cauda epididimária (dados não mostrados); entretanto nos espermatozóides obtidos de animais considerados “bons congeladores” a queda na atividade enzimática foi menor. Em alguns ensaios, especialmente quando se utilizou PNF (substrato recomendado para a forma ácida ou lisossomal da enzima) como substrato da enzima, verificou-se um aumento da atividade manosidásica nas amostras congeladas tanto em amostras de espermatozóide da região de cauda epididimária, quanto de ejaculado. Isto poderia ser conseqüência de danos no acrossoma após o congelamento das amostras, desde que nesta estrutura existe um número importante de enzimas e entre elas glicosidases (dados não mostrados).

Estudos prévios de nosso grupo mostraram a presença das formas ácida e neutra da manosidase tanto em homogeneizados de epidídimos como no conteúdo luminal (DIAS, 2002; LANZANA, 2007). Em nossos resultados também identificamos as duas formas da enzima α -D-manosidase tanto em espermatozóides de ejaculado quanto em plasma seminal. E constatamos que o $ZnCl_2$ ativa e estabiliza a atividade manosidásica em plasma seminal e ativa em espermatozóides em todo o espectro de pH analisado, assim como o $CoCl_2$ que aumenta a atividade manosidásica nas amostras de plasma seminal, como já foi visto em outras espécies como touro (JAUHAINEN e VANHA-PERTTULA, 1986). O swainsonine inibidor da forma ácida da enzima α -D-manosidase, inibiu a atividade manosidásica tanto em amostras de espermatozóides quanto em amostra de plasma seminal em todo espectro de pH analisado, porém, mais intensamente entre o pH 3,0 e 4,0.

Apesar dos problemas que acarreta a criopreservação, a utilização desta metodologia apresenta uma série de vantagens, entre elas, a possibilidade de armazenamento e transporte de sêmen através de longas distâncias e por um período prolongado de tempo, o aumento da oferta de material genético para um mercado potencialmente aberto, o uso do sêmen após perda da função reprodutiva, a redução dos custos associados com o transporte de éguas e potros, a possibilidade maior de acesso de criadores a garanhões de linhagem superior, o controle de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. A grande

desvantagem desta técnica é a crioinjuria à célula espermática e conseqüente redução da fertilidade. Pesquisa continuada relativa à criobiologia do sêmen de eqüino que resulte num incremento da viabilidade e potencial fertilizante dos espermatozóides, levará a substituição do uso comercial de sêmen resfriado por sêmen congelado nos programas de inseminação, tornando viável o transporte de amostras permitindo o melhoramento genético das raças atuais.

VII. CONCLUSÕES

A criopreservação afeta a função do espermatozóide eqüino;

Observou-se uma grande variabilidade na resposta dos gametas entre garanhões e inclusive entre ejaculados de um mesmo animal;

A porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva e membrana plasmática íntegra diminui após o congelamento / descongelamento das amostras;

Os ensaios de criopreservação das amostras de sêmen mostraram que o efeito da crioinjúria detecta-se logo após o congelamento das amostras;

A grande variabilidade na resposta dos gametas a criopreservação permitiu dividir o grupo de animais estudados em: “sêmen de alta, moderada e baixa congelabilidade”;

Os perfis protéicos das amostras diluídas/resfriadas e criopreservadas são relativamente similares;

Foi detectado diferenças na concentração relativa de algumas bandas protéicas;

Atividade manosidásica foi detectada tanto em espermatozóides quanto em plasma seminal de eqüinos;

A atividade específica desta enzima é maior em plasma seminal;

Os ensaios de atividade enzimática em função do pH, bem como os ensaios utilizando inibidores e ativadores da enzima permitem assinalar a presença de duas formas, ácida e neutra da enzima, no sêmen de eqüinos;

Em espermatozóides a atividade enzimática a pH neutro é maior;

A proteína que apresenta atividade manosidásica é uma glicoproteína, de alto peso molecular e baixa mobilidade relativa;

A mobilidade relativa dessa enzima no conduto epididimário difere da mobilidade no ejaculado;

A atividade manosidásica diminui após a criopreservação dos espermatozóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN RJ, BAKER MA. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev* 16:581-88.

ALLEN CA, GREEN DPL. 1997. The mammalian acrosome reaction: Gateway to sperm fusion with the oocyte. *Bioessays* 19: 241-47.

