

**UFSM**

**Tese de Doutorado**

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO  
PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES  
TAURINOS E ZEBUÍNOS DE ALTA  
CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

---

**Ender Rosana Oberst**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2001**

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO  
PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES  
TAURINOS E ZEBUÍNOS DE ALTA  
CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

---

**por**

**Ender Rosana Oberst**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2001**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO  
PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES TAURINOS E  
ZEBUÍNOS DE ALTA CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

elaborada por  
**Ender Rosana Oberst**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Rodrigo Costa Mattos**  
(Presidente/Orientador)

---

**Diogo Onofre Souza**  
(Co-Orientador)

---

**Mara Iolanda Batistella Rubin**  
(Co-Orientadora )

---

**Christianne Gazzana Salbego**

---

**Karin Érica Brass**

Santa Maria, 07 de dezembro de 2001.

## DEDICATÓRIA

À minha filha Elisa, pelo estímulo, paciência e pelos períodos furtados de seu convívio.

À minha família, pelo suporte generoso em todos os momentos, estímulo e confiança.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Rodrigo Costa Mattos, pela orientação, colaboração em todas as etapas do trabalho, sugestões, apoio, amizade e exemplo de conduta profissional e pessoal.

Ao professor Diogo Souza, pela co-orientação, disponibilidade de espaço físico no Laboratório 28 e de seus equipamentos, sugestões, apoio irrestrito, estímulo constante e amizade.

À Professora Christianne Gazzana Salbego, pelo suporte técnico durante as etapas do experimento, disponibilidade de equipamentos, sugestões, ensinamentos, revisão, estímulo e amizade.

Ao Professor Renato Dias, por ter acreditado na idéia e pelo encaminhamento que permitiu a sua concretização.

À Professora Vera Wald, pela orientação estatística, valiosas sugestões, apoio e estímulo constantes.

À colega Maria Inês, pelo estímulo e amizade.

À Dra. Ana Mattos, pela valiosa colaboração nas revisões.

Ao Professor Luiz Alberto Ribeiro, pela colaboração nas revisões da língua inglesa.

Ao Prof. Carlos Alberto Gonçalves, pelas facilidades oferecidas, disponibilidade de equipamentos, apoio e amizade

Ao pessoal dos Laboratórios 28 e 35, do Departamento de Bioquímica do ICBA-UFRGS, Lúcia, Carina, Lisiane, Tati, Lauren, Trícia, Dani O., Dani G.,

Dioguinho e especialmente à Francine, Helena e Mauro, pelo auxílio, companheirismo e amizade.

À Coordenação, professores e colegas do Departamento de Bioquímica do ICBA-UFRGS, pelas facilidades oferecidas, apoio e amizade.

À Dra. Lúcia Helena e Carlinhos, da equipe técnica da empresa Lagoa da Serra, pelas facilidades oferecidas, inestimável colaboração e amizade.

Ao Dr. Gary Killian, do J.O. Almquist Center, Pennsylvania State University, EUA, pelo anticorpo anti osteopontina.

Ao Dr. Ricardo Mattos, pelo auxílio na aquisição de diversos materiais.

À Direção e demais funcionários da FAURGS, especialmente à Margareth, pela disponibilidade de equipamentos, apoio e amizade.

À empresa Lagoa da Serra, pelo material fornecido e financiamento parcial do projeto.

À FAPERGS, pelo financiamento do projeto e pela bolsa emergencial no primeiro ano do Curso.

À Coordenação, professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela acolhida generosa, facilidades oferecidas, coleguismo, estímulo e amizade.

A todos que, de alguma forma, participaram e auxiliaram a realização deste trabalho.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Área de concentração Fisiopatologia da Reprodução  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES TAURINOS (*Bos taurus taurus*) E ZEBUÍNOS (*Bos taurus indicus*)

AUTORA: ENEDER ROSANA OBERST  
ORIENTADOR: RODRIGO COSTA MATTOS  
CO-ORIENTADORES: DIOGO SOUZA e MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de dezembro de 2001.

A análise das proteínas do plasma seminal de 14 reprodutores, 7 taurinos e 7 zebuínos, doadores de sêmen de uma Central de Inseminação e considerados de alta congelabilidade do sêmen foi realizada através de eletroforese bidimensional, pela técnica de O'Farrel *et al.*, (1977), modificada por Rodnight *et al.*, (1988). Onze bandas protéicas de baixo peso molecular (10-24 kDa) foram analisadas em géis de acrilamida a 15%, corados por Azul de Comassie e quantificadas de acordo com a densidade óptica exibida. As bandas avaliadas não apresentaram mesma frequência de aparecimento nas espécies. Em reprodutores taurinos, com exceção das bandas **13** (14-15 kDa) e **19** (16-18 kDa), presentes nas amostras de 28,60% (2/7) dos reprodutores, as demais proteínas estiveram presentes nas amostras de plasma seminal de 100% dos animais. Apenas as bandas **3** (15-16 kDa), **5** (16-17 kDa), **7** (11-12 kDa) e **9** (14-15 kDa) não apresentaram variações significativas entre as amostras dos reprodutores. Em zebuínos, as bandas protéicas **11** (13-14 kDa), **19** (16-18 kDa,) e **23** (20-22 kDa) foram evidenciadas nas amostras de 71% ( 5/7) dos reprodutores, a banda 13 em 57% (4/7) e as demais bandas estiveram presentes nas amostras de 100% dos animais. Com exceção da banda **15** (11-12 kDa), as demais diferiram significativamente entre as amostras dos touros. Cinco bandas diferiram estatisticamente entre as espécies ( $P<0,05$ ), as bandas **5** (16-17 kDa), **7** (11-12 kDa), **15** (11-12, kDa), **21** (20-24 kDa) e **23** (20-22 kDa), sendo que os reprodutores taurinos apresentaram densidades ópticas superiores nas bandas protéicas **7** e **23** e os zebuínos nas bandas **5**; **15** e **21**. As bandas **7** e **23** foram identificadas como aSFP e clusterina, através de seqüenciamento protéico. As proteínas de alto peso molecular (acima de 45 kDa) foram analisadas em géis de poliácridamida a 8%, sendo quantificadas três bandas protéicas de pesos moleculares de 195; 66 e 55 kDa, presentes em 100% das amostras de plasma seminal. Nas amostras de taurinos, as densidades ópticas da banda de 55 kDa, que foi imunoidentificada como osteopontina, foram significativamente superiores ( $P<0,05$ ) às dos zebuínos e as demais bandas não apresentaram variações significativas entre as espécies. A banda protéica de 66 kDa foi imunoidentificada como albumina. Nas amostras de taurinos, as densidades ópticas das bandas protéicas não evidenciaram variação significativa entre os animais, entretanto, nas de zebuínos, as densidades ópticas da albumina apresentaram diferenças significativas.

**ABSTRACT**

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Área de concentração Fisiopatologia da Reprodução

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**PROTEINS ELECTROPHORETICAL PROFILE OF SEMINAL PLASMA  
OF *Bos taurus taurus* AND *Bos taurus indicus* BULLS**

AUTORA: ENEDER ROSANA OBERST

ORIENTADOR: RODRIGO COSTA MATTOS

CO-ORIENTADORES: DIOGO SOUZA e MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 07 de dezembro de 2001.

Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (O'Farrel *et al.*, 1977, modified by Rodnight *et al.*, 1988), was performed in seminal plasma of *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* bulls from an IA Center. All the bulls were considered to have a semen with high freezeability. In a 15% polyacrylamide gels, stained with Commassie Blue, a total of 11 protein bands (10-24 kDa) was analyzed by their optical densities. In *Bos taurus*, the bands **13** (14-15 kDa) and **19** (16-18 kDa) were present in 28.6% of the seminal plasma samples examined. The remainder bands were present in all samples examined. No statistical significance was found between *Bos taurus* bulls samples in the bands **3** (15-16 kDa); **5** (16-17 kDa), **7** (11-12 kDa) and **9** (14-15 kDa). On the other hand, in *Bos indicus* it was found that the bands **11** (13-14 kDa), **19** and **23** (20-22 kDa) were present on 71% of the samples, the band **13** in 57% and the remainder were present in all samples. The band **15** (11-12 kDa) was the only one that did not show any variation between the *Bos indicus* bulls samples. Finally, five bands showed up differences ( $P < 0,05$ ) on their optical densities between species. In *Bos taurus* the bands with high optical densities were the **7** and **23** and in *Bos indicus* the bands with high optical densities were the **5**, **15** and **21**. The bands **7** and **23** were identified as aSFP and clusterin, by protein sequence. In a 8% polyacrylamide gels, three bands of 195; 66 and 55 kDa, present in 100% of the samples in both species, were analyzed. In *Bos taurus* samples, the optical densities of 55 kDa band, immunidentified as osteopontin were superior ( $P < 0,05$ ) than *Bos indicus* samples. The 66 kDa band was immunidentified as albumin. In the *Bos taurus* samples, the bands did not show any variation between the bull samples, but in *Bos indicus*, the albumin optical densities showed significant variation between samples.



## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

- aSFP (acid seminal fluid protein) – proteína ácida do fluido seminal bovino
- BS-1(Bovine seminal ribonuclease) – Ribonuclease seminal bovina
- BSP–Proteins (Bovine Seminal Plasma Proteins) - Proteínas BSP Proteínas do plasma seminal bovino
- BUSI I (Bull seminal proteinase inhibitor I, bull acrosin inhibitor I) - Inibidor I da proteinase seminal do touro
- BUSI II (Bull seminal proteinase inhibitor II, bull acrosin inhibitor II) – Inibidor II da proteinase seminal do touro
- CAPS (cyclohexylaminol-1 propanesulfonic acid) – Ácido aminolciclohexil-1 propanosulfônico
- EPV 20 (Epididymal secretory protein) – Proteína secretora do epidídimo
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido fosfórico
- HBP (Heparin binding proteins) - Proteínas de ligação à heparina
- IgG – Imunoglobulina G
- KDa - Quilodaltons
- MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1) – Proteína 1 de quimioatração de monócitos
- M-TBS (Milk-Tris Buffer Saline) - Tampão Tris salina leite
- NaCl – Cloreto de sódio
- NaOH – Hidróxido de sódio
- OPN - Osteopontina
- PDC109 – Proteína do fluido seminal bovino de ligação ao colágeno

- pKa – Constante de dissociação de ácidos
- pI - Ponto isoelétrico
- PVDF - Difluoreto de polivinila
- PVP40 - Polivinilpirrolidona de peso molecular 40
- SDS (Sodium dodecil sulphate) - Dodecil sulfato de sódio
- *SDS-PAGE* - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
- TBS (Tris Buffer Saline) - Tampão Tris salina
- TEMED – Tetrametilenodiamina
- TFA – Ácido trifluoroacético
- 
- TIMP-II – Inibidor tecidual de metaloproteinase II
- TPCK (L-1 thosilamida-2 phenilclorometyl ketone) - L-1 tosilamina–2 fenilclorometil cetona)
- T-TBS (Tween-TBS) – Tampão Tris salina Tween
- Tween 20 (Polyoxyethylene monolaurato) – Monolaurato de polioxietieno

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Primeira dimensão –NEPHGE.....	32
FIGURA 2 -	Segunda dimensão, condições da migração eletroforética.....	35
FIGURA 3 -	Representação esquemática das bandas protéicas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino e gel contendo os marcadores de pesos moleculares.....	46
FIGURA 4 -	Proteínas do plasma seminal bovino com densidades ópticas superiores nas amostras de taurinos .....	48
FIGURA 5 -	Proteínas do plasma seminal bovino com densidades ópticas superiores nas amostras de zebuínos.....	49
FIGURA 6 -	Proteínas de alto peso molecular do plasma seminal bovino.....	53
FIGURA 7 -	Imunoidentificação da albumina.....	55
FIGURA 8 -	Imunoidentificação da osteopontina.....	56

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Dados do seqüenciamento da banda protéica 7.....	<b>88</b>
Anexo B - Dados do seqüenciamento da banda protéica 23.....	<b>112</b>

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 -** Pesos moleculares(PM) e pontos isoelétricos (pI) aproximados, média (%) e desvio padrão das densidades ópticas das bandas protéicas de baixo peso molecular analisadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre as espécies..... **47**
- TABELA 2 -** Frequência relativa, coeficientes de variação (CV) das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal dos reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre os reprodutores..... **50**
- TABELA 3 -** Pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) aproximados, médias e desvio padrão das densidades ópticas relativas das bandas protéicas de alto peso molecular analisadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre as espécies e entre os reprodutores..... **54**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	<b>x</b>
LISTA DE FIGURAS.....	<b>xi</b>
LISTA DE ABREVIATURAS.....	<b>xii</b>
LISTA DE ANEXOS.....	<b>xiii</b>
RESUMO.....	<b>xiv</b>
ABSTRACT.....	<b>xv</b>
1. INTRODUÇÃO.....	<b>01</b>
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	<b>04</b>
2.1 Espermatozóide.....	<b>04</b>
2.2 Maturação espermática.....	<b>06</b>
2.3 Capacitação espermática.....	<b>07</b>
2.4 Criopreservação do sêmen.....	<b>08</b>
2.5 Avaliação dos reprodutores.....	<b>11</b>
2.6 Avaliação da qualidade do sêmen.....	<b>13</b>
2.7 Plasma seminal.....	<b>17</b>
2.8 Eletroforese do plasma seminal.....	<b>18</b>
2.9 Proteínas do plasma seminal.....	<b>18</b>
2.10 Proteínas do plasma seminal e fertilidade.....	<b>22</b>
2.11 Proteínas do plasma seminal, viabilidade e congelabilidade do sêmen.....	<b>24</b>

2.12 Composição do plasma seminal de taurinos e zebuínos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Local de execução.....	28
3.2 Materiais.....	28
3.3 Animais.....	29
3.4 Coleta das amostras.....	29
3.5 Análise das amostras.....	30
3.5.1 Dosagem de proteínas totais.....	30
3.5.2 Eletroforese bidimensional.....	31
3.5.3 Primeira dimensão.....	31
3.5.4 Segunda dimensão.....	33
3.5.4.1 Preparação do gel.....	33
3.5.4.2 Transferência.....	34
3.5.4.3 Coloração e secagem dos géis.....	36
3.6 Quantificação das proteínas .....	37
3.7 Identificação das proteínas por seqüenciamento do N-terminal.....	37
3.7.1 Eletrotransferência para membrana de <i>PVDF</i> .....	38
3.7.1.1 Rehidratação do gel.....	38
3.7.1.2 Coluna de eletrotransferência.....	39
3.7.1.3 Eletrotransferência.....	39
3.8 Digestão trípica.....	40
3.9 Imunoidentificação.....	41
3.9.1 Imunoidentificação de osteopontina.....	41
3.9.1.1 Eletrotransferência.....	41

3.9.1.2 Imunoidentificação.....	42
3.9.2 Imunoidentificação de albumina.....	43
3.10. Delineamento experimental e Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Dosagem de proteína total .....	45
4.2 Proteínas de baixo peso molecular (10-40 kDa).....	45
4.2.1 Sequenciamento N-terminal da banda protéica <b>7</b> .....	51
4.2.2 Identificação da seqüência protéica da banda <b>23</b> .....	52
4.3 Proteínas de baixo peso molecular (41-200 kDa).....	52
4.3.1 Imunoidentificação de albumina.....	55
4.3.2 Imunoidentificação de osteopontina.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
5.1 Dosagem de proteína.....	57
5.2 Proteínas de baixo peso molecular.....	58
5.3 Proteínas de alto peso molecular.....	64
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. ANEXOS.....	87



# 1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro, estimado em 163 milhões de cabeças, atualmente se constitui no maior rebanho comercial do mundo e apresenta produção de carne de 5 milhões de toneladas/ano, muito inferior ao índice norte-americano que, com um rebanho 50% menor, produz 11 milhões de toneladas anuais. A reduzida produtividade do rebanho nacional decorre do sistema de produção extensivo, adotado pela maioria dos criadores, do baixo nível tecnológico, de deficiências nutricionais, sanitárias, e de manejo e do material genético (Silva, 2000). Em gado de corte, a taxa de fertilidade é de 35 a 60%, a idade a primeira cria entre 3 e 4 anos e o intervalo entre partos de 20,3 a 34,7 meses (Andrade, 1999). Em gado de leite, o incremento de 1% na taxa de fertilidade resultaria no aumento potencial de 270 milhões de litros de leite, que poderia ainda ser mais elevado, com taxas reprodutivas mais altas e mortalidade mais baixa (Pereira, 1998).

Em um rebanho bovino, a eficiência reprodutiva tem sido amplamente citada e aceita como a característica de maior importância para a seleção, sendo dez vezes mais importante que o crescimento e cinco vezes mais importante do que a qualidade da carne (Trenke & Wilham, 1977). No rebanho bovino brasileiro, a maior eficiência reprodutiva depende de mudanças ambientais, como as condições nutricionais e corporais no pré e no pós-parto, do maior controle de doenças que interferem na reprodução, bem como da ênfase na seleção dos machos pelo desempenho reprodutivo, ao invés de características ponderais e de conformação racial (Silva, 2000).

Das biotécnicas colocadas à disposição da eficiência reprodutiva, nenhuma atingiu a excelência da inseminação artificial, pela sua distribuição universal, custos reduzidos, efeitos econômicos e introgressão acelerada de genes (Pinheiro, 1997). O autor considera que o Brasil necessita esgotar o potencial da inseminação artificial antes de almejar qualquer salto tecnológico, pois, além de pré-requisito para a obtenção de avanços no campo da moderna biotecnologia, a inseminação deverá realizar no país a desejável revolução na produção de carne e de leite. A utilização da inseminação no Brasil ainda é reduzida, mas crescente, atingindo apenas 4,7% do rebanho bovino em 1997, índice que representa um acréscimo de 60% quando comparado ao ano de 1993 (Pacheco, 1998).

O futuro da tecnologia de criopreservação do sêmen, de acordo com Coulter (1992), está condicionado à ampliação dos conhecimentos sobre a bioquímica espermática e ao estudo dos componentes do plasma seminal e diluidores de sêmen, bem como a interação destes com o próprio espermatozóide. No plasma seminal de várias espécies, muitas proteínas foram descritas e caracterizadas e sua identificação sistemática representa uma ferramenta importante para o entendimento de sua natureza e funções no plasma seminal.

O presente estudo teve como objetivos a identificação e a quantificação das proteínas presentes no plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos de alta congelabilidade do sêmen, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional. As diferenças no perfil protéico do plasma seminal podem determinar influências sobre o desempenho reprodutivo dos reprodutores e permitir a detecção de marcadores protéicos, objetivando a seleção de indivíduos mais produtivos, contribuindo para o maior

conhecimento dos eventos relacionados à fisiopatologia da reprodução, à tecnologia do sêmen e à inseminação artificial, nas duas espécies.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espermatozóide

O espermatozóide é o produto final da gametogênese no macho, a qual ocorre dentro dos túbulos seminíferos do testículo. Este processo envolve uma série de divisões mitóticas das espermatogônias-tronco, duas divisões meióticas dos espermatócitos, remodelamento morfológico das espermatídas durante a espermiogênese e a liberação das células livres no lúmen dos túbulos seminíferos (Mann & Lutwak-Mann, 1981). O espermatozóide dos mamíferos possui dois principais componentes, a cabeça e a cauda ou flagelo. A cabeça constitui-se do acrossoma, núcleo e pequenas porções de estruturas do citoesqueleto e citoplasma. O acrossoma é um grande grânulo secretório que rodeia e recobre a borda anterior do núcleo. Este é uma estrutura haplóide, contendo somente um de cada par de cromossomas, com a cromatina altamente condensada a partir das fases finais da espermatogênese (Eddy, 1988).

A cauda é formada pelo colo, peça intermediária, peça principal e peça final. As principais estruturas do flagelo são o axonema central ou filamento axial, a bainha de mitocôndrias e a bainha fibrosa externa. O filamento axial é composto de dois microtúbulos centrais cercados por nove microtúbulos duplos, em toda a extensão do flagelo. Os microtúbulos são compostos de  $\alpha$  e  $\beta$ tubulina e de dineína, com atividade ATPase, provendo energia para a movimentação. A peça intermediária é envolvida por uma bainha de mitocôndrias, em forma de dupla espiral e a peça

principal contém a bainha fibrosa. As fibras densas e a bainha fibrosa formam o citoesqueleto do flagelo. A cauda, assim como a cabeça, é justaposta à membrana plasmática, contendo pouco citoplasma. Os espermatozoides dos mamíferos apresentam estas características gerais, ocorrendo diferenças espécie-específicas no tamanho e na forma da cabeça, bem como no tamanho total do flagelo e de seus componentes. As estruturas especializadas do espermatozoide refletem suas atividades funcionais específicas. O acrossoma contém enzimas essenciais para a fecundação, enquanto o flagelo contém fontes de energia necessárias para produzir a motilidade (Eddy, 1988).

Uma característica única do espermatozoide é que sua membrana plasmática é subdividida em domínios regionais distintos, que diferem na composição e função. A evidência de que a organização e a composição da membrana variam entre as diferentes regiões da superfície levou ao conceito de que a membrana é um mosaico de domínios restritos (Singer & Nicholson, 1972), que refletem funções especializadas da superfície e dos componentes citoplasmáticos do espermatozoide. Independentemente da região espermática, a membrana consta de uma dupla camada lipídica, de uma interface água-fosfolipídeos e do glicocálix. A membrana é uma estrutura fluida, permitindo que suas moléculas se movam dentro do plano da camada dupla e assimétrica, indicando que a composição de proteínas e lipídios das camadas duplas diferem umas das outras. Essas propriedades são necessárias para assegurar seu papel como uma barreira semipermeável (De Leeuw *et al.*, 1990). A composição da membrana plasmática vai sendo modificada durante o trânsito que o espermatozoide realiza no epidídimo, quando exposto aos líquidos das glândulas acessórias e também no trato

reprodutivo da fêmea, durante a capacitação (Amann, 1987, Amann *et al.*, 1993).

## **2.2 Maturação espermática**

A célula espermática passa pelo processo de maturação no epidídimo, sendo transportada sucessivamente através de seus segmentos, cabeça, corpo e cauda, permanecendo estocada neste último, até a ejaculação. A maioria dos fluidos e proteínas de origem testicular são reabsorvidos e secreções do epitélio seminífero são adicionadas. A maturação do espermatozóide depende de uma exposição sequencial aos fluidos epididimários, de diferentes composições (Amann, 1987; Amann *et al.*, 1993; Amann, 1995). As enzimas e proteínas presentes neste fluido modificam os constituintes da membrana plasmática e outros componentes da célula, bem como o metabolismo espermático. A célula adquire a capacidade de fecundação, de motilidade progressiva e também torna-se sensível ao choque frio (Mann & Lutwak-Mann, 1981; Hammerstedt & Parks, 1987; Amann, 1995). A ação da testosterona é essencial para a secreção de proteínas pelo epitélio da cauda e do corpo do epidídimo, embora outras secreções possam ser produzidas sem o estímulo de andrógenos. Na ejaculação, as células espermáticas recebem ainda os conteúdos das glândulas acessórias (próstata, glândulas bulbo-uretrais e

vesículas seminais), que são lançadas na uretra (Mann & Lutwak-Mann, 1981; Amann, 1987; Amann *et al.*, 1993).

### 2.3 Capacitação espermática

Logo após a ejaculação, o espermatozóide dos mamíferos não é capaz de fertilizar oócitos, adquirindo esta capacidade somente após um certo período no trato genital da fêmea. Austin (1952) denominou este período de capacitação.

Vários estudos demonstraram que a capacitação é uma etapa de maturação do espermatozóide, que envolve vários eventos bioquímicos. Ocorrem alterações dentro da célula espermática, como entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  (Handrow *et al.*, 1989), elevação do pH citosólico (Parrish *et al.*, 1989), redução da ligação das proteínas espermáticas à calmodulina (Leclerc *et al.*, 1990), elevação nas concentrações espermáticas de AMP cíclico (Parrish *et al.*, 1994), modificação da motilidade espermática (Harrison, 1996) e fosforilação de proteínas. As etapas iniciais envolvem um decréscimo na taxa de colesterol/fosfolipídeos da membrana. A albumina e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) presentes no trato genital da fêmea facilitariam o efluxo de colesterol que ocorre nesta fase (Go & Wolf, 1985; Ehrenewald *et al.*, 1990).

Depois de capacitado, o espermatozóide interage com os oócitos e sofre a reação acrossômica, que envolve a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal, com liberação das enzimas do acrossoma. A capacitação *in vivo* ocorre nos genitais da fêmea, mas é possível induzir a capacitação *in vitro* incubando os espermatozóide no fluido do oviduto

(Parrish *et al.*, 1989; McNutt & Killian, 1991) ou, em algumas espécies, em um meio contendo certos compostos, como seroalbumina (Go & Wolf, 1985), cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) (Handrow *et al.*, 1989), bicarbonato e heparina (Parrish *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1990).

## 2.4 Criopreservação do sêmen

Durante o congelamento e descongelamento há, pelo menos, dois tipos de estresse impostos à célula espermática: o primeiro é relativo às mudanças de temperatura e o segundo decorre da formação e dissolução dos cristais de gelo (Watson, 1995). A rápida redução da temperatura (+20 a 0 °C), ou choque térmico, causa uma perda na integridade da membrana e na função celular. A severidade do efeito é dependente da taxa de resfriamento, da variação da temperatura, bem como da espécie. Ocorrem alterações na peça intermediária, inativação das mitocôndrias, a cauda se dobra em 180° e a movimentação espermática cessa, indicando modificações na membrana e em mecanismos intracelulares. Os lipídeos da membrana sofrem uma fase de transição de um estado fluido, onde a cadeia de ácidos graxos é assimétrica, para um estado de gel, no qual a cadeia de ácidos graxos torna-se rígida e paralela (De Leeuw *et al.*, 1990; Hammerstedt *et al.*, 1990).

A gema de ovo é o agente de proteção mais efetivo contra o choque térmico, sendo incluída em vários diluidores, mas não é igualmente efetiva



em todas as espécies. O espermatozóide suíno é pouco protegido pela presença da gema de ovo durante o resfriamento (Benson *et al.*, 1967). O componente ativo da gema de ovo, a fosfatidil-colina, age na superfície da célula (Simpson *et al.*, 1986), modificando os eventos de transição de fase da membrana. Embora os espermatozoides ejaculados do carneiro e do touro sejam susceptíveis ao choque frio, os espermatozoides coletados diretamente da *rete testis* ou da cabeça do epidídimo sofrem menos esse efeito. Durante a maturação no epidídimo, o espermatozóide não apenas recebe a capacidade de movimentação e de fertilização, como também a susceptibilidade ao choque frio (Mann & Lutwak-Mann, 1981; Hammerstedt & Parks, 1987).

Mesmo com boas técnicas de preservação, a sobrevivência pós-descongelamento ainda permanece restrita a 50% da população espermática. Como consequência, na maioria das espécies, os índices de fertilidade obtidos com o sêmen congelado são menores que os com sêmen fresco, o que em geral é compensado com a inseminação de um número maior de espermatozoides.

Um protocolo ótimo de congelamento deverá preservar a maior proporção de células e a integridade das diferentes estruturas envolvidas (Holt, 2000). As membranas plasmática, acrossomal interna e mitocondrial são particularmente vulneráveis ao congelamento, mas o citoesqueleto também é afetado pelas modificações ocorridas (Watson, 1995; Holt, 2000). Como a despolimerização do citoesqueleto é necessária para permitir que a membrana plasmática e a membrana externa do acrossoma se aproximem e promovam a exocitose do conteúdo acrossomal, isto deve ocorrer também na fusão desorganizada de membrana que ocorre na

criopreservação. O estresse induzido pela formação dos cristais de gelo é associado com alterações de pressão osmótica na fração não congelada (De Leeuw *et al.*, 1990; Hammerstedt *et al.*, 1990; Watson, 1995). Com a congelação da água e cristalização como gelo, fora da célula, a pressão osmótica do remanescente líquido do soluto aumenta, atingindo não só a membrana, mas também o citoesqueleto (De Leeuw *et al.*, 1990; Watson, 1995; Holt, 2000). O glicerol, crioprotetor geralmente utilizado, reduz o ponto de congelamento e as concentrações de eletrólitos na fração não congelada, reduzindo o dano osmótico às células.

A congelação provoca alterações em todas as células, mesmo nas que sobrevivem ao processo (Watson, 1995). Estas alterações dizem respeito à permeabilidade e à fluidez das membranas, permitindo o ingresso do cálcio nas células (Robertson & Watson, 1986; 1987). São também observadas mudanças em sua composição lipídica (Buhr *et al.*, 1994) e nos padrões de polipeptídeos (Ollero *et al.*, 1998). Como consequência da desestabilização da membrana, a duração de vida da célula espermática fica reduzida.

As modificações ocorridas durante o processo de criopreservação são semelhantes às observadas no espermatozóide capacitado. Watson (2000) considera os danos ocorridos na membrana pela criopreservação como uma versão desorganizada da reação acrossômica. Entretanto, ao contrário da população espermática de um ejaculado, composto de células heterogêneas que não adquirem todos os atributos necessários à fertilização ao mesmo tempo (Amann *et al.*, 1993), a população de espermatozoides que passa pela criopreservação é mais homogênea, estando apta à fertilização em apenas um curto espaço de tempo (Watson, 1995).

Um problema de importância prática, enfrentado pela indústria de congelamento do sêmen, é o que se denomina “bons e maus congeladores”. Ocorre que, independentemente da qualidade inicial, o sêmen de certos indivíduos sofre menos prejuízos com a congelamento. No caso dos “maus congeladores”, uma alternativa seria aumentar a concentração espermática nas amostras desses animais, ou tentar protocolos que possam otimizar os resultados de congelamento. Entretanto, tais soluções representam custos maiores e, em geral, não resolvem o problema (Watson, 1995).

## **2.5 Avaliação dos reprodutores**

O primeiro aspecto a considerar na indicação de um reprodutor a doador de sêmen é a segurança quanto ao seu valor zootécnico real, com apoio em testes de progênie e de desempenho reprodutivo. Dados de desenvolvimento ponderal são importantes e devem ser relacionados com o desenvolvimento testicular, idade e qualidade de sêmen (Vale Filho, 1989). Desta forma, especialmente em touros jovens, a relação do peso corporal, circunferência escrotal e a concentração, motilidade e percentual de defeitos espermáticos são importantes, devendo ser observados em conjunto, na avaliação andrológica. Com referência ao desenvolvimento reprodutivo, as raças zebuínas são mais tardias, cronologicamente, quando comparadas às taurinas. Vários autores referem que a puberdade e a

maturidade sexual têm sido alcançadas em uma mesma faixa de peso corporal, porém em idades diferentes, entre as raças européias e indianas (Wolf *et al.*, 1965; Fonseca *et al.*, 1975; Cardoso, 1977; Endo *et al.*, 1978; Fields *et al.*, 1982; Garcia *et al.*, 1987; Perry *et al.*, 1988). Entretanto, estas diferenças não alteram o curso dos eventos morfofisiológicos característicos da puberdade e da maturidade sexual, que variam apenas em suas etapas cronológicas (Cardoso, 1977).

Os padrões de julgamento de reprodutores têm sido amplamente discutidos, sendo utilizados os critérios de avaliação por pontuação, proposto pela American Society for Theriogenology e pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, com padrões específicos para a circunferência escrotal e o comportamento sexual em zebuínos (Fonseca, 1989; Pineda *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 1997).

A crescente utilização das raças zebuínas em várias regiões do Brasil tem revelado sua grande adaptabilidade ao meio. No Brasil Central, em 3.000 exames andrológicos realizados, o desempenho de touros das raças zebuínas mostrou-se superior aos animais *Bos taurus* e suas cruzas (Teles Lobo, 1999). Em touros europeus, observa-se acentuada diminuição da qualidade do sêmen após três anos em ambiente tropical, ocorrendo degenerações testiculares pela dificuldade dos animais em manter equilíbrio térmico, o que determinou maior taxa de descarte em animais europeus e cruzados do que nos zebuínos (Vale Filho *et al.*, 1979; Valentin *et al.*, 1995). Em avaliação andrológica realizada em 600 animais da raça Nelore e cruzados Nelore-europeu, aos 20-24 meses de idade, verificou-se que os touros Nelore apresentaram melhor qualidade de sêmen do que os cruzados, melhor resposta à eletro-ejaculação e menor taxa de descarte

(Valentin, 1998). Dados semelhantes foram registrados quanto ao congelamento de sêmen, avaliado em 1.239 ejaculados de animais da raça Nelore e da raça Marchigiana. Na análise do volume ejaculado, da concentração espermática, da motilidade, do vigor, da motilidade pós-descongelamento, de anormalidades maiores, de anormalidades totais, de doses congeladas e doses desprezadas, os reprodutores Nelore apresentaram índices superiores em todas as características, com exceção do volume ejaculado e doses congeladas, sugerindo maior adaptação da raça à região onde foi realizado o estudo (Castro *et al.*, 1992). Entretanto, Anchieta *et al.* (2001), ao analisarem 21.133 ejaculados de touros *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, doadores de sêmen de central de inseminação, não verificaram diferenças significativas no total de ejaculados aproveitados e descartados entre as espécies, mas referiram que o número médio de doses aproveitadas por ejaculação congelada foi de 143 nos reprodutores taurinos e de 123 nos zebuínos.