AMANN RP, PICKETT BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 7: 145-173.

AMANN RP. 1982. Using of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam Appl Toxicol*. 2 (1): 13-26.

AMARI S, YONEZAWA N, MITSUI S, KATSUMATA T, HAMANO S, KUWAYAMA M, HASHIMOTO Y, SUZUKI A, TAKEDA Y, NAKANO M. 2001. Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev*. 59(2): 221-6.

ANGER JT, GILBERT BR, GOLDSTEIN M. 2003. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol*. 170:1079-84.

ARAKI Y, ORGEBIN-CRIST MC, TULSIANI DRP. 1992. Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates. *Biol Reprod* 46 (5): 912-9.

BAKER CAV, GANDIER JCC. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci*. 21: 47-51.

BALL BA, VO A, 2001: Reactive oxygen species generation by equine spermatozoa. *Am J Vet Res* 62, 5508–5515.

BARTLES JR. 1995. The spermatid plasma membrane comes of age. *Trends Cell Biol*. 5: 400-04.

BESANÇON J, DACHEUX JL, PAQUIN R, TREMBLAY RR. 1985. Major contribution of epididymis to alpha-glicosidase content of ram. S.P *Biol Reprod*. 33: 296-301.

BLEIL JD, GREVE JM e WASSARMAN PM. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* 128: 376-85.

BLEIL JD, WASSARMAN PM. 1990. Identification of a zp3-binding protein on acrosome intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5563-67.

BOUE F, BLAIS J, SULLIVAN R, 1996. Surface localizaton of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 54, 1009-17.

BOZZO S, RETAMAL C. 1991. Geles unidimensionales. Un nuevo método densitometrico para computadores personales. *Arch. Biol. Med. Exp.* 24: 181.

BRADFORD MM. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.

BREWIS IA, WONG CH. 1999. Gamete recognition: Sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Reviews of Reprod.* 4: 135-42.

BULLOCK S, WINCHESTER B. 1973. Alpha-mannosidase in the ram testis, epididymis and semen. *Biochem. Soc. Trans.* 1: 491-94.

CALVETE JJ, REINERT M, SANZ L, TÖPFER-PETERSEN E. 1995. Effect of glycosilation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *J. Chromatogr.* 711 (1), 167-73.

CARNEIRO GF. 2002. Transport and cryopreservation of equine semen. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Suppl.* 5, 37-42.

CASTELLÓN EA, HUIDOBRO CC. 1999. Androgen regulation of glycosidase secretion in epithelial cell cultures from human epididymis. *Hum Reprod.* 14(6):1522-7.

CHATTERJEE S, GAGNON C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 59(4): 451-58.

CORNWALL GA, TULSIANI DRP, ORGEBIN-CRIST MC, 1991. Inhibition of the mouse sperm surface alfa-D-mannosidase inhibits sperm-egg binding in vitro. *Biol. Reprod.* 44: 913-21.

COWAN AE, MYLES DG, KOPPEL DE. 1987. Lateral diffusion of the PH-20 protein on guinea pig sperm: evidence that barriers to diffusion maintain plasma membrane domains in mammalian sperm. *J Cell Biol.* 104: 917-23.

CUNHA ICN. 2000. Atualidades sobre inseminação artificial na espécie canina. In Jornada de integração dos alunos de graduação e pós-graduação, 2, 1998, Botucatu, *Anais.* Botucatu, 152-79.

CUNHA ICN. 2002. Criopreservação do sêmen de cães. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Universidade Estadual Paulista.

CURRY MR, REDDING BJ AND WATSON PF. 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiol.* 31, 39-46.

CURRY MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *J. Reprod Fertil.* 5: 46-52.

DACHEUX JL, DRUART X, FOUCHECOURT S, SYNTIN P, GATTI JL, OKAMURA N, DACHEUX F. 1998. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *J Reprod Fertil Suppl.* 53: 99–107.

DACHEUX JL, GATTI JL, DACHEUX F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61: 7-17.

DADOUNE JP. 2004. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol.* 237: 1-56.

DAVIS BJ. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-27.

DELL'AQUA Jr JA. 2000. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino. *Tese de mestrado.* FMVZ-UNESP. Botucatu.

DESNOYERS L, MANJUNATH P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J Biol Chem*; 267: 10149-55.