## **2.6 Avaliação da qualidade do sêmen**

A qualidade do sêmen é fator essencial para o êxito da inseminação artificial. Por um lado, se relaciona com o potencial genético do touro na transmissão de fatores desejáveis à sua progênie, tais como alta produtividade, precocidade e boa adaptação ao meio ambiente onde vive. De outro lado, a qualidade de sêmen relaciona-se com a capacidade de

fecundação dos espermatozóides, que podem sobreviver e fecundar o óvulo, mesmo quando submetidos a altas diluições ou a temperaturas de congelamento (Vale Filho, 1989).

Os testes de laboratório utilizados para avaliação das amostras de sêmen são baseados em diversos critérios, e têm como objetivo alta correlação com as taxas de fecundação. Vários testes podem ser utilizados, entre eles a verificação da motilidade progressiva, por avaliação microscópica do percentual de células móveis, método fotográfico ou vídeomicrografia (Elliot, 1973; Casagrande et al., 1979; Amelar, 1980), a relação entre espermatozóides vivos e mortos (Lasley *et al.*, 1942). O vigor da motilidade representa a força da movimentação espermática, influencia a velocidade espermática e, em geral, é avaliado em graus de zero a cinco. A morfologia espermática pode ser avaliada por microscopia de contraste ou interferência de fase (Blom, 1950; Saacke *et al.*, 1968; Blom, 1973; Saacke & White, 1972).

Os testes de termo-resistência avaliam a motilidade espermática após a incubação das amostras a temperaturas de +37°C por quatro horas, ou de +46°C por 30 minutos (Jondet & Rabadeaux, 1976; Jondet *et al.*, 1978) e são indicados como testes complementares. O teste de retenção do acrossoma, que é baseado na correlação entre a motilidade e a integridade do acrossoma (Saacke, 1970), consiste na incubação da amostra por três horas a +37°C, e também é indicado como um teste complementar.

A avaliação da integridade funcional da membrana, verificada pela capacidade de absorção de água para manter o equilíbrio osmótico quando o espermatozóide é incubado em solução hiposmótica (teste hiposmótico) (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa & Zavos, 1994), é também recomendada

como teste complementar na avaliação do sêmen. Da mesma forma, a utilização de corantes fluorescentes, como diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI), permite a verificação das células com membranas íntegras e das parcialmente ou totalmente danificadas (Harrison & Vickers, 1990; Coelho *et al.*, 1995).

Outras avaliações podem ainda ser realizadas, como a velocidade de penetração em muco cervical bovino (Predojevic, 1970), a penetração da zona livre de óvulo de hamster (Bousquet & Brackett, 1982) e a inseminação heterospérmica (Beatty *et al.*, 1969; Saacke *et al.*, 1980).

Todos estes protocolos podem ser usados na avaliação da qualidade do sêmen bovino congelado, pelas centrais de inseminação ou por organismos de controle ou padronização. Existem diferenças acentuadas entre eles, tanto no aspecto de facilidade de aplicação, quanto em suas correlações com a fecundação a campo. A motilidade espermática, avaliada em percentagem de células móveis, tem sido o critério mais utilizado (Desjardins & Hafs, 1962; Casagrande *et al.*, 1979; Pace, 1980; Goffaux, 1986). Com respeito às anormalidades espermáticas, existe uma relação inversa com a fertilidade, conforme já referido por vários autores (Blom, 1950, 1973; Saacke *et al.*, 1968; Saacke & White, 1972; Vale Filho, 1989). Os testes de termo-resistência apresentam correlações altas com a fertilidade a campo e podem ser associados com a retenção acrossômica pós-congelação. Os testes de avaliação da integridade de membrana estão correlacionados com a motilidade espermática e com taxas de fertilização *in vitro* (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa & Zavos, 1994).

De acordo com Bartlett (1980), o critério mais importante na qualidade do sêmen é o número de espermatozóides viáveis na dose, pois

em amostras com número de viáveis inferior a  $8 \times 10^6$ /dose, ocorre queda no índice de fertilidade (Pace, 1980; Goffaux, 1986). Na relação entre o número de espermatozóides na dose inseminante e a fertilidade são também observadas variações individuais entre os reprodutores (Hafs *et al.*, 1970; Vale Filho, 1989).

A portaria SDR-26, de 05/09/1996, do Ministério da Agricultura, normatiza os padrões de exigência para o sêmen bovino congelado. A motilidade pós-descongelção deverá ser de 30% e o vigor da motilidade igual ou superior a 3. Nas doses com 10 milhões de espermatozóides móveis, o percentual de defeitos totais deverá ser igual ou inferior a 30 e o de defeitos maiores, considerados por Blom, 1973, como de influência direta na fertilidade, igual ou inferior a 20. Nas doses com 6 a 10 milhões de espermatozóides móveis, o limite para o total de defeitos é de 20% e para defeitos maiores de 10%.

Como testes complementares, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) recomenda o teste de termoresistência lento (cinco horas a  $+38^{\circ}\text{C}$ ) e o teste de termoresistência rápido (30 minutos a  $+46^{\circ}\text{C}$ ), sendo liberadas as amostras que apresentarem 15% de espermatozóides móveis ao final do teste. Poderá ainda ser utilizado o teste de retenção do acrossoma (três horas a  $+37^{\circ}\text{C}$ ), sendo liberadas as amostras que apresentem, no mínimo, 40% de acrossomas íntegros após esta incubação.

De acordo com Saacke *et al.* (1994), os reprodutores diferem não somente na fertilidade, mas também no número mínimo de espermatozóides requeridos para alcançar o nível máximo de fertilidade. Os autores referem que no sêmen existem fatores compensáveis, aqueles que, quando se eleva o número de espermatozóides na dose inseminante, se



obtem maiores índices de fertilidade. Já os fatores incompensáveis estão relacionados a diferenças entre os machos e, mesmo com maiores concentrações espermáticas na dose inseminante, não há melhora na fertilidade.

## **2.7 Plasma seminal**

O plasma seminal é uma mistura complexa de secreções originárias do testículo, epidídimos e glândulas acessórias do macho (próstata, glândulas bulbo-uretrais e vesículas seminais), que se agrega aos espermatozoides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas (Mann & Lutwak-Mann, 1981). É constituído de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Cerca de 30 a 60% do volume ejaculado é representado pela secreções das vesículas seminais, que contêm altas concentrações de frutose, ácido cítrico, sódio e potássio e prostaglandinas. A secreção prostática é ácida, contendo grandes quantidades de sódio, citrato, zinco, além de putrescina, espermidina e espermina. Já a secreção das glândulas bulbo-uretrais é mais alcalina que as das demais glândulas acessórias (Miller & Ax, 1988).

Várias substâncias do plasma seminal são capazes de ligar-se ao espermatozoide, agindo como fatores de decapacitação, ou estimulando a reação acrossômica, a interação espermatozoide-óvulo e a fertilização (First & Parrish, 1987; Ax & Lenz, 1987; Miller *et al.*, 1990; Maxwell & Johnson, 1999). Foram referidos efeitos do plasma seminal na manutenção da motilidade espermática (Baas *et al.*, 1983; Graham, 1994), no aumento da resistência ao choque térmico (Pursel *et al.*, 1973; Ollero *et al.*, 1997) e

na viabilidade e integridade de membrana do espermatozóide (Maxwell *et al.*, 1997). Contrariamente, foram referidos efeitos negativos do plasma na motilidade (Iwamoto *et al.*, 1993), na viabilidade (Dott *et al.*, 1979) e na motilidade pós-descongelamento (Watson, 1995).

Para a separação e identificação dos componentes protéicos do plasma seminal podem ser utilizadas a gel filtração, a eletroforese unidimensional e a eletroforese bidimensional.

## **2.8 Eletroforese do plasma seminal**

Os primeiros trabalhos de eletroforese realizados no plasma seminal utilizaram eletroforese em papel, gel de agar, gel de amido, acetato de celulose (Szumowski, 1956, 1958; Vesselinovitch, 1959; Rocha, 1974). Mais recentemente, tem-se utilizado a eletroforese uni ou bidimensional em gel de poliacrilamida (Wolfe *et al.*, 1993; Killian *et al.*, 1993; Frazer *et al.*, 1996; Flowers, 1998; Mortarino *et al.*, 1998; Brandon *et al.*, 1999). A técnica unidimensional separa as frações protéicas de acordo com seu peso molecular e a bidimensional permite a separação pela carga elétrica e pelo peso molecular (O'Farrel, 1975, O'Farrel *et al.*, 1977).

## **2.9 Proteínas do plasma seminal**

O trabalho pioneiro de eletroforese do plasma seminal em bovinos foi conduzido por Larson & Salisbury (1954) e, desde então, a técnica de eletroforese vem sendo utilizada para o mapeamento e identificação dos componentes protéicos do ejaculado, bem como para investigar a relação destes componentes com padrões de fertilidade normais e alterados, congelabilidade e/ou viabilidade do sêmen, em várias espécies animais (Wolfe *et al.*, 1993; Killian *et al.*, 1993; Frazer *et al.*, 1996; Flowers, 1998; Kulkarni *et al.*, 1998) e inclusive no homem (Baccetti *et al.*, 1979; Morgentaler *et al.*, 1990; Marchini *et al.*, 1990; Autiero *et al.*, 1991).

A fração protéica predominante no fluido seminal bovino é constituída por um grupo de quatro proteínas ácidas (BSP-A1; BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30 kDa), que se ligam aos espermatozóides, na ejaculação. Foi verificado que são produzidas pelas vesículas seminais e foram inicialmente purificadas e caracterizadas por Esch *et al.* (1983), Manjunath & Sairan (1987) e Manjunath *et al.* (1987). Como a BSP-A1 e a BSP-A2, também denominadas de PDC-109 (Esch *et al.*, 1983), possuem idêntica seqüência de amino-ácidos, são consideradas uma simples unidade bioquímica (Thérien *et al.*, 1999). As BSPs representam 40 a 57% das proteínas totais do plasma seminal, sendo 25% a 47% BSP A1-A2, 3% a 5% BSP-A3 e 3% a 7% BSP-30 kDa (Nauc & Manjunath, 2000).

As BSPs teriam três funções no metabolismo espermático, agindo como fatores decapacitantes, desencadeando a reação acrossomal e influenciando no transporte de cálcio durante a capacitação. Como fatores decapacitantes, as BSPs evitariam a reação acrossomal precoce, devido à

sua capacidade de interação com fosfolipídeos de membrana. Como desencadeadoras da reação acrossomal, mediam a troca do colesterol e fosfolipídeos entre a membrana plasmática do espermatozóide e as lipoproteínas de alta densidade do trato reprodutor da fêmea, alterariam a permeabilidade das membranas e ativariam a fosfolipase A, facilitando a entrada de cálcio. Agiriam ainda, como pontes de ligação entre as membranas espermáticas e a calmodulina, participando dos eventos regulatórios do transporte de cálcio durante a capacitação e a reação acrossomal e, na superfície espermática, promovendo um aumento no número de sítios de ligação à heparina (Desnoyers & Manjunath, 1992; Manjunath *et al.*, 1993; Thérien *et al.*, 1999). As proteínas BSP estariam relacionadas também com as modificações ocorridas na congelação do sêmen. Após a criopreservação, foi verificada uma redução de cerca de 10% das proteínas de membrana do espermatozóide, mas cada uma das proteínas BSP sofria uma redução de cerca de 70% (Nauc & Manjunath, 2000).

No plasma seminal de suínos, um grupo de proteínas homólogas denominadas de espermedesinas, representa mais de 90% das proteínas do plasma seminal. São produzidas principalmente nas vesículas seminais, mas também pelos túbulos retos e *rete testis* (Calvette *et al.*, 1995) e estão relacionadas com a capacitação espermática e a interação espermatozóide-óvulo e foram também identificadas no plasma seminal de equinos e caninos (Töpfer-Petersen *et al.*, 1995). A espermedesina presente no plasma seminal de bovinos é a aSFP (acid seminal fluid protein), uma proteína ácida, purificada por Einspanier *et al.* (1991), com papel na regulação da motilidade e do metabolismo espermático, protegendo a

membrana espermática de processos oxidativos por evitar a peroxidação lipídica (Schöneck *et al.*, 1993 e 1996). Recentemente, Tedeschi *et al.* (2000) identificaram outra espermadesina no plasma seminal bovino, que foi denominada Z13 e que apresenta características semelhantes às referidas para a aSFP.

É ainda referida a presença de seminalplasma, proteína com atividade antimicrobiana (Scheit *et al.*, 1986), que mais tarde verificou-se ser a mesma proteína referida como caltrina (Sitaram *et al.*, 1986), peptídeo básico de 6,5 kDa, relacionado à regulação do transporte de cálcio no espermatozóide bovino (Clark *et al.*, 1993). Inibidores da acrosina, denominados BUSI-I e BUSI-II, também foram identificados no plasma seminal (Meloun *et al.*, 1983). O mapeamento protéico do plasma seminal de bovinos, realizado através de eletroforese bidimensional e coloração por prata e Azul de Comassie, evidenciou 250 manchas protéicas. Entre as proteínas identificadas, foram citadas a albumina, a glicoproteína EPV 20, a TIMP II, e a clusterina de cadeia alfa (Mortarino *et al.*, 1998).

A análise do perfil protéico do plasma seminal de bubalinos em gel de poliacrilamida indicou que, em casos de patologias, como alteração da motilidade, viabilidade e fertilidade dos espermatozóides, ocorria ausência de algumas proteínas, o que não foi confirmado em bovinos (Kulkarni *et al.*, 1997). Da mesma forma, Martins Júnior *et al.* (1995a) não verificaram associação entre o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal, em gel de poliacrilamida a 7%, em sistema tampão descontínuo, com algumas características do sêmen como volume, motilidade, concentração e patologias espermáticas, em 38 touros de diferentes raças. Entretanto, Wolfe *et al.* (1993) verificaram diferenças entre os polipeptídeos do plasma

seminal de bovinos sadios e de animais que sofreram degeneração testicular induzida pelo calor.

## 2.10 Proteínas do plasma seminal e fertilidade

A relação entre a composição protéica do plasma seminal e índices de fertilidade de reprodutores foi referida em bovinos, suínos e eqüinos. Usando eletroforese bidimensional no plasma seminal de touros de alta fertilidade (cerca de 5% acima do índice médio de fertilidade da central de inseminação), Killian *et al.* (1993) referem como marcadores de alta fertilidade as proteínas de 55 kDa e de 26 kDa, posteriormente identificadas respectivamente como osteopontina (Cancel *et al.*, 1997) e lipocalina tipo PGD sintetase (Gerena *et al.*, 1998). Duas outras proteínas, de 16 kDa e ponto isoelétrico de 4,1 e 6,7, seriam os marcadores dos animais de baixa fertilidade.

A osteopontina é uma glicoproteína ácida, isolada da matriz óssea bovina, cartilagens, pele fetal, cérebro, rins, ovário, útero, bem como da urina, bile e leite bovinos (Kerr *et al.*, 1991; Sorensen & Petersen, 1993). No homem, foi localizada na superfície luminal de células epiteliais, em vários tecidos normais e teria função protetora em infecções bacterianas (Brown *et al.*, 1992). Foi também identificada nas células de Sertoli, epitélio seminífero e cauda do espermatozóide de ratos (Siiteri *et al.*, 1995). Em bovinos, a osteopontina foi localizada nas ampolas e vesículas

seminais, mas não foi detectada no testículo, epidídimo, canal deferente, próstata e glândula bulbo-uretrais, indicando que a proteína não se ligaria ao espermatozóide, ou que teria apenas uma associação transitória com a membrana espermática (Cancel *et al.*, 1999). No plasma seminal de reprodutores suínos, Flowers (1998) relacionou a presença da proteína de 55 kDa, descrita por Killian *et al.* (1993), com índices superiores de penetração espermática *in vitro*. Em fecundações heterospérmicas, o maior índice de nascimentos foi atribuído aos animais com concentração elevada desta proteína no plasma seminal. Em eqüinos, Brandon *et al.* (1999) identificaram no plasma seminal uma proteína de 72 Kda, pI 5-6, positivamente correlacionada com a fertilidade dos reprodutores e que apresentou homologia estrutural com a proteína bovina de 55 kDa referida por Killian *et al.* (1993).