DIAS AJB, MAIA MAS, RETAMAL CA, LÓPEZ ML. 2004. Identification and partial characterization of α -glucosidase activity in equine epididymal fluid. *Theriogenol.* 61: 1545-58.

DIAS AJB. 2002. Detecção e caracterização de glicosidasas no epidídimo e sêmen de eqüinos. *Tese Doutorado LBCT. CBB. UENF.* Campos dos Goytacazes.

DIAS GM, RETAMAL CA, TOBELLA L, ARNHOLDT AC, LOPEZ ML. 2006. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. *Theriogenol.* 16; in press.

DIGRASSIE WA, LEY WB, BAILEY TL, BOWEN JM, ENG LA, SAACKE RG. 2000. Evaluation of frozen-thawed stallion sperm using conventional and flow cytometric assays. *Equine Symposium and Society for Theriogenol*; 177.

DONNELLY ET, McCLURE N, LEWIS SEM. 2001. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. Steril.* 76, 5:892-900.

DROBINSKI I, THOMAS PG, BALL PA. 1995. Cryopreservation reduced the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zone pellucidae in vitro. *J Androl.* 16: 536-42.

DROBNIS EZ, CROWE LM, BERGER T, ANCHORDOGUY T, OVERSTREET JW, CROWE JH. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool.* 265, 432-437.

DUTTA P, MAJUMDER GC. 1984. Enzymic characteristics of the isoenzymes of rat Epididymal neutral α -mannosidase and their changes during development in vivo. *Biochem J* 218:489-94.

EDDY EM, O'BRIAN DA. 1994. The spermatozoon. In: *The physiology of reproduction.* Raven Press Ltd., New York, 2: 29-77.

EDIDIN M. 1993. Patches and fences: probing for plasma membrane domains. *J Cell Sci.* 7: 165-9.

EDWARDS EH. 1993. *El gran libro del caballo*. 2° ed. Madrid, El Pais Aguilar

ELLERMAN DA, MYLES DG PRIMAKOFF P. 2006. A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Develop Cell*. 10: 831-37.

ENSSLIN MA, LYNG R, RAYMOND A, COPLAND S, SHUR BD. 2007. Novel gamete receptors that facilitate sperm adhesion to the egg coat. *Soc. Reprod Fertil Suppl*. 63: 367-83.

FARIA LM. 2004. Análise da atividade glicosidásica no sêmen de garanhões em função do potencial fertilizante. *Monografia*. LBCT. CBB. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes.

FLESCH FM, GADELLA BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1469: 197-235.

FLORMAN HM, ARNOULT C, KAZAM IG, LI C, O'TOOLE CMB. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod*. 59, 12-16.

FLORMAN HM, ARNOULT C, KAZAM IG, VISCONTI PE, KOPF GS, VILLAZ M. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 96 (12): 6757-62.

FURTADO CSD et al., 2007. Aspectos Relevantes na Avaliação da Morfologia Espermática do Suíno. www.suinos.com.br acessado em 10/03/08

GADELLA BM, GADELLA TW, COLENBRANDER B, VAN GOLDE LMG e LOPEZ-CARDOYO M. 1994. Visualization and quantitation of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of the mammalian spermatozoon. *J. Cell Sci*. 107: 2151-63.

GANDER JE. 1984. Gel protein stains: glycoproteins. *Methods Enzymol*. 104:447-451.

GARCIA-GARDENA G, FAN R, SHAH V, SORRENTINO R, CIRINO G, PAPAPETROPOULOS A, SESSA WC. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*; 392:821-24.

GILMORE JA, LIU J, WOODS EJ, PETER AT AND CRISTER JK. 2000. Cryoprotective agent and cryoprotective effects on human sperm membrane permeabilities; convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod.* 15, 335-43.

GONZALÈS J. 2006. History of spermatozoon and changing views. *Gynécol Obst Fertil.* 34, 819-26.

GRABOWSKI GA, IKONNE JU, DESNICK RJ. 1980. Comparative physical, kinetic and immunologic properties of the acidic and neutral alpha-mannosidase isozymes from human liver. *Enzy.* 25: 13-25.

GRAHAM JK. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. In Diagnostic techniques and assisted reproductive technology. Edited by E.L.Squires. *Vet. Clin. N. Amer.* 4, 2: 131-47.