A proteína lipocalina tipo PGD sintetase é expressa no sistema nervoso central e nos órgãos genitais de vários mamíferos (Urade & Hayaishi, 2000). Glicodelina, como é denominada a lipocalina humana, apresenta duas diferentes isoformas glicosiladas, a glicodelina-A (GdA), secretada pelo endométrio, placenta, fluido amniótico e a glicodelina-S (Gd-S), sintetizada no trato reprodutor masculino, principalmente pelas vesículas seminais e secretada no plasma seminal (Koistinen *et al.*, 1996; Urade, 1997; Halttunen *et al.*, 2000). Homens oligozoospermicos apresentaram concentrações significativamente menores de PGDS no plasma seminal do que homens normozoospermicos (Tokugawa *et al.*, 1998). Baixas taxas de fecundação *in vitro* foram associadas a altos níveis de glicodelina total no plasma seminal humano (Koistinen *et al.*, 2000). A família lipocalina é capaz de realizar transporte de pequenas moléculas,

como retinóides, necessários para o crescimento, diferenciação celular e manutenção da integridade epitelial.

Outro grupo de proteínas do plasma seminal, relacionadas com a fertilidade, foi isolado com base em sua capacidade de ligação à heparina. O grupo representa cinco classes de proteínas de ligação à heparina (heparin binding proteins, HBPs), com pesos moleculares variando entre 14 a 30-31 kDa e concentração média de 19,2 mg e 0,14 mg/ml no plasma seminal bovino ejaculado e membrana espermática, respectivamente (Miller *et al.*, 1990; Bellin *et al.*, 1994). Em touros, a presença das HBPs 21, 24 e 31 kDa na membrana espermática foi associada a índices superiores de fertilidade. (Bellin *et al.*, 1996). Os índices de fertilidade dos animais com a proteína de 31 kDa presente na membrana espermática foram 15% superiores aos índices dos reprodutores nos quais não foi verificada a presença da proteína (Sprott *et al.*, 2000)

### **2.11 Proteínas do plasma seminal, viabilidade e congelabilidade do sêmen**

A composição protéica do plasma seminal estaria também relacionada a diferenças na manutenção da integridade das células espermáticas, viabilidade e congelabilidade do sêmen, em várias espécies. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal teriam efeitos negativos na motilidade dos espermatozóides de bovinos (Al-Somai *et*



*al.*,1994) e de bubalinos (Ahmad *et al.*, 1996). Entretanto, no plasma seminal ovino, uma fração de 5-10 kDa protegeria a integridade das células espermáticas durante as manipulações ocorridas em procedimentos de fecundação *in vitro* (Ashworth *et al.*, 1994). A incubação de espermatozóides ovinos com plasma seminal reverteu as lesões ocorridas quando a célula espermática livre de plasma era submetida a choque térmico. As proteínas do plasma seminal ligaram-se ao espermatozóide, modificando as características funcionais da membrana lesada, avaliada por marcadores fluorescentes. Três frações do plasma seminal foram capazes de reverter as lesões, mas a fração de 20 kDa apresentou a maior atividade, agindo em 50% dos espermatozóides submetidos ao choque térmico (Barrios *et al.*, 2000).

Em suínos, o armazenamento do sêmen por períodos superiores a três dias compromete a qualidade espermática, mas existem reprodutores que mantêm a capacidade de fertilização por períodos superiores a cinco ou seis dias, provavelmente por diferenças individuais no ejaculado dos cachaaços (Weitze, 1992). Os animais que mantêm a viabilidade espermática por períodos mais longos devem ser identificados e o uso estratégico de seu sêmen foi indicado como medida prática para evitar baixos índices de fertilidade, decorrentes da utilização de doses inseminantes empregadas após 48 horas de armazenamento (Bortolozzo & Wentz, 1997).

Com referência à congelabilidade do sêmen, Bentley *et al.* (1984) sugeriram que o melhor desempenho na capacidade fecundante do sêmen congelado de galos estaria relacionado com a maior concentração de determinada proteína presente no plasma seminal e a indicaram como parâmetro para a seleção de reprodutores. A composição do plasma seminal

equino também afeta a criopreservação dos espermatozoides, pois a adição de plasma seminal de garanhões de baixa congelabilidade (motilidade inferior na descongelação) diminuiu a motilidade espermática. Com a análise por microscopia de fluorescência, verificou-se que não ocorreram alterações na integridade de membrana (Aurich *et al.*, 1996).

Em búfalos, a congelabilidade do sêmen foi associada com a concentração de proteínas totais (Dhami & Kodagali, 1989). Em bovinos, a concentração total de proteínas no plasma seminal estaria inversamente relacionada com a congelabilidade do sêmen (Moustafa & Mézáros 1980; Pangawkar *et al.*, 1988), pois as proteínas do plasma seminal se ligariam às proteínas de membrana do espermatozoide, reduzindo sua resistência, aumentando a permeabilidade de membrana e o conseqüente dano celular durante o congelamento (Moore & Hibbitt, 1976). Entretanto, na raça Nelore, a concentração total de proteínas no plasma seminal parece estar diretamente relacionada com a congelabilidade do sêmen (Francheschini *et al.*, 1993).

Como possível marcador para a congelabilidade do sêmen em bovinos de várias raças, foi referido um polipeptídeo de cerca de 51,8 kDa, presente no plasma seminal de 100% dos reprodutores de alta congelabilidade e ausente em 75% dos animais de baixa congelabilidade (Roncoletta *et al.*, 1997). Em animais da raça Gir, a congelabilidade do sêmen foi relacionada à presença de um polipeptídeo de peso molecular aproximado de 61 kDa, detectado no plasma seminal dos animais de alta congelabilidade e ausente no plasma seminal do grupo de baixa congelabilidade. Foram encontradas diferenças marcantes e individuais entre os perfis eletroforéticos dos

animais, especialmente na faixa de polipeptídeos de pesos moleculares superiores a 29 kDa (Roncoletta *et al.*, 1999).

## 2.12 Composição do plasma seminal de taurinos e zebuínos

As diferenças na composição do plasma seminal entre reprodutores taurinos e zebuínos, em sua maioria verificadas através de eletroforese unidimensional, referem-se a variações na proteína total e presença ou ausência de determinadas bandas protéicas. Em touros zebuínos, foram evidenciadas 8 frações protéicas no plasma seminal, através de eletroforese em acetato de celulose, sendo a maior delas composta de alfa globulinas (Rocha *et al.*, 1974a) . Os animais com alterações reprodutivas apresentaram variações nas frações de albumina e alfa globulinas (Rocha *et al.*, 1974b).

A análise das proteínas do plasma seminal de taurinos e zebuínos, por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 7%, em sistema tampão descontínuo, evidenciou diferenças entre o padrão de migração das proteínas entre as referidas espécies e ainda que determinadas bandas protéicas presentes em zebuínos estavam ausentes nos reprodutores europeus (Martins Júnior *et al.*, 1995b). No plasma seminal de reprodutores de diferentes graus de congelabilidade de sêmen, utilizando eletroforese unidimensional, Roncoletta (1999) verificou que os touros zebuínos apresentaram valores superiores nas bandas protéicas de 14, 45, 49, 56, 60, 76, 79 e 82 kDa e os taurinos nas bandas de 11, 27, 54, 58, 62, 68, e 72 kDa. A concentração de proteína total foi superior nas amostras de plasma

seminal de zebuínos, enquanto que os taurinos apresentaram o perfil protéico mais homogêneo (Roncoletta *et al.*, 1997; Roncoletta, 1999).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Local de execução**

O experimento foi conduzido junto ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, Laboratório de Inseminação Artificial de Faculdade de Veterinária da UFRGS e central de inseminação artificial Lagoa da Serra S A.

### **3.2 Materiais**

Acrilamida, bis-acrilamida, uréia, glicina, anfolinas, agarose, TEMED, azul de Comassie, azul de bromofenol, foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech do Brasil Ltda. SDS,  $\beta$  mercaptoetanol, Igepal, persulfato de amônio e marcadores de peso molecular foram adquiridos da Sigma. Os demais reagentes de outras marcas (Nuclear, Synth e Reagen), eram de qualidade P.A.

### **3.3 Animais**

Foram utilizados 14 reprodutores adultos, doadores de sêmen de uma central de inseminação artificial. Sete eram taurinos, sendo dois da raça Holandesa, cinco da raça Red Angus e os outros sete eram zebuínos da raça Nelore. Os animais apresentavam índice superior a 90% de ejaculados viáveis pós-descongelamento do sêmen, apresentando valores superiores aos padrões mínimos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) e foram considerados, de acordo com os critérios da Central, como animais de alta congelabilidade do sêmen. O índice de congelabilidade dos reprodutores foi baseado em um total de 2.396 congelamentos realizadas. Todos os animais foram mantidos em regime de manejo e alimentação utilizado pela Central.

### **3.4 Coleta das Amostras**

O sêmen foi coletado por vagina artificial e, após o exame, uma alíquota de 2,0 ml foi centrifugada por 15 a 20 minutos a 1.500g, para a obtenção do plasma seminal, foi mantida em botijão de nitrogênio líquido, para posterior análise. De cada reprodutor foi coletada uma amostra de plasma seminal, sendo realizadas duas replicações de cada uma nos géis para eletroforese. As coletas das amostras foram realizadas em agosto de

1999 em 10 animais (sete taurinos e três zebuínos) e em novembro de 2000, em quatro zebuínos.

### **3.5 Análise das Amostras**

As amostras de plasma seminal foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas 60 minutos a 10.000 g e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas de 50 µl, que foram congeladas e mantidas a - 70 ° C, até o momento do uso.

#### **3.5.1 Dosagem de proteínas totais**

Previamente a cada corrida de primeira dimensão foi realizada a determinação das proteínas totais de cada amostra, de acordo com LOWRY et al. (1951), em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640, usando como padrão albumina sérica bovina.

### 3.5.2 Eletroforese bidimensional

Após a dosagem de proteínas, as amostras foram submetidas à eletroforese bidimensional conforme descrito por O'Farrel *et al.* (1977), modificado por Rodnight *et al.* (1988), que consiste na separação das proteínas segundo duas propriedades distintas. A primeira dimensão (*NEPHGE*), consiste em uma focalização isoeétrica em gradiente de pH não equilibrado, em gel tubular de poliacrilamida a 3,5%, com gradiente de pH 2 – 10, obtido através de polímeros com um pKa definido, denominados anfolinas. O método é denominado não equilibrado porque as proteínas não atingem seu ponto isoeétrico. A segunda dimensão consiste em uma eletroforese em placas de gel (*SDS-PAGE*), onde as proteínas previamente separadas na primeira dimensão migram conforme sua massa molecular.

### 3.5.3 Primeira dimensão

A mistura para a preparação do gel utilizado na primeira dimensão consistiu de acrilamida/bisacrilamida (29:1) 3,5%; uréia 9,2M; anfolina pH 2-4 0,5%, anfolina pH 5-7 0,5%, anfolina pH 3,5-10 4,0%, Igepal 2% e TEMED 0,2%. Esta mistura permaneceu estocada em alíquotas de 0,4 ml a -20 ° C e no momento do uso, foi descongelada e adicionada de 0,2 ml de



persulfato de amônio a 10%, como agente catalizador, para que ocorresse a polimerização do gel .

Logo após a adição de persulfato, capilares de vidro de 15 cm de comprimento e diâmetro interno de 1,0 mm foram preenchidos pela mistura, até três a quatro cm da extremidade superior, através de mangueiras de silicone. Após a polimerização do gel (cerca de duas a três horas), os capilares foram montados na cuba de primeira dimensão, onde 16 amostras podiam ser simultaneamente submetidas à separação eletroforética (Figura 1).

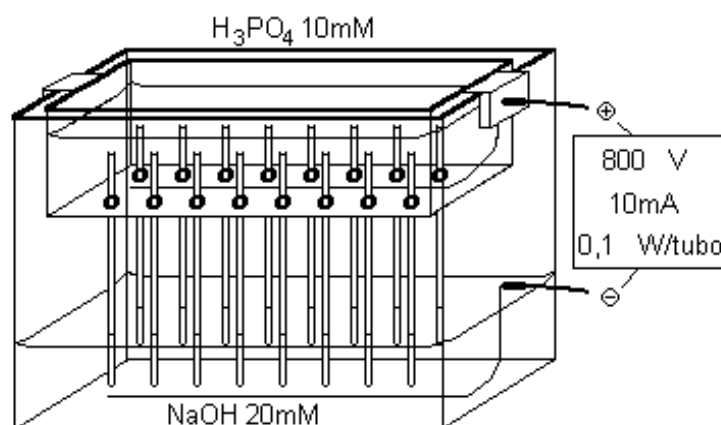


FIGURA 1. Primeira dimensão –NEPHGE.

As amostras de plasma seminal foram adicionadas a uma solução de uréia 8M. Foram aplicados 100  $\mu$ g e 200  $\mu$ g de proteína, em volume de 15  $\mu$ l, na porção superior de cada tubo de primeira dimensão, para observação das proteínas de baixo e alto peso molecular, respectivamente. Como de

alto peso foram consideradas as proteínas de pesos moleculares até 40 kDa e como de baixo peso as que apresentassem pesos entre 41 a 200 kDa. Sobre a amostra foi aplicado 10 µl de solução de uréia 8M contendo citocromo C, que serviu como marcador da frente de corrida.

Como tampão superior foi utilizado  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 mM (anólito) e como inferior Na OH 20 mM (católito). A voltagem aplicada foi de 800V, corrente de 10 mA e potência de 0,125 W/gel, utilizando-se de fonte EPS 3501 (Amersham Pharmacia Biotech). A corrida teve a duração de 90 minutos e foi interrompida quando a banda visível de citocromo C atingiu cerca de 7,5 cm de migração. Os capilares foram então retirados da cuba, identificados e mantidos em  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da transferência para a segunda dimensão.

### **3.5.4 Segunda Dimensão**

#### **3.5.4.1 Preparação do gel**

Os géis foram confeccionados entre duas placas de vidro (16cm x 14cm), separadas por espaçadores (1mm de espessura). Para se obter a uniformização dos géis, um conjunto de oito placas foi montado em uma caixa acrílica, cada par formado por uma placa inteira e outra com bisel. O espaço entre as placas foi preenchido com gel de separação. Para a

separação das proteínas de baixo peso molecular foi utilizado o gel de separação a 15% (acrilamida/bis-acrilamida 39:1, 15%, tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,1%, glicerol 7,46%, TEMED 0,06% e persulfato de amônio 0,045%, em volume total de 400ml). Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão Sigma M3913, de pesos moleculares de 6,5 a 66 kDa.

Para a separação de proteínas de alto peso molecular foi utilizado o gel a 8% (acrilamida/bis-acrilamida 39:1, 8%, tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,1% , glicerol 7,46%, TEMED 0,06 % e persulfato de amônio 0,045%, volume total de 400ml). O gel de separação foi colocado até a altura de 2,5 cm da borda superior da placa com bisel. Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão SDS 6H (Sigma), de pesos moleculares entre 29 a 205 kDa .

Após a polimerização do gel de separação (cerca de 90 minutos), foi colocado sobre ele o gel de entrada (acrilamida/bis-acrilamida 39/1, 4%, tampão Tris-HCl 500mM, pH 6,8, SDS 0,1%, TEMED 0,05% e persulfato de amônio 0,098%). Após a total polimerização dos géis, a caixa acrílica era desmontada e o conjunto de placas contendo os géis era guardado sob refrigeração, envolto em plástico. No momento do uso, as placas foram fixadas nas cubas acrílicas de segunda dimensão.

#### **3.5.4.2 Transferência**

A transferência consiste na passagem dos géis tubulares dos capilares de vidro para as placas de segunda dimensão. O géis de primeira dimensão foram descongelados e expulsos rapidamente dos capilares, com auxílio de uma seringa conectada a uma mangueira de silicone, para uma solução de equilíbrio (Tris 25 mM, glicina 190mM, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol, 4 ml por gel). Os géis permaneceram nesta solução por 15 minutos sob agitação suave. Esta etapa é necessária para que as proteínas presentes no gel de primeira dimensão combinem-se com o SDS e possam ser separadas na segunda dimensão. Posteriormente, os géis de primeira dimensão foram colocados horizontalmente sobre o gel de entrada, nas placas de SDS-PAGE, de dois a dois, com as extremidades ácidas voltadas para dentro da placa. Após a retirada de bolhas, foram fixados com agarose 0,5%, contendo 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 2).