HADEN NP, HICKOX JR, WHISNANT CS, HARDY DM. 2000. Systematic characterization of sperm-specific membrane proteins in swine. *Biol Reprod.* 63(6):1839-47.

HALL JC, KILLIAN GJ. 1989. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of rat sperm membrane interaction with cauda epididymal fluid. *J Androl.* 10: 64-76.

HINSCH KD, DE PINTO V, AIRES VA, SCHNEIDER X, MESSINA A, HINSCH E. 2004. Voltage-dependent anion-selective channel VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of sperm flagellum. *J. Biol. Chem.* 279: 1581-88.

HIRANI S, WINCHESTER B. 1979. The multiple forms of alpha-D-mannosidase in human plasma. *Biochem J.* 1; 179 (3): 583-92.

HOLT WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* Review. 18; 62(1-3):3-22.

HUANG SY, KUO YH, LEE WC, TSOU HL, LEE YP, CHANG HL, WU JJ, YANG PC. 1999. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenol.* 51:1007-16.

HUNNICUTT, GR, KOPPEL, DE, MYLES, DG, 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev. Biol.* 1: 191(1), 146-59.

JACOBSON K, SHEETS ED, SIMSON R. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268: 1441-42.

JAMES PS, HENNESSY C, BERGET T, JONES R. 2004. Compartmentalization of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of putative diffusion barriers on the sperm head. *J Cell Sci.* 117 : 6485-95.

JASKO DJ. 1994. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Vet.* (10): 156-65.

JAUHAINEN A, VANHA-PERTTULA T. 1987. Characterization of acid and neutral alpha-mannosidases in Bull semen and reproductive organs. *Int. J Biochem.* 19:3, 267-74.

JIN YZ, DACHEUX F, DACHEUX JL, BANNAI S, SUGITA Y, OKAMURA N. 1999. Purification and properties of major alpha-D-mannosidase in the luminal fluid of porcine epididymis. *Bioch in Biophy. Acta.* 1432 (2): 382-92.

KHALIL MB, CHAKRABANDHU K, XU H, WEERACHATYANUKUL W, BUHR M, BERGER T, CARMONA E, VUONG N, KUMARATHASAN P, WONG PTT, CARRIER D, TANPHAICHITR N. 2006. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Develop Biol.* 290: 220 -35.

KILLIAN GJ, CHAPMAN DA, ROGOWSKI LA. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bulls seminal plasma. *Biol. Reprod.* Champaign, 49: 1202-07.

KIM KS, CHA MC, GERTON GL. 2001b. Mouse sperm 404 protein sp56 is a component of the 405 acrosomal matrix. *Biol Reprod;* 64: 36-43.

KIM KS, FOSTR JA, GERTON GL. 2001a. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod.* 64 (1): 148-56.

KIRCHHOFF C, OSTERHOFF C, PERA I, SCHROTER S. 1998. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia.* 30, 225-32.

KRAVETS FG, LEE J, SINGH B, TROCCHIA A, PENTYALA SN, KHAN SA. 2000. Prostatomes: current concepts. *Prostate.* 43: 169-74.

KUNDU CN, CHAKRABORTY J, DUTTA P, BHATTACHARYYA D, GHOST A, MAJUNDER GC. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. *Cryobiol.*40: 117-25.

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). 227:680-5.

LAMBERT H. 1984. The role of sperm-surface glycoprotein in gamete recognition in two mouse species. *J Reprod Fertil.* 70 (1): 281-4.

LANZANA FR. 2007. Detecção de glicosidases e enzimas antioxidantes no epidídimo de *Equus caballus*. *Monografia LBCT CBB UENF*. Campos dos Goytacazes.

LEBOEUF B, RESTALL B, SALAMON S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.*2: 113-41.

LEFIEVRE L, CONNER SJ, SALPEKAR A, OLUFOWOBI O, ASHTON P, PAVLOVIC B, LENTON W, AFNAN M, BREWIS IA, MONK M. *et al.* 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* 19: 1580-86.

LEIBO SP. 1976. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures. *Cryobiol.* 13(6): 587-98.

LESSARD C, PARENT S, LECLERC P, BAILEY JL, SULLIVAN R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl* 21: 700-07.

LIU C, LITSCHER ES, MORTILLO, S. 1996. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5431-36.