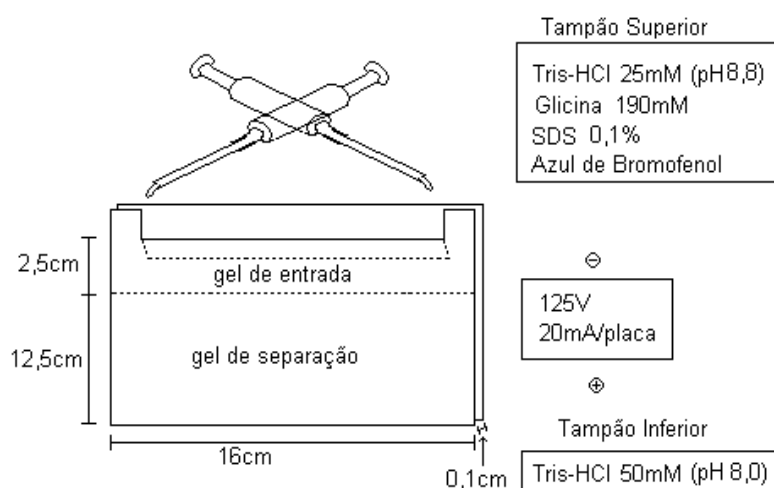


FIGURA 2. Esquema representando a segunda dimensão.

A parte superior da cuba foi preenchida com tampão superior (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%- pH 8,8) e a inferior com tampão Tris - HCL 50 mM, pH 8,0. A corrida iniciava com a voltagem máxima fixada de 125V, corrente de 20 mA/placa, utilizando-se a fonte EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech.). A corrida tinha duração de aproximadamente 6,5 horas, utilizando-se como frente de corrida o azul de bromofenol.

#### **3.5.4.3** Coloração e secagem dos géis

Após a corrida eletroforética, os géis de SDS-PAGE foram retirados das cubas e colocados em solução corante de Azul de Comassie (Comassie Blue 250 R, 0,15%; ácido acético 7%; metanol 53%, em água bidestilada), por aproximadamente 18 horas. Após esse período, retirava-se o corante e os géis eram colocados em solução fixadora (ácido acético 7% e metanol 53%, em água bidestilada), durante cerca de 3 horas, sob agitação, com substituição da solução a cada hora. Ao término desta etapa, a solução de fixação foi substituída pela solução de secagem, composta de glicerol 1%, metanol 50%, em água). Os géis foram mantidos nesta solução por duas horas sob agitação e, a seguir, colocados para secar entre duas folhas de papel celofane, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente. Depois de secos, os géis foram identificados e escaneados (Scan Jet 6100-HP), para quantificação das proteínas.

### **3.6 Quantificação das proteínas**

A quantificação das bandas protéicas foi baseada na densidade óptica das bandas, analisada pelo programa Optic Quant Acquisition & Analysis (version 02.00, Packard Instruments Company). A densidade óptica das bandas protéicas analisadas, expressa em pixéis, foi quantificada em percentagem relativa, isto é, em relação ao total de proteínas de uma área previamente definida e constante para todos os géis, que representou 100% e cada banda correspondeu a um percentual deste total. Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi verificada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no plasma seminal bovino.

### **3.7 Identificação das proteínas por seqüenciamento do N-terminal**

As bandas protéicas **7** e **23** foram encaminhadas para o MGIF (Molecular Genetics Instrumentation Facility) da Universidade da Georgia, EUA, para identificação do N-terminal por seqüenciamento automatizado, através do seqüenciador de proteínas modelo 494 (Applied Biosystems). Para tanto, foi realizada sua transferência dos géis secos para um disco de

*PVDF* (Hybond-P, Amersham Pharmacia), de acordo com o método descrito por Gonçalves & Rodnight (1993).

### **3.7.1 Eletrotransferência para membrana de *PVDF***

As proteínas de interesse foram removidas de oito géis de segunda dimensão e transferidas para a membrana pelo método de Gonçalves e Rodnight (1993), que possibilita a transferência de proteínas contidas em vários géis bidimensionais para um único disco de *PVDF*.

#### **3.7.1.1 Rehidratação do gel**

As bandas contendo as proteínas de interesse foram cortadas dos géis bidimensionais e equilibradas em 1ml de tampão para equilíbrio (CAPS10mM 19 ml, glicerol 40%, SDS 0,5%), por 15 minutos. Após, o celofane que recobria as peças foi retirado e estas foram recolocadas nesse tampão, preparado sem SDS e adicionado de 50 µl de beta- mercaptoetanol. As peças permaneceram nesse meio por 35 minutos, com agitação suave a cada 5 minutos, sendo após colocadas na coluna de eletrotransferência.

### 3.7.1.2 Coluna de eletrotransferência

Um capilar de vidro (11cm x 5mm de diâmetro), preenchido com um gel de suporte (acrilamida/bis 39:1, 5%; Tris-HCl pH 8,0 378mM; TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,066%) foi preparado com um dia de antecedência, e mantido em geladeira até o uso. A coluna de vidro, contendo o gel polimerizado, foi conectada a uma rolha de borracha perfurada longitudinalmente, para o posterior encaixe na cuba de eletrotransferência. As peças de gel, previamente equilibradas, foram colocadas sobre o gel de suporte e recobertas com agarose 0,5%, após a retirada de bolhas. Logo após a agarose ter gelificado, colocava-se sobre ela 0,1 ml de tampão CAPS glicerol (CAPS 10mM, glicerol 40%) e sobre este o tampão superior (CAPS 10mM, metanol 20%, pH 13). O disco de *PVDF* foi então colocado sobre a extremidade superior da coluna e recoberto com membrana de diálise, que foi fixada na coluna através de anéis de borracha.

### 3.7.1.3 .Eletrotransferência



A coluna foi colocada na cuba, sendo após colocados o tampão inferior (CAPS 10mM, pH 13) e superior (CAPS 10mM, metanol 20%, pH 13), respectivamente nas extremidades inferior e superior da cuba, que foi conectada à fonte EPS 300, com voltagem de 300 V e amperagem de 10 mA, durante 1 hora. O disco de PVDF foi retirado e colocado sobre um papel absorvente para secagem, sendo posteriormente encaminhado para realização do seqüenciamento.

A proteína **23** foi submetida a digestão tríptica, pois apresentava o N-terminal bloqueado, impossibilitando seu seqüenciamento.

### **3.8 Digestão tríptica**

De acordo com a metodologia descrita anteriormente, foi realizada a transferência da proteína **23**, dos géis secos para um disco de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amershan Pharmacia). Após este procedimento, o disco de nitrocelulose foi bloqueado com PVP-360 em ácido acético 0,6%, por 60 minutos a 37°C, lavado repetidamente com água ultra pura e após com tampão bicarbonato de amônio 50 mM. A seguir, o disco de nitrocelulose foi incubado com 25 µl de tripsina TPCK-tratada em 0,1% de TFA (1 mg/ml) em um frasco contendo 200 µl de tampão bicarbonato de amônio 50 mM, por 18 horas a 37°C. Após este período, novamente foi adicionado de 25 µl de tripsina TPCK-tratada e incubado por 6 horas. A digestão foi interrompida pela adição de TFA 10%. O eluato foi obtido através de duas

lavagens do disco de nitrocelulose com 200 µl de água ultra pura. Este eluato, contendo os peptídeos resultantes da ação da tripsina sobre a proteína, foi liofilizado e enviado para sequenciamento.

### **3.9 Imunoidentificação**

Para confirmação da identidade de duas proteínas de alto peso molecular detectadas neste trabalho, foi realizada a técnica de *western blotting*, ou imunoidentificação.

#### **3.9.1 Imunoidentificação de osteopontina**

O procedimento de imunoidentificação envolveu a transferência das proteínas de géis de poliacrilamida a 8% para a membrana de nitrocelulose e posterior reação com anticorpo policlonal anti-osteopontina, seguido do método da peroxidase-estreptoavidina-biotina e luminol. O anticorpo anti osteopontina foi cedido pelo Dr. Gary Killian, do J. O. Almquist Center - Pennsylvania State University-EUA.

##### **3.9.1.1 Eletrotransferência**

A proteína foi transferida do gel para a membrana de nitrocelulose, através do sistema semi-seco (Bio Rad). Após a corrida eletroforética, o gel foi montado sobre o ânodo do aparelho, da seguinte forma: duas folhas de papel filtro para *blotting* (Amersham Pharmacia), a membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia), o gel cortado, contendo a área da proteína de interesse e novamente, duas folhas de papel filtro. As folhas de papel filtro e a nitrocelulose apresentavam a mesma dimensão do gel a ser transferido e, previamente, todos foram embebidos em tampão Bjerrum (Tris 48mM, glicina 39mM, metanol 20%). O cátodo foi colocado sobre este sistema de camadas e as condições de transferência foram de 15 V de voltagem e 2,0 mA/cm<sup>2</sup> de corrente, por 60 minutos. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi imersa por cinco minutos em solução fixadora (metanol 40% e ácido acético 10%) e lavada com água destilada. Para confirmação da transferência, a membrana foi corada durante três minutos com corante de Ponceau (Ponceau 0,5% e ácido acético 15% em água bidestilada) e descorada em água bidestilada.

### **3.9.1.2** Imunoidentificação

A membrana de nitrocelulose foi incubada com 3 ml de M-TBS (*milk* -TBS), que consiste de 5% de leite em pó desnatado em TBS (Tris 20mM,

NaCl 500mM; pH7,5), em agitação suave, a 4°C, por 18-20 horas. Esta etapa, denominada bloqueio, é realizada para que a caseína se ligue a todos os locais da nitrocelulose onde não ocorreu ligação com proteínas da amostra, impedindo a ligação inespecífica do primeiro anticorpo com a membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio, a nitrocelulose foi lavada três vezes com 3ml de T-TBS (TBS adicionado de 0,05% de Tween-20), cada lavagem com duração de cinco minutos e incubada por duas horas, sob agitação, com o primeiro anticorpo, anticorpo policlonal anti-osteopontina caprina, diluído em M-TBS na proporção de 1:1000, sendo posteriormente lavada por 15 minutos em T-TBS. Em seguida, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário, anti-imunoglobulina biotinizada de coelho, conjugada a peroxidase e estreptoavidina (PACTH 173537, Amersham Pharmacia), por duas horas, sob agitação suave. O anticorpo foi diluído em 1:3000 em M-TBS e, ao final desta etapa, foi repetido o protocolo de lavagens já descrito. A identificação da reação foi efetuada através da revelação de filme de raio X utilizando-se o método do luminol. Este método baseia-se na reação do luminol com a peroxidase existente na membrana, com emissão de luz, que pode ser detectada pela impressão em filme de raio X. A membrana foi imersa por um minuto nos reagentes 1 e 2 (1:1) do luminol e colocada em contato com o filme de raio X (X-Omat Kodak), por aproximadamente 40 segundos.

### **3.9.2. Imunoidentificação de albumina**

A imunoidentificação da albumina foi realizada conforme o protocolo descrito nos itens 3.9.1.1 e 3.9.1.2, com algumas modificações, o bloqueio da membrana de nitrocelulose foi realizado com 2% de PVP 40 (2% de Polivinil pirrolidona em TBS). Como primeiro anticorpo foi utilizado anticorpo monoclonal anti-albumina sérica bovina (Sigma B2901), na diluição de 1:800 e como anticorpo secundário foi utilizado anti IgG de camundongo biotinilado, conjugado a peroxidase e estreptoavidina (PACTH 150714, Amersham Pharmacia).

### **3.10 Delineamento experimental e Análise estatística**

O delineamento experimental foi completamente casualizado, em um fatorial hierárquico, sendo considerado um dos fatores a espécie e outro fator os touros dentro da espécie.

Os logaritmos das percentagens relativas das bandas protéicas foram comparados entre as espécies por análise de variância (teste F). Para verificação da amplitude de variação das bandas protéicas, foi utilizado o coeficiente de variação, o quociente do desvio padrão pela média, multiplicado por 100. Como teste complementar foi utilizado o teste de Tukey, usando-se o nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (Statistical Analysis System).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Dosagem de proteína total**

Os valores médios observados na dosagem de proteína total realizada no plasma seminal dos reprodutores não diferiram estatisticamente entre as espécies, sendo de 75,96 mg/ml  $\pm$  17,67 para os taurinos e, para os zebuínos, de 75,16 mg/ml  $\pm$  19,54.

### **4.2 Proteínas de baixo peso molecular (10-40 kDa)**

Onze bandas protéicas foram analisadas e identificadas através de numeração ímpar, de 3 a 23, conforme pode-se verificar na Figura 3.

Na Tabela 1 estão expressos os valores do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI) aproximados, médias e desvio padrão das densidades ópticas observadas nas bandas protéicas de baixo peso molecular avaliadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos e os valores de P (valores da probabilidade do teste de comparação entre os reprodutores taurinos e zebuínos).

Pela análise do plasma seminal dos reprodutores taurinos e zebuínos (Tabela 1), verifica-se a presença de proteínas de pesos moleculares entre 10 e 26 kDa e pontos isoelétricos entre 4,1 e 8,5. As principais bandas

evidenciadas situaram-se em pesos moleculares de 10 a 16 kDa. A proteína mais ácida foi a **5** (16-17 kDa), com pI entre 4,1– 4,8 e a mais básica a banda **17** (15-16 kDa), com pI entre 8-8,5.

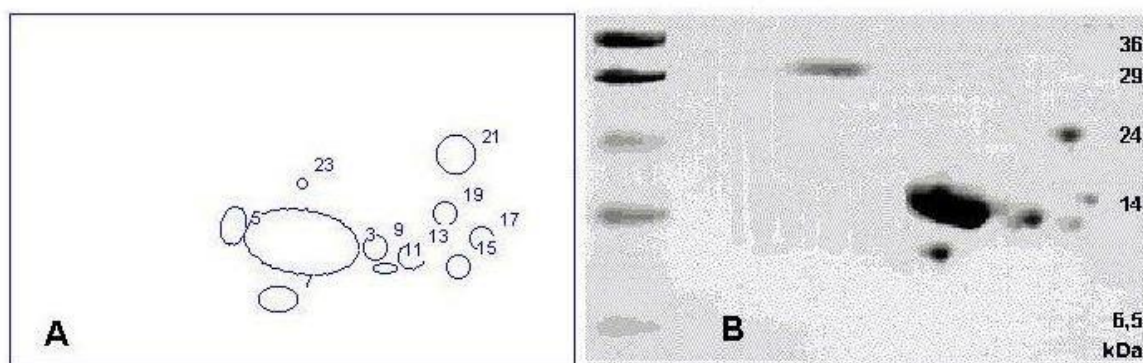


FIGURA 3. Representação esquemática das bandas protéicas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino e gel contendo os marcadores de pesos moleculares. Em A: Representação esquemática das bandas protéicas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino. A numeração indica as bandas descritas na Tabela 1. Em B: Proteínas do gel *SDS-PAGE* a 15%, visualizadas por azul de Comassie, contendo os marcadores de peso molecular e os respectivos pesos moleculares.

Em ambas as espécies, a banda protéica **3** foi a mais proeminente, com valores de 14,79% em europeus e de 16,70% em zebús. Nas demais bandas avaliadas, os maiores percentuais ocorreram, em taurinos, nas bandas **7** (2,66%), **21** (2,0%), **11** (1,39%), **5** (1,34%) e em zebuínos, nas bandas **21** (2,27%), **5** (1,99%), **7** (1,82%), **9** (1,52%) e **11** (1,2%).

**Tabela 1 - Pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) aproximados, média e desvio padrão das densidades ópticas relativas das bandas protéicas de baixo peso molecular analisadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre as espécies**

Banda protéica	PM kDa	pI	Taurinos		Zebuínos		P*
			Média %	Desvio	Média %	Desvio	
<b>3</b>	15 -16	4,7-5,2	14,79	± 3,45	16,70	± 5,86	0,89
5	16 -17	4,1-4,8	1,34	± 0,36	1,99	± 0,74	0,021
7	11 -12	4,8-4,9	2,66	± 0,43	1,82	± 0,61	0,015
9	14 -15	5,5-6,0	0,92	± 0,34	1,52	± 1,50	0,15
11	13 -14	6,0-6,5	1,39	± 0,54	1,20	± 0,19	0,406
13	14 -15	6,5-7,5	0,15	± 0,30	0,55	± 0,82	0,239
15	11- 12	7,5-8,0	0,55	± 0,08	0,68	± 0,09	0,003
17	14 -16	8,0-8,5	0,59	± 0,19	0,78	± 0,29	0,11
19	16 -18	7,0-7,5	0,16	± 0,25	0,41	± 0,29	0,07
21	20-24	7,2-7,5	2,00	± 0,33	2,27	± 0,40	0,039
23	20-22	4,8-5,2	0,54	± 0,14	0,30	± 0,25	0,041

\*Valor da probabilidade do teste de comparação entre espécies



Dentre as 11 bandas analisadas, cinco diferiram estatisticamente entre as espécies, as proteínas denominadas **5** (16-17 kDa, pI 4,1-4,8), **7** (11-12 kDa, pI 4,8-4,9), **15** (11-12 kDa, pI 7,5-8,0), **21** (20-24 kDa, pI 7,2-7,5) e **23** (20-22 kDa, pI 4,8-5,2), sendo que os reprodutores europeus apresentaram densidades ópticas superiores ( $P < 0,05$ ) nas bandas protéicas **7** e **23** e os zebuínos nas bandas **5**, **15** e **21**. As figuras 4 e 5 apresentam as bandas protéicas que diferiram significativamente entre as espécies.

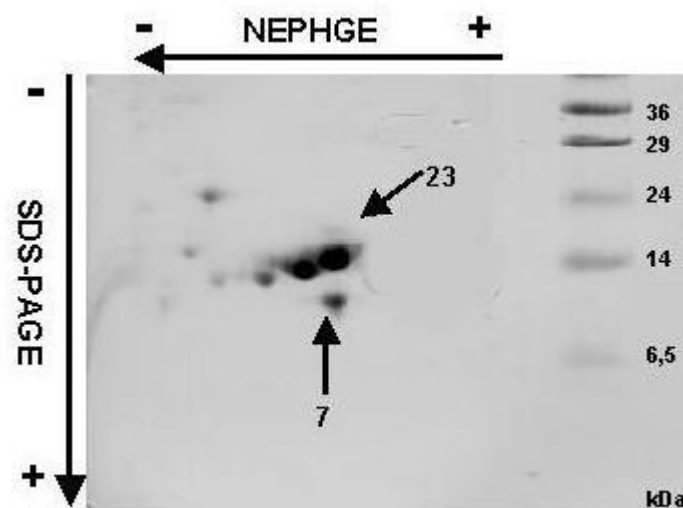


FIGURA 4. Proteínas do plasma seminal bovino com densidades ópticas superiores nas amostras de taurinos. Gel *SDS-PAGE* a 15%, corado por Comassie Blue. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (*NEPHGE*) na primeira dimensão. Os marcadores de peso molecular e os respectivos pesos estão colocados à direita. As setas indicam as bandas protéicas com densidades ópticas superiores em taurinos.

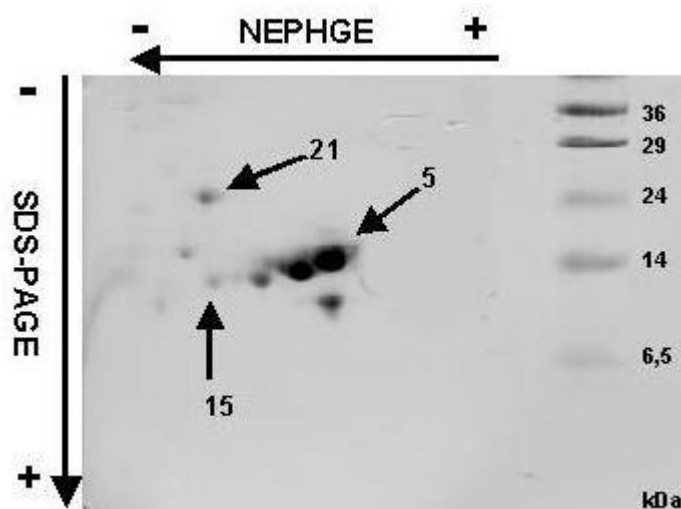


FIGURA 5. Proteínas do plasma seminal bovino, com densidades ópticas superiores nas amostras de zebuínos. Gel de *SDS-PAGE* a 15%, corado por azul de Comassie. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado, na primeira dimensão. Os marcadores de peso molecular estão colocados à direita, com os respectivos pesos. As setas indicam as bandas protéicas com densidades ópticas superiores em zebuínos.

As bandas protéicas avaliadas não apresentaram a mesma frequência de aparecimento nas amostras das espécies, nem o mesmo coeficiente de variação, evidenciando também variações individuais significativas, conforme verificado na Tabela 2.

Em reprodutores taurinos, com exceção das bandas **13** (14-15 kDa, pI 6,0-6,5) e **19** (16-18 kDa, pI 7,0-7,5) presentes nas amostras de 28,60% (2/7) dos reprodutores, as demais proteínas foram evidenciadas nas amostras de plasma seminal de 100% dos animais.

Tabela 2 - Freqüência relativa, coeficientes de variação (CV) das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal dos reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre os reprodutores

Banda	Taurinos			Zebuínos		
	Freqüência %	P*	C.V.	Freqüência %	P*	C.V.
3	100 (7/7)	0,810	23,33	100 (7/7)	0,023	35,09
5	100 (7/7)	0,349	26,86	100 (7/7)	0,008	37,21
7	100 (7/7)	0,232	16,16	100 (7/7)	0,011	33,50
9	100 (7/7)	0,066	36,95	100 (7/7)	0,034	98,83
11	100 (7/7)	0,023	38,84	71 (5/7)	0,000	69,16
13	28,60(2/7)	0,000	200,00	57 (4/7)	0,008	149,46
15	100 (7/7)	0,023	14,54	100 (7/7)	0,102	13,08
17	100 (7/7)	0,000	32,20	100 (7/7)	0,000	115,29
19	28,60 (2/7)	0,000	156,25	71 (5/7)	0,000	73,82
21	100 (7/7)	0,000	16,50	100 (7/7)	0,008	17,78
23	100(7/7)	0,000	25,92	71 (5/7)	0,002	85,20

\*Valor da probabilidade do teste de comparação entre reprodutores

As bandas protéicas **3** (15-16 kDa, pI 4,7-5,2), **5** (16-17 kDa, pI 4,1-4,8), **7** (11-12 kDa, pI 4,8-4,9) e **9** (14-15 kDa, pI 5,5-6,0) não apresentaram variações entre os touros e as demais diferiram significativamente entre eles.

Em zebuínos, as proteínas **11** (13-14 kDa, pI 6,0-6,5), **19** (16-18 kDa, pI 7,0-7,5) e **23** (20-22 kDa, pI 4,8-5,2) foram evidenciadas nas amostras de 71% dos reprodutores (5/7), a banda **13** (14-15 kDa, pI 6,5-7,0) em 57% (4/7) e as demais bandas estiveram presentes nas amostras de 100% dos animais. Nesta espécie, apenas a banda protéica **15** (11-12 kDa, pI 7,5-8,0) não apresentou diferença significativa entre os touros.

Analisando-se os coeficientes de variação, verifica-se que os menores coeficientes em reprodutores taurinos ocorreram nas bandas protéicas **15** (14,54), **7** (16,16), **21** (16,50), **3** (23,33) e em zebuínos nas bandas **15** (13,08) e **21** (17,78). Na maioria das proteínas avaliadas, os maiores coeficientes de variação ocorreram na espécie zebuína. Tanto em reprodutores europeus quanto em zebuínos, o menor coeficiente de variação foi observado na banda **15** e o maior na banda **13**.

#### 4.2.1 Seqüenciamento da banda protéica 7

O seqüenciamento N-terminal da banda **7**, realizado no Molecular Genetics Instrumentation Facility (MGIF) da Universidade da Georgia, EUA, apresentou a seqüência M/G D W L P R N T N/G X/G G XG

I L X/K, idêntica à da proteína ácida do fluido seminal bovino, aSFP. Os códigos da seqüência, obtidos através dos bancos de dados de proteínas PIR-International e SWISS-PROT, foram respectivamente, JQ1403 e P29392. Estes dados, bem como o perfil de eluição dos amino-ácidos, estão dispostos no Anexo A.

#### **4.2.2 Identificação da seqüência protéica da banda 23**

A seqüência protéica da banda **23**, YV [IGYPN] [XK] [NLE] [PI] [XG] X [AGK] [XLI] XXVXQ, cujo seqüenciamento foi também realizado no Molecular Genetics Instrumentation Facility (MGIF), mostrou similaridade estrutural com a proteína clusterina, código A35744 no Banco de seqüenciamento protéico PIR-International e P17697 no Banco SWISS-PROT, conforme se verifica no Anexo B.

#### **4.3 Proteínas De Alto Peso Molecular (41-200 kDa)**

As proteínas de alto peso molecular foram avaliadas de três bandas protéicas, denominadas 25, 27 e 29, conforme se observa na Figura 6 e na Tabela 3.

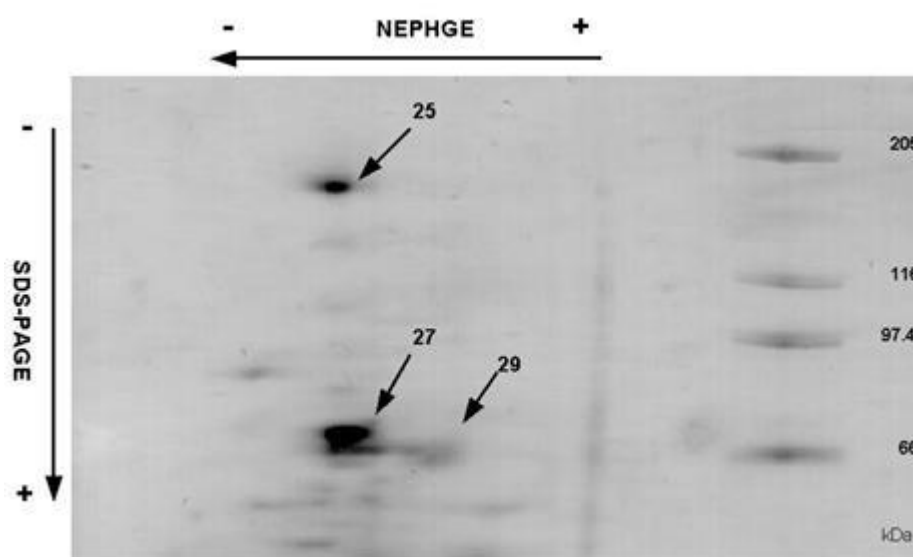


FIGURA 6. Proteínas de alto peso molecular do plasma seminal bovino. Gel *SDS-PAGE* a 8%, corado por azul de Comassie. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (*NEPHGE*) na primeira dimensão. Os marcadores de peso molecular e respectivos pesos estão colocados à direita.

A Tabela 3 apresenta os pesos moleculares e pI aproximados das bandas protéicas de alto peso molecular e valores das médias e desvio padrão das densidades ópticas das bandas observadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores europeus e zebuínos, em géis de poliacrilamida a 8% e os valores de P (valores da probabilidade do teste de comparação entre os reprodutores taurinos e zebuínos).

Verifica-se, pela Tabela 3, a presença de bandas protéicas de pesos entre 55 e 195 kDa, e pI entre 4,5 a 8. As percentagens relativas das proteínas situaram-se entre 1,22 a 2,13%. As três bandas analisadas foram detectadas nas amostras de 100% dos reprodutores europeus e zebuínos.

TABELA 3 - Pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) aproximados; média (%) e desvio padrão das densidades ópticas relativas das bandas protéicas de alto peso molecular observadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre as espécies e entre os reprodutores

Banda Protéica	PM KDa	pI	Taurinos			Zebuínos			P **
			Média	Desvio	p*	Média	Desvio	P*	
25	195	6,5-7,5	1,39	± 0,23	0,51	1,45	± 0,33	0,08	0,97
27	65-75	5,4	2,02	± 0,28	0,96	2,13	± 0,58	0,00	0,56
29	55	4,5	1,59	± 0,50	0,49	1,22	± 0,18	0,74	0,02

\* Valor da probabilidade do teste de comparação entre reprodutores

\*\* Valor da probabilidade do teste de comparação entre espécies

A maior densidade óptica foi observada na banda protéica **27**, com valores de 2,02% para taurinos e 2,13% para os zebuínos. Apenas a banda **29** evidenciou diferença significativa na densidade óptica entre as espécies, as demais não apresentaram variações. As bandas protéicas analisadas não apresentaram variações significativas nas densidades ópticas entre as amostras de plasma seminal dos reprodutores taurinos. Na espécie zebuína, apenas a banda **27** diferiu significativamente entre os touros.

Os coeficientes de variação das bandas **25**, **27** e **29** foram, respectivamente de 16, 14 e 31 para os taurinos e de 23, 27 e 15 para os zebuínos.

### 4.3.1 Imunoidentificação da albumina

A banda **27** foi imunoidentificada como albumina, utilizando-se o anticorpo monoclonal específico (anti-albumina sérica bovina), o qual não reagiu com nenhuma outra banda protéica na amostra avaliada, conforme observado na Figura 7.

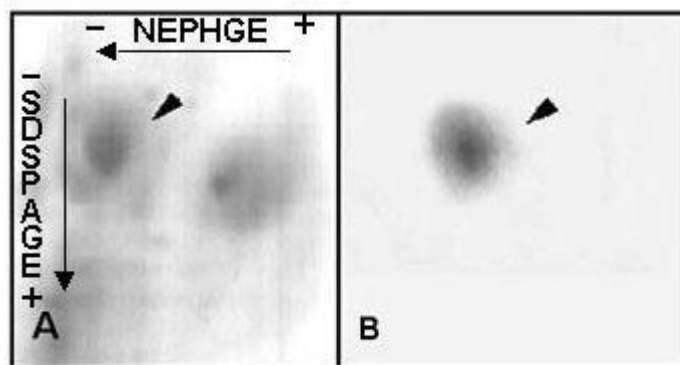


FIGURA 7. Imunoidentificação da albumina. Em A, a seta indica a posição da proteína no gel a 8%, corado. Em B: autoradiografia, mostrando a imuno detecção com antialbumina, da proteína (albumina) eletrotransferida do gel *SDS-PAGE* em membrana de nitrocelulose.

### 4.3.2 Imunoidentificação da osteopontina

Para realização da imunodeteção da osteopontina, foi utilizado o anticorpo policlonal específico (anti-osteopontina caprina), que reconheceu a proteína de 55 kDa, pI 4,5 presente no gel 2D *SDS-PAGE* a



8%, não reagindo com nenhuma outra banda protéica do plasma seminal bovino, o que pode ser observado na Figura 8.

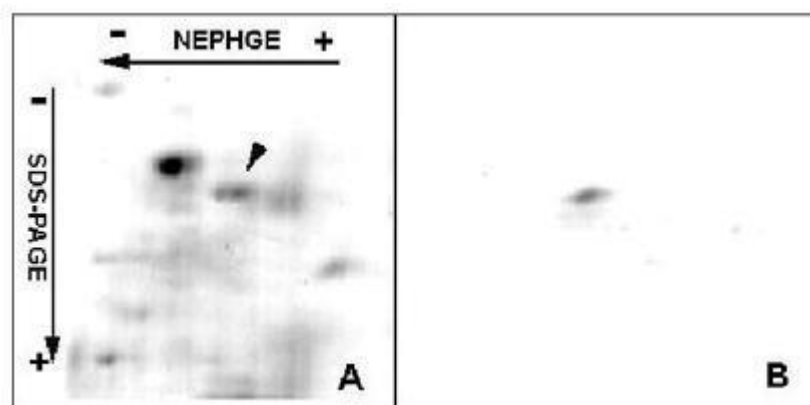


FIGURA 8. Imunoidentificação da osteopontina. Em A, a seta indica a posição da proteína no gel a 8%, corado. Em B: autoradiografia, mostrando a imuno detecção com antiosteopontina, da proteína (osteopontina) eletrotransferida do gel *SDS-PAGE* em membrana de nitrocelulose.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Dosagem de proteína

Os valores observados na dosagem de proteína total são semelhantes aos citados por Nauc & Manjunath (2000), Moustafa & Mézáros (1980), Pangawkar *et al.* (1988). Os últimos autores referiram ainda uma relação inversa entre a concentração total de proteínas no plasma seminal e a congelabilidade do sêmen, entretanto, Francheschini *et al.* (1993) observaram uma relação direta entre esses parâmetros. A ausência de variação na concentração de proteínas totais, entre taurinos e zebuínos, neste trabalho, pode ser explicada pelo fato de que os reprodutores de ambas as espécies não diferiam quanto à congelabilidade do sêmen. Contrariamente, Roncoletta (1999) encontrou variações significativas na concentração de proteínas totais em zebuínos ( $70,80 \text{ mg/ml} \pm 9,56$ ) e taurinos ( $57,30 \pm 11,76$ ) de alta congelabilidade do sêmen. Esta diferença pode ter ocorrido em razão do autor ter efetuado as coletas das amostras em diferentes períodos do ano, durante seis meses, o que poderia ter evidenciado flutuações na concentração protéica do plasma seminal.