LOOMIS PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci.* 68: 191-200.

LÓPEZ ML, de SOUZA W, BUSTOS-OBREGON E. 1987. Cytochemical analysis of the anionic sites on the membrane of the stallion spermatozoa during the Epididymal transit. *Gamete Res.* 18(4): 319-32.

LÓPEZ ML, DE SOUZA W. 1991. Distribution of filipin sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Mol Reprod Dev.* 28: 158–68.

LÓPEZ ML, OLEA N, RETAMAL CA. 2007. Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains. *Anim Reprod Sci.* epub.

MADDOCKS S, SETCHELL BP. 1988. The composition of extracellular interstitial fluid collected with a push-pull cannula from the testes of adult rats. *J Physiol.* 407:363-72.

MANJUNATH P, CHANDONNET L, LEBLOND E, DESNOYERS L. 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod*; 50:977.

MANN T, LUTWAK-MANN C. 1981. Male reproductive function and semen. New York, *Springer-Verlag*.

MARCHINI M, AMORETTI M, GIUNTA AM, PIFFARETTI-YANES A, MEDICI G, BALERNA M. 1990. Electrophoretical patterns of seminal plasma proteins in patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril.* 53 (3): 541-45.

MARTINS CF. 2001. Avaliação do potencial de produção de embriões bovinos pela técnica de injeção intracitoplasmática de células espermáticas (ICSI). Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária. Botucatu: Universidade Estadual Paulista.

MAZUR P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: 125-142.

MAZUR P e KOSHIMOTO C. 2002. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol Reprod.* 66, 1485-90.

MC LESKEY SB, DOWDS C, CARBALLADA R, WHITE RR, SAILING PM. 1998. Molecules involved in mammalian sperm - egg interaction. *Int. Rev. Cytol.* 177: 57-113.

METAYER S; DACHEUX F, DACHEUX JL, GATTI JL. 2002. Comparison characterization and identification of proteases and proteases inhibitors in epididymal fluid of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol Reprod.* 66: 1219-29.

MEYERS SA, ROSENBERGER A, ORPNECK K. 2000. Localization and cellular distribution of a unique hyaluronidase in stallion spermatozoa during epididymal transit. *J Reprod Fertil Suppl*; 56:79-86.

MILLER DJ, GONG X, DECKER G, SHUR BD. 1993a. Egg cortical granule: N-acetylglucosamidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cel. Biol.* 123: 1431-40.

MILLER DJ, WINER MA, AX RL. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*; 42:899-915.

MILLER DJ. XIAOHAI GONG e SHUR BD. 1993b. Sperm require -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida *Development* 118: 1279.

MOREL MCGD. 1999. Equine artificial insemination. Production of spermatozoa. *Welsh Institute of rural studies.* 82-8.

MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, CHAN EK, SCHATTEN G. 1998. Molecular membrane marker dynamics during Rhesus spermatogenesis: acrosome biogenesis, Golgi apparatus and mitochondria differentiation. *Mol. Biol. Cell* 9: 66.

MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, SUTOVSKY P, CHAN EK, SCHATTEN G. 2000. Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis implications for acrosome architecture. *Biol Reprod.* 63(1): 89-98.

MORRIS GJ, FASZER K, GREEN JE, DRAPER D, GROUT BW, FONSECA F. 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenol.* 68 (5): 804-12.

MORRIS GJ. 2006. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod.*21(8): 2075-83.

MORTILLO S, WASSARMAN PM. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development.* 113: 141-49.

MYLES DG, KOPPEL DE, PRIMAKOFF P.1990. Defining sperm surface domains. In : Alexander NF, Griffin D, Spieler JM, Waites GHM. *Gamete interaction.* Prospect for immunocontraception. Wiley-Liss, Inc. 1-11.

NALLELLA KP, SHARMA RK, SAID TM, AGARWAL A. 2004. Inter-sample variability in post-thaw human spermatozoa. *Cryobiology* 49, 2:195-199.

NAUC V e MANJUNATH P. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod.* 63, 1058-66.

NIXON B, AITKEN RJ, MCLAUGHLIN EA. 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1805-23.

OHMURA K. *et al.*, 1999. A homologue of pancreatic trypsin is localized in the acrosome of mammalian sperm and is released during acrosome reaction. *J Biol Chem.* 274, 29426-32.

OLLERO M, BESCOS O, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. 1998. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology.* 49, 3: 547-55.

PAPA F, ALVARENGA MA, DELL 'AQUA Jr. 2002. J. Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen eqüino. Apostila.

PAPA FO. 1988. Congelamento do sêmen e inseminação artificial. *An.VII Congr. Bras. Reprod. Anim.* Campinas/SP: 75-79.

PARENT S, LEFIÈVRE L, BRINDLE Y, SULLIVAN R, 1999. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 57-65.

PARKS JE, GRAHM JK. 1992. Effects of cryopreservation on sperm membranes. *Theriogenol.* 38: 209-22.

PEREIRA BMJ, ABOU-HAILA A, TULSIANI DRP, 1998. Rat sperm surface mannosidase is first expressed in the plasma membrane of testicular germ cells. *Biol. Reprod.* 59, 1288-1295.

PESCH S, BERGMANN M. 2006 Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron.* 37(7): 597-612.

PHILLIPS NC, ROBINSON D, WINCHESTER BG. 1974. Human liver alpha-D-mannosidase activity. *Clin. Chim. Acta* 55: 11-19.

PICKETT BW, AMANN RP. 1993. Cryopreservation of semen. In: Mckkinon, A O. And Voss, J.L. (eds). *Eq. Reprod.*, Philadelphia, Lea-Febiger: 769-89.

POLGE C, SMITH AU, PARKES AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification e dehydration at low temperatures. *Nature* (London) 164-668.

PRIMAKOFF P, MYLES DG. 2002. Penetration adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Sci* 296 (5576): 2183-85.

RAMALHO-SANTOS J, SCHATTEN G, MORENO RD, 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 67: 1043–51.

REISNER AH. 1984. Gel protein stain: A rapid procedure. *Met. Enzimol.* Part C. 439-41.

RETAMAL CA, BABUL J. 1988. Determination of the molecular weight of protein by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient of crosslinked polyacrylamide in the absence of denaturing agents. *Anal. Biochem.* 175, 2: 544-547.

RETAMAL CA, THIEBAUT P, ALVES EW. 1999. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Bioch.* 268:15-20.

RETAMAL CA, URZÚA J, ALVES EW, LÓPEZ ML. 2000. Cytochemical and electroforetic study of the stallion epididymal glycoproteins. *J Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32, 1: 117-30.

RETAMAL CA. 1999. Caracterização e purificação de proteínas epididimárias de eqüino (*Equus caballus*) tese (Doutorado em Biociências) Universidade estadual do norte fluminense. Campos dos Goytacazes, RJ. Brasil.

ROBAIRE B, VIGER RS. 1995. Regulation of Epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod.* 52: 226-236.

SALAMON S, MAXWELL WMC, 1995. Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci.* 37:185-249.

SALAMON S, MAXWELL WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.

SAMPER JC, MORRIS CA. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenol.* 49:895-903.

SAMPSON MJ, DECKER WK, BEAUDET AL, RUITENBEEK W, ARMSTRONG D, HICKS MJ, CRAIGEN WJ. 2001. Immotile sperm infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J. Biol. Chem.* 276: 7154-59.

SAUNDERS KM, PARKS JE. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod.* 61: 178-87.

SETCHELL BP, MADDOCKS S, BROOKS DE. 1994. Anatomy, vasculature, enervation and fluids of the male reproductive tract. In: *Physiology of Reproduction*. Eds. Raven Press, Ltda. New York.

SETCHELL BP. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, PT (ed) *Reproduction in domestic animals*, 4th. Academic Press, London, 221-49.

SHADAN S, JAMES PS, HOWES EA, JONES R. 2004. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol. Reprod.* 71: 253-65.

SHALGI R, MATITYAHU A, NEBEL L. 1986. The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol Reprod.* 34:446-52.

SHIMITSU S, TISUJI M, DEAN J. 1983. In vitro biosynthesis of three sulphated glycoproteins of murine zona pellucida by oocytes grown in culture. *J. Biol. Chem.* 258: 5858-63.

SILVA J F S, VIANNA S A B; FONSECA C W F, FAGUNDES B, SOUZA GV. 2002. Apostila de criopreservação de sêmen eqüino. Apostila

SIMONS K, TOOMRE D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Mol. Cell Biol.* 1: 31-39.