## 5.2 Proteínas de baixo peso molecular

Com relação às bandas protéicas analisadas nos géis de poliacrilamida a 15%, observa-se que nas amostras de plasma seminal dos reprodutores taurinos verificou-se maior uniformidade de aparecimento das bandas protéicas, bem como menores coeficientes de variação e menor variação individual entre elas. Este resultado é semelhante ao de Roncoletta (1999), que considerou que o perfil protéico mais homogêneo dos taurinos se deveria à seleção genética que a espécie vem sendo submetida ao longo do tempo.

A banda **7** (identificada como aSFP por seqüenciamento N- terminal) e a **23** (identificada como clusterina), que apresentaram densidades ópticas significativamente superiores nas amostras de plasma seminal dos reprodutores taurinos, foram evidenciadas em 100% das amostras de ambas as espécies, indicando-as como possíveis marcadores das diferenças no perfil protéico do plasma seminal entre as espécies.

A banda **7** não apresentou variação significativa entre os reprodutores taurinos, indicando haver uma uniformidade em sua expressão entre os reprodutores desta espécie. Entretanto, entre os zebuínos, ocorreu variação significativa em sua concentração. A aSFP é uma proteína ácida, secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo bovinos (Einspanier *et al.*, 1991; Wempe *et al.*, 1992). Pertence à família das espermadesinas, que no

suíno inclui muitas lecitinas que se ligam ao espermatozóide e à zona pelúcida. De acordo com Einspanier *et al.*, (1991), a função da aSFP no plasma seminal bovino não foi ainda bem definida. Entretanto, foi verificado que na fecundação *in vitro*, a referida proteína liga-se fracamente ao espermatozóide, não estando relacionada à interação de gametas. Ela age como fator decapacitante ao invés de molécula de ligação à zona pelúcida (Dostàlovà *et al.*, 1994). Em concentrações fisiológicas, protegeria a membrana espermática de processos oxidativos por reduzir a peroxidação lipídica (Schönček *et al.*, 1993, 1996). Ao analisar as proteínas do plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos de alta e baixa congelabilidade do sêmen, Jobim *et al.* (2001) verificaram que esta banda protéica foi significativamente superior nas amostras de plasma seminal de touros de alta congelabilidade do sêmen, independentemente da espécie a que pertenciam. Além disso, não foram verificadas variações individuais significativas na concentração da banda entre os reprodutores, indicando uma uniformidade de expressão nas amostras dos grupos de diferentes graus de congelabilidade de sêmen. Entretanto, o presente estudo avaliou somente amostras de reprodutores de alta congelabilidade do sêmen, ficando evidente que neste grupo de reprodutores, a referida banda protéica apresentou densidade óptica superior nas amostras de plasma seminal da espécie taurina do que nas amostras de zebuínos.

A banda **23**, clusterina, apresentou variação individual significativa tanto em taurinos quanto em zebuínos. Esta glicoproteína possui sítios de ligação para a heparina (Pankhurst *et al.*, 1998). No plasma sanguíneo humano, regularia o transporte e a redistribuição de lipídios (Jenne *et al.*, 1991). Foi identificada no plasma seminal e espermatozóide de vários

mamíferos, bem como em humanos, (Howes *et al.*, 1998;Atlas-White *et al.*, 2000), estando envolvida na maturação espermática (Sylvester *et al.*, 1991). Em bovinos, taxas de imunodeteção positiva de clusterina nos espermatozóides foram inversamente correlacionadas a índices de concepção, (Ibrahim *et al.*, 2000). No entanto, Jobim *et al.* (2001a) encontraram densidades ópticas superiores desta banda protéica no plasma seminal de touros de alta congelabilidade do sêmen, indicando que estaria relacionada com a congelabilidade do sêmen.

Em zebuínos, verificou-se maior variabilidade na frequência de apresentação das bandas protéicas estudadas, maiores coeficientes de variação das mesmas, além de maior variação entre os reprodutores. Com exceção da banda **15**, as demais diferiram significativamente entre os reprodutores. Roncoletta (1999) também observou maior variabilidade das bandas protéicas entre os zebuínos. Nesta espécie, as bandas **5**, **15** e **21**, evidenciadas nas amostras de 100% dos reprodutores avaliados, apresentaram densidades ópticas significativamente superiores aos valores observados nas amostras dos touros europeus.

A banda protéica **15** (11-12 kDa, pI 7,5-8,0) foi detectada nas amostras de 100% dos reprodutores, apresentando coeficiente de variação em torno de 14% em ambas espécies, o que possibilita indicá-la como um parâmetro consistente de diferença entre reprodutores taurinos e zebuínos. Em taurinos, apresentou variação significativa entre os reprodutores. Entretanto, foi a única banda que não diferiu estatisticamente entre os zebuínos. Pelo peso molecular e pI, esta banda deve ser a B2 microglobulina (12 kDa, pI 8,24), proteína necessária para o processamento e expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I,

embora não participe de seu sítio antigênico (Fraga & Neuman, 1996). As moléculas de Classe I têm como função apresentar peptídeos antigênicos aos linfócitos T. A proteína foi identificada em vários tecidos normais e na urina, no soro sanguíneo e no colostro (Kunugiyama *et al.*,1996) e é produzida na célula de sertoli de ratos (O'Bryan & Cheng, 1997).

Por sua localização nos géis, a banda **5** poderia ser um fragmento da BSP A3 (15 kDa, pI 4,8-5,2), conforme referido por Manjunath *et al.* (1987) e Desnoyers *et al.* (1994), proteína relacionada com a capacitação espermática. Entretanto, também se assemelha à posição da proteína de 16 kDa, citada por Killian *et al.* (1993) como um dos marcadores encontrados no plasma seminal de reprodutores de baixa fertilidade. A mesma observação foi realizada por Frazer *et al.* (1996), ao analisar géis bidimensionais das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino.

A proteína **21** foi também evidenciada nas amostras de 100% dos animais, apresentando baixo coeficiente de variabilidade tanto em reprodutores europeus quanto em zebuínos. Por sua localização nos géis, pode-se supor que seja a proteína denominada P6 (20kDa), uma das principais proteínas básicas do plasma seminal bovino, considerada por Wempe *et al.* (1991) como idêntica à MCP-1 (monocyte chemoattractant protein -1) bovina. Estruturalmente, as proteínas MCP-1, -2, -3 formam a subfamília das beta quemocinas. Em doenças inflamatórias e aterosclerose em humanos, a MCP-1 faz a mediação de monócitos para os tecidos (Proost *et al.*,1996).

As bandas protéicas **3**, **9**, **11**, **13**, **17** e **19** não diferiram significativamente entre as espécies. As bandas **3** e **11** (13-14 kDa, pI 6,0-

6,5), pelo peso molecular e pI, devem tratar-se da proteína denominada PDC109 ou BSP A1/A2, principal proteína de ligação à heparina do plasma seminal bovino. Na ejaculação, liga-se especificamente aos colina-fosfolipídeos do espermatozóide, mediando a capacitação espermática pelo efluxo do colesterol e fosfolipídeos (Manjunath *et al.*, 1987; Desnoyers *et al.*, 1996; Thérien *et al.*, 1999). As BSP apresentam heterogeneidade de carga e são representadas por um grupo de bandas com mesmo peso molecular, mas distribuídas em pontos isoelétricos diferentes (Esch *et al.*, 1983; Desnoyers *et al.*, 1994). Frazer *et al.*, (1996) consideraram que as bandas protéicas do plasma seminal bovino encontradas entre 12-17 kDa e pI entre 4,6-7,2 eram as BSP. Observaram ainda que não ocorriam variações nas concentrações relativas destas proteínas entre os ejaculados de diferentes reprodutores. As bandas **3**, **5** e **11** deste estudo podem ser consideradas como as BSP. Os reprodutores taurinos diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) na banda **11**, mas nas demais não foram evidenciadas variações individuais. Este resultado concorda com o referido por Frazer *et al.* (1996), quando realizaram avaliação das proteínas do plasma seminal de taurinos. Entretanto, na espécie zebuína, as bandas consideradas como BSP diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) entre os touros, indicando a maior variabilidade do perfil protéico da espécie quando comparada à taurina, conforme referido por Roncoletta (1999).

A banda protéica **9** (14-15 kDa, pI 5,5-6,0) apresentou variação individual significativa tanto em taurinos quanto em zebuínos. Esta banda pode ser considerada como a espermoadesina denominada Z13, de 13 kDa, pI 5,5 que foi recentemente identificada no plasma seminal bovino por Tedeschi *et al.* (2000), apresentando características semelhantes às

referidas para a aSFP.

A banda **13** (14-15 kDa, pI 6,5-7,0) apresentou o maior coeficiente de variação nas duas espécies, sendo evidenciada nas amostras de apenas 28,6% dos touros europeus e em 60% dos zebuínos, diferindo significativamente entre os reprodutores nas duas espécies. O peso molecular e pI aproximados indicam que a proteína poderia ser EPV 20, uma glicoproteína expressa na glândula mamária, rim, baço, fígado (Larsen *et al.*, 1997) e plasma seminal bovinos (Mortarino *et al.*, 1998). A EPV 20 foi também referida como tendo peso molecular de 20 kDa (Larsen *et al.*, 1997). Suas ações biológicas no plasma seminal ainda não foram definidas (Nakamura *et al.*, 2000).

A banda **17** (15-16 kDa, pI 8,0-8,5) foi evidenciada nas amostras de 100% dos reprodutores de ambas as espécies. Pelo peso molecular e pI, esta banda pode ser a ribonuclease seminal bovina (BSrnase), considerada uma das principais proteínas básicas do plasma seminal bovino (Scheit, 1986). De acordo com Calvette *et al.* (1996), os bovinos são a única espécie que produz ribonuclease seminal.

A banda **19** apresentou grande variabilidade entre as amostras dos reprodutores taurinos, pois foi evidenciada somente em 28,60% destas; em zebuínos, ocorreu em 71% das amostras dos reprodutores. Pela sua localização nos géis, esta banda poderia ser a TIMPII (16-21 kDa, pI 6,9) secretada pelas células endoteliais da aorta bovina (De Clerk *et al.*, 1989), membro da família de inibidores de metaloproteinases isoladas originalmente de células de melanomas humanos (Montgomery *et al.*, 1994) e identificada no plasma seminal bovino por Calvette *et al.* (1996). Metaloproteinases são zinco-enzimas capazes de degradar componentes da



matriz extracelular na embriogênese normal e remodelamento de tecidos e que, com atividade irrestrita, poderiam causar grandes danos aos tecidos.

### 5.3 Proteínas de alto peso molecular

Com relação às proteínas consideradas de alto peso molecular, avaliadas nos géis de poliacrilamida a 8%, três bandas protéicas, denominadas **25**, **27** e **29** foram quantificadas por serem as de menor variação em todos os animais, recebendo inicialmente a denominação de pontos-âncora (Figura 6). Para uma melhor visualização das bandas, foi aplicado 200 µg de proteína nos géis tubulares da primeira dimensão. A análise de outras bandas de menor densidade óptica não foi realizada, em razão da dificuldade em se conduzir adequada identificação e quantificação, além da variabilidade entre animais, conforme referido por Frazer *et al.* (1996), Roncoletta (1997) e Roncoletta *et al.* (1999). Os últimos autores consideraram que a ocorrência de diferenças marcantes e individuais entre os perfis eletroforéticos das proteínas do plasma seminal entre os reprodutores foi ainda mais acentuada na faixa de polipeptídeos de pesos moleculares superiores a 29 kDa.

Na tabela 3, verifica-se que os reprodutores taurinos apresentaram percentuais significativamente superiores da proteína **29**, que foi imunoidentificada como osteopontina (Figura 8). Killian *et al.* (1993) observaram que esta proteína seria um dos marcadores de alta fertilidade

existentes no plasma seminal bovino. No entanto, Cancel *et al.* (1999) consideraram que a relação entre osteopontina no plasma seminal e a fertilidade em machos seria indireta, pela proteção a infecções bacterianas que a proteína realizaria na superfícies das glândulas acessórias, determinando, então, um efeito positivo na fertilidade.

Embora as densidades ópticas da proteína tenham sido significativamente superiores nas amostras de plasma seminal de taurinos, não se pode afirmar que estes apresentassem percentuais mais elevados de fertilidade do que os zebuínos. Para isso, seriam necessários outros protocolos e critérios de avaliação, que não foram utilizados por não ter sido este o objetivo da pesquisa. Tanto nas amostras de taurinos quanto nas de zebuínos, não foram verificadas diferenças individuais significativas nas densidades ópticas desta banda protéica, indicando uma uniformidade de expressão protéica entre os reprodutores, em ambas as espécies.

A osteopontina foi recentemente relacionada com a congelabilidade do sêmen. Jobim *et al.* (2001b) verificaram que as densidades ópticas da referida proteína foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) nas amostras de plasma seminal de reprodutores de alta congelabilidade de sêmen, independentemente da espécie a que pertenciam. Os autores observaram ainda que, nos grupos de diferentes graus de congelabilidade, não ocorreram variações individuais significativas entre as amostras. Entretanto, quando se comparam amostras de taurinos e zebuínos de alta congelabilidade de sêmen, como foi realizado no presente estudo, as maiores densidades ópticas foram detectadas nas amostras de plasma seminal de taurinos.

Em sua maioria, os trabalhos que identificaram esta banda foram realizados em raças taurinas. Na espécie zebuína, os resultados do presente estudo são provavelmente, os primeiros que quantificaram a osteopontina no plasma seminal. Além disso, as técnicas imunológicas realizadas confirmam a sua identificação.

Na proteína **27**, de 66 kDa e pI 5,4, que foi imunoidentificada como albumina (Figura 7), não foram observadas variações significativas nas densidades ópticas entre as amostras de taurinos e zebuínos, o que permite indicá-la como parâmetro de semelhança entre as duas espécies. As variações na concentração da albumina seminal foram associadas em geral, a quadros patológicos e os reprodutores utilizados eram animais sadios, em regime regular de coleta e comercialização de sêmen pela central de inseminação. Vários autores como Szumowski (1956), Szumowski & Pernod, (1958), Szumowski (1959) e Rocha *et al.* (1974b), referem que ocorre elevação nas concentrações seminais de albumina em animais com problemas de espermiogênese.

Nas amostras de zebuínos, ocorreram variações individuais significativas nas densidades ópticas da banda, o que não foi observado entre taurinos, que apresentaram maior homogeneidade nos valores médios de densidade óptica da proteína. Este resultado concorda com o referido por Roncoletta *et al.* (1997) e Roncoletta (1999), que também observaram que o perfil protéico do plasma seminal era mais homogêneo nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos do que nas amostras de zebuínos, atribuindo este resultado à seleção genética a que a espécie taurina vem sendo submetida ao longo do tempo.

No plasma seminal bovino, não foram referidas bandas protéicas com peso de 195 kDa. Entretanto, a banda **25** poderia ser considerada como uma globulina, tendo em vista que estas proteínas são referidas no plasma sanguíneo como tendo pesos moleculares semelhantes (Lehninger, 1993).

Pela análise eletroforética bidimensional das proteínas de alto peso molecular de amostras de plasma seminal de reprodutores das espécies taurina e zebuína, verificou-se que existe uma ampla variação nas proteínas de pesos moleculares acima de 40 kDa, em ambas as espécies. As concentrações de albumina do plasma seminal apresentaram valores semelhantes entre reprodutores taurinos e zebuínos, evidenciando uma uniformidade de expressão entre os indivíduos e entre as espécies, podendo ser considerada como um marcador de semelhança entre as duas espécies. As concentrações de osteopontina foram, entretanto, superiores ( $P < 0,05$ ) nas amostras de plasma seminal dos reprodutores da espécie taurina, sendo possível indicá-la como parâmetro de diferença entre os reprodutores taurinos e zebuínos de alta congelabilidade de sêmen.

A análise das proteínas do plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos, considerados de alta congelabilidade do sêmen, evidenciou que a espécie taurina apresentou perfil protéico mais homogêneo e com menor variação individual, apresentando densidades ópticas superiores em bandas protéicas relacionadas com a proteção da membrana espermática (banda **7**, aSFP), com a maturação espermática, ligação à heparina (banda **23**, clusterina), congelabilidade e fertilidade (banda **29**, osteopontina), capazes de conferir maior proteção às células espermáticas, de influir no processo de capacitação espermática, bem como na congelabilidade e fertilidade do sêmen.