SINOWATZ F, KÖLLE S, TÖPFER-PETERSEN E. 2001. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 168: 24-35.

SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CRIST M-C, 1988. Effects of swainsonine on rat Epididymal glycosidases. *J Reprod Fertil* 84: 611-17.

SMITH R, MADARIAGA M, BUSTOS-OBREGON E. 1992. Reappraisal of the hypo-osmotic swelling test to improve assessment of seminal fertility status. *Intern. J. Androl.* 15:5-13.

SNAITH SM, 1977. Multiple alfa-manosidase activities in mammalian tissues as shown by metal ion-activation. *J. Biochem.* 163: 557-64.

SNOECK PPN, HENRY M. 2001. Efeito do resfriamento no sêmen eqüino. *Cad. Tec Vet Zootec.* 36: 54-61.

SPUNGIN B, MARGALIT I, BREITBART H. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell Sci.* 108: 2525-35.

SQUIRES EL, BRUBAKER JK, MCCUE PM, PICKETT BW. 1998. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenol.* 49(4):743-49.

SUAREZ SS, IGNOTZ GG, LO MC, PEREZ CL, GWATHMEY TM. 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod.* 64(6): 1806-11.

THOMAS PG, IGNOTZ GG, BALL BA, BRINSKO SO, CURRIE WB. 1995. Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *Am J Vet Res.* 56(12): 1657-62.

TÖPFER-PETERSEN E, CALVETE JJ. 1996. Sperm associated protein candidates for primary zona pellucida binding molecules: Structure, functions correlations of boar spermadhesins. *J Reprod Fertil Suppl* 50: 55-61.

TÖPFER-PETERSEN E, EKHLASI-HUNDRIESER M, TSOLOVA M, LUB T, KIRCHHOFF C, MULLER P. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci.* 89 (1-4): 159-70.

TÖPFER-PETERSEN E, WABERSKI D, 2001. Sperm maturation and fertilization. In: Busch, W., Holzmann, A. (Eds.), *Veterinary Medicine Andrology, Physiology, Pathology of Reproduction in Male Animals*. Schattauer, Stuttgart, 69–72.

TOSHIMORI K, SAXENA DK TANII I, YOSHINAGA K. 1998. An MN9 antigenic-molecule, equatorine is required for successful sperm oocyte fusion mice. *Biol Reprod* 59: 22-29.

TULSIANI DRP, NAGDAS SK, CORNWALL GA, ORGEBIN-CRIST MC. 1992. Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chain(s) on the mouse ZP2 and ZP3. *Biol Reprod*; 46: 93–100.

TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CRIST MC. 1989. Novel alpha-D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interactions. *J. Cell. Biol.* 109(3): 1257-67.

TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CRIST MC. 1990. Human sperm plasma membranes possess a-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. *Biol Reprod*; 42: 843-58.

TULSIANI DRP, YOSHIDA-KOMIYA, ARAKI Y. 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod.* 57, (3): 487.

VEREB G, SZOLLOSI J, MATKO J, NAGY P, FARKAS T, VIGH L, MATYUS L, WALDMAN TA e DAMJANOVICH S. 2003. Dynamic yet structured: the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8053-58.

WARD CR, KOPF GS. 1993. Molecular events mediating sperm activation. *Dev Biol* 158: 9-34.

WARD CR, STOREY BT, KOPF GS 1992 Activation of Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* 267:14061–14070.

WASSARMAN PM. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell*. 96:175-83

WATSON PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*, 62 (2):483-92.

WATSON PF. 1995. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-91.

WATSON PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2 (60-61): 481-92. Review.

YANAGIMACHI R. 1994. Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Knobil, E.H., Neill, J.D. Eds. Raven Press. New York. 189-317.

ZAHN FS, PAPA FO, MELO CM. 2006. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? *An Reprod Sci* 94: 64–66.

ZHU GZ, MYLES DG e PRIMAKOFF P. 2001. Testase 1 (ADAM 24) a plasma membrane-anchored sperm protease implicated in sperm function during epididymal maturation or fertilization *J. Cell Sci.* 114, 1787.

ZILLI L, SCHIAVONE R, ZONNO V, ROSSANO R, STORELLI C, VILELLA S. 2005. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biol. Reprod.* 72, 5:1262-67.

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](#)