Já na espécie zebuína, o perfil protéico do plasma seminal apresentou marcada variação na frequência de aparecimento das bandas, bem como variação entre os touros. Apenas duas bandas protéicas, as bandas **15** (11–12 kDa e pI 7,5-8,0) e **29** (osteopontina), não apresentaram variações significativas entre as amostras dos reprodutores. As bandas com densidades ópticas superiores nas amostras da espécie zebuína estão relacionadas com a mediação de monócitos aos tecidos (banda **21**), com a participação em estruturas protéicas relacionadas com processos imunes (banda **15**), o que poderia talvez determinar maior aporte de células de defesa ao plasma seminal. Por sua localização nos géis, a banda **5** (16-17kDa e pI 4,1-4,8) é compatível com proteínas relacionadas tanto com a capacitação espermática, quanto a baixos índices de fertilidade.

Tendo em vista que os reprodutores eram considerados como animais de alta congelabilidade do sêmen, as variações observadas podem refletir padrões específicos de cada espécie.

## 6 CONCLUSÕES

Nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos de alta congelabilidade de sêmen, observou-se:

- Grande variabilidade das bandas protéicas analisadas entre as espécies e entre os indivíduos.
- A variabilidade foi ainda mais acentuada na faixa de proteínas de alto peso molecular.
- A espécie taurina apresentou um perfil protéico mais homogêneo do que a espécie zebuína.
- Nas amostras de taurinos ocorreram densidades ópticas superiores de proteínas relacionadas com a proteção da membrana espermática, a fertilidade e a congelabilidade do sêmen, e de ligação à heparina (aSFP, osteopontina e clusterina).
- Nas amostras de zebuínos, as densidades ópticas superiores foram observadas em bandas protéicas relacionadas com a mediação de monócitos aos tecidos e com a participação em estruturas protéicas

relacionadas com processos imunes (bandas **21 e 15**), que poderiam determinar maior aporte de células de defesa ao plasma seminal.

- A banda **5** é compatível com proteínas relacionadas tanto com a capacitação espermática, quanto a baixos índices de fertilidade.

Tabela 1 - Pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) aproximados, média e desvio padrão das densidades ópticas relativas das bandas protéicas de baixo peso molecular analisadas nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre as espécies

Banda protéica	PM kDa	pI	Taurinos		Zebuínos		P*
			Média %	Desvio	Média %	Desvio	
3	15 -16	4,7-5,2	14,79	± 3,45	16,70	± 5,86	0,89
5	16 -17	4,1-4,8	1,34	± 0,36	1,99	± 0,74	0,021
7	11 -12	4,8-4,9	2,66	± 0,43	1,82	± 0,61	0,015
9	14 -15	5,5-6,0	0,92	± 0,34	1,52	± 1,50	0,15
11	13 -14	6,0-6,5	1,39	± 0,54	1,20	± 0,19	0,406
13	14 -15	6,5-7,5	0,15	± 0,30	0,55	± 0,82	0,239
15	11- 12	7,5-8,0	0,55	± 0,08	0,68	± 0,09	0,003
17	14 -16	8,0-8,5	0,59	± 0,19	0,78	± 0,29	0,11
19	16 -18	7,0-7,5	0,16	± 0,25	0,41	± 0,29	0,07
21	20-24	7,2-7,5	2,00	± 0,33	2,27	± 0,40	0,039
23	20-22	4,8-5,2	0,54	± 0,14	0,30	± 0,25	0,041

\*Valor da probabilidade do teste de comparação entre espécies



Tabela 2 - Frequência relativa, coeficientes de variação (CV) das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal dos reprodutores taurinos e zebuínos e valores de P entre os reprodutores

Banda	Taurinos			Zebuínos		
	Frequência %	P*	C.V.	Frequência %	P*	C.V.
3	100 (7/7)	0,810	23,33	100 (7/7)	0,023	35,09
5	100 (7/7)	0,349	26,86	100 (7/7)	0,008	37,21
7	100 (7/7)	0,232	16,16	100 (7/7)	0,011	33,50
9	100 (7/7)	0,066	36,95	100 (7/7)	0,034	98,83
11	100 (7/7)	0,023	38,84	71 (5/7)	0,000	69,16
13	28,60(2/7)	0,000	200,00	57 (4/7)	0,008	149,46
15	100 (7/7)	0,023	14,54	100 (7/7)	0,102	13,08
17	100 (7/7)	0,000	32,20	100 (7/7)	0,000	115,29
19	28,60 (2/7)	0,000	156,25	71 (5/7)	0,000	73,82
21	100 (7/7)	0,000	16,50	100 (7/7)	0,008	17,78
23	100(7/7)	0,000	25,92	71 (5/7)	0,002	85,20

\*Valor da probabilidade do teste de comparação entre reprodutores

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCHIETA, M. C.; VALE FILHO, V. R.; QUIRINO, V. R.; ANDRADE, V. J.; SALVADOR, D. F.; CADENA, R. A.; BATISTA, C.G. Descarte de ejaculados pré e pós-congelamento e doses de sêmen produzidas por touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, usados como doadores de sêmen em cenral de inseminação artificial, no Brasil centro sul. **Rev.Bras. Reprod. Anim.**,v.25, n.3, p.387-389, 2001.

AHMAD, M.; KHAN, A.; SHAH, Z. A.; AHMAD, K. M. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. **Reprod. Sci.**, n. 41, p. 193-199, 1996.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P., MOLAN, P. C. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Reprod. Fert. Dev.**, n. 6, p. 165-171,1994.

AMANN, R. P. Function of the epididymis in bull and rams. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 34, p. 115-131,1987.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. H. The epididymis and sperm maturation – a perspective. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5. p. 361-381, 1993.

AMANN, R. P. The vital role of epididymis. In: CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 213-221.

AMELAR, R. D.; DUBIN, L.; SCHOENFELD, C. Sperm motility. **Fert. Steril.**, v.34,p.197-215, 1980.

ANDRADE, V.J. Manejo reprodutivo de fêmeas bovinas de corte. In: Simpósio de Produção de gado de corte, 1., 1999, Viçosa,. **Anais...**Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 85-135.

ASHWORTH, P.J.C., HARRISON, R.A P., MILLER, N.G.A , PLUMMER, J.M. , WATSON, P.F. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma . **Reprod. Fert. Dev.**, v.6, p.173-180, 1994.

ATLAS-WHITE, M.; MURPHY, B. F., BAKER, H.W. Localisation of clusterin in normal human sperm by immunogold electron microscopy. **Pathol.**, v. 32, n. 4, p.258-261, 2000.

- AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenol.**, v. 46, p. 791-797, 1996.
- AUSTIN, C. R. The capacitation of the mammalian sperm. **Nature**, v. 170, p. 326, 1952.
- AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **J. Androl.**, v.12, n.3, 1991.
- AX, R.L. ,LENZ, R. W. Glycosaminoglicans as probes to monitor differences in fertility of bulls. **J. Dairy Sci.**, n. 70, p. 1477-1486, 1987.
- BACCETI , B.; BURRINI, A.G.; MAVER,A.; PALLINI, V. , RENIERI, T. "9+10" Immotile spermatozoa in a infertile man. **Androl.**, v.11,n.6, p.437-443,1979.
- BARRIOS, B.; PEREZ-PE,R.; GALLEGO, M.;TATO,A ;OSADA,J.; MUINO-BLANCO,T CEBRIAN-PEREZ, J. A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biol. Reprod.**, v. 63, n.5, p.1531-1537, 2000.
- BARTLETT, D. E. Facts of contemporary veterinary science as they related to contemporary regulations for importation of bovine semen and international standart for semen exchange. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 9., 1980, Madrid. **Anais...** Madrid : [s.n.], 1980. v. 3, p. 347-354.
- BASS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**,v. 68, p. 275-280, 1983.
- BEATTY, R. A.;BENNET, G. H.;HALL, J. G.;HANCOCK, J. L.; STEWART, D. I. An experiment with heterospermic insemination in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 19, p. 491-502,1969.
- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. Fertility range of beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **J. Anim. Sci.**, v. 72 , p 2441-2448, 1994.
- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N. ; VANDERBOOM, R. J.; AX, R. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increase fertility of bulls. **J. Anim. Sci.**, n74, p. 173-182, 1996.
- BENSON, R. W.; PICKETT, B. W.; KOMAREK, R. T.; LUCAS, J. J. Effects of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. **J. Anim. Sci.**, v. 26. p. 1078-1081, 1967.

BENTLEY, L. G.; ANSAH, G. A.; BUCKLAND, R. B. Seminal plasma proteins from a line of chickens select for fertility of frozen-thawed semen and control line. **Poultry Sci.**, v. 63, p.1444-1445, 1984.

BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fert. Steril.**, v. 1, p. 223-238, 1950.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25,p. 383-391, 1973.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Sucesso de um programa de inseminação artificial (IA) em suínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n.3,p. 15-21, 1997.

BOUSQUET, D. ;BRACKETT, B. G. Penetration of zona-free hamster ova as a test of access fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. **Theriog.**, v. 17, p. 199-213,1982.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriog.**, n. 52, p. 863-873, 1999.

BROWN, L. F.; BERSE, B.; VAN DE WATER, L.; PAPADOPOULOS-SERGIU, A.; PERRUZZI, C. A.; MANSEAU, E. J. ;DVORAK, H. F., SENGER, D. R. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Mol. Biol. Cell**, v.3, p. 1169-1180, 1992.

BUHR, M.; CURTIS, E. F.; KAKUDA, N. S. Composition and behavior of head membranes lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobio.**,v.31, p.224-238, 1994.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.;DOSTALOVA, Z.; TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. **Fertilität**, v.11, p. 35-40, 1995.

CALVETE, J. J.; VARELA, P.F.; SANZ, L.; ROMERO, A.; MANN, K., TÖPFER-PETERSEN, E. A procedure for the large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. **Prot. Exprs. Purif.**, n. 8, p. 48-56, 1996.

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

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. **Biol. Reprod.**, v.60, p. 454-460, 1999.

- CARDOSO, F. M. **Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebus ( *Bos indicus*) da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade.** 1977, 113f.  
Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASAGRANDE, J. F.; PINHEIRO, L. E. L.; ALMEIDA, C. A.; FERRAZ, J. B. S. A. Influência da motilidade e da velocidade espermática sobre a fertilidade do sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 3, n. 2, p.31-35, 1979.
- CASTRO, J.B.; TORRES, C. A.; CASTRO, A. G.; COELHO, A. A. Características seminais de touros das raças Marchigiana (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SPBZ, 29., 1992. **Anais.** [S.l.]: SBPZ, 1992. p.514.
- CLARK, E. N.; CORRON, M. E., FLORMAN, H. M. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytocis in response to the egg's zona pelucida. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.7, p.5309-5316,1993.
- COELHO, L. A.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M. Avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide por corantes fluorescentes e sua relação com a motilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.19, n.3-4, p. 35-41, 1995.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriog.**, v.42,p.351-360, 1994.
- COULTER, G. H. Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. **Theriog.**,v.38, p.197-207,1992.
- DE CLERK, Y. A.; YEAN, T. D.; RATZIN, B. J.; LU, H. S.; LANGLEY, K.E. Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitor secreted by bovine aortic endothelial cells, **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 17445-17453, 1989.
- De LEEUW, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. The role membrane damage plays in the cold shock and freezing injury. In: BOAR SEMEN PRESERVATION, 2., INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 2., 1990, Beltsville, MA, USA. **Proceedings....** Beltsville : [s.n.], 1990. p. 95-104.
- DESJARDINS, C.; HAFS, H.D. Motility and fertility during post-thawing and storage of bovine spermatozoa frozen concentrated thawed and re-extend. **J. Dai. Sci.**, v.45, p. 1242-1247, 1962.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **J. Biol. Chem.**, n. 267, p. 10149-10155, 1992.

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

DHAMI, A. J., KODAGALI, S. B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen from Surti buffalo bulls. **Indian J. Anim. Sci.** , v. 57, n. 12, p. 1283-1286, 1989.

DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; HETTEL, C.; RIEDEL, D.; SCHONECK, C.; EINSPANIER, R.; TOPFER-PETERSEN, E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 375, n. 7, p. 457-461, 1994.

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A. P.; FOSTER, G. C. A. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram homologous seminal plasma. **J. Reprod. Fert.**, v.62, p. 193-197, 1979.

EDDY, E. M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; Neil, J.D. **The physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. vol 1, cap.2, p. 27-68.

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

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

ELIOTT, F.I. A photographic method of measuring percentage of progressive motile sperm cells using dark field microscopy. **Proc. Symp. Zootech.** 8, p. 160-163, 1973.

ENDO, Y.; SEIFERY, G.W.; CHRISTENSEN H.R. Differences in testicle shapes and weight of different breeds of cattle at weaning. **Austr. Soc. Anim. Prod.**, n.12, p.190, 1978.

ESCH, F. S.; LING, N.C.; BOHLEN, P.; YING, S.Y.; GUILLEMIN, R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochem-Biophys-Res-Comm** v. 113, n. 3, p.861-867, 1983.

FIELDS, M. J.; FHENTGES, J. R.; CORNELISSE, K. W. Aspects of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. **Theriog.**, v.18, n. 1, p. 17-31, 1982.

FIRST, N. , PARRISH, J. In vitro fertilization of ruminants. **J. Reprod. Fertil**, n. 34, p. 151-165,1987.

FLOWERS, W. L. Boar fertility and artificial insemination . In: IPVS CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. **Proceedings...** Birmingham : [s.n.], 1998. p. 45-52.

FONSECA, V. O. ; CHOW, L. A.; ABREU, J .J.; LIMA, P. O. Alguns aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros púberes da raça Nelore. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.27, n.3, p. 269-80, 1975.

FONSECA, V. O. Puberdade, adolescência e maturidade sexual; aspectos histopatológicos e comportamentais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte : Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989, p.77-93.

FONSECA, V. O.; SANTOS,N. R.; MALINSKI,P. R. Classificação andrológica de touros zebus com base no perímetro escrotal e características morfológicas do sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, n.2, p.36-39, 1997.

FRAGA, R. S.; NEUMANN, J. O complexo principal da histocompatibilidade. In: SCROFERNECKER, M. L. **Notas de Imunologia**. Porto Alegre: Editora da Universidade, 1996. cap. 7, p. 107-109.

FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H.;KOIVISTO, M. B.; VEIGA SOARES, L. C.;SILVA, C. Avaliação de alguns constituintes do plasma seminal em touros da raça Nelore e sua possível relação coma congelabilidade do sêmen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte.: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. vol.2, p. 311.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M.; BROOKS, C.L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-milliliter straws. **Theriog.**, v. 46, p. 1103-1115, 1996.

GARCIA, J.M.PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical and morphological caraceristics of young Guzera bulls. **Ars. Vet.**, v. 3, n. 1, p. 47-53, 1987.

GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertillity-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biol. Reprod.**, n.58, v. 3, p. 826-833, 1998.

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

- GOFFAUX, M. Quelques aspects relatif a la technologie de l'insemination artificiale des bovins. **El. Ins.**, Maison Alford, v.216, p. 3-14, 1986.
- GONÇALVES, C. A ; RODNIGHT, R. Electrotransfer of fixed phosphoprotein from pieces of dried polyacrilamide gel to small disks of nitrocellulose, nylon or polyvilidene difluoride. **Electroph.**, n.14, p. 789-793, 1993.
- GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriog.**, v.41, p1151-1162, 1994.
- HAFS, H. D.; BOYD, L. J.; CAMERON, S. Fertiltity of cattle inseminated with 12, 24 or 35 million sperm in 0,5 or 0,9 milimeter. **J. Dair. Sci.**, v.53, p.1693-1696,1970.
- HALTTUNEN, M.;KÄMÄRAINEN, M.; KOISTINEN, H. Glycodelin: a reproduction-related lipocalin. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1482, p.149-156, 2000.
- HAMMERSTEDT, R. H.; PARKS, J. E. Changes in ram sperm surfaces associated with epididymal transit. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. 34, p.133-149, 1987.
- HAMMERSTEDT, R. H. ;GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. Androl.**, v.11, p. 73-78,1990.
- HANDROW, R. R.; FIRST,N. L.; PARRISH, J. J. Calcium requirement and increase association with bovine sperm during capacitation by heparin. **J. Exp. Zool.**, n.252, p. 174-182, 1989.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352,1990.
- HARRISON, R. A. P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reprod. Fertil. Develop.**, n. 8., p.777-782, 1996.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.62, p.3-22, 2000.
- HOWES, E. A.; HURST, S.; LASLOP, A., JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.**, n.4,v.7, p.673-681, 1998.
- IBRAHIM, N. M.; GILBERT, G. R.; LOSETH, K. J. , CRABO, B. G. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **J. Androl.**, v.6, n. 21, p. 887-894, 2000.



IWAMOTO, T.; TANAKA, H.; OSADA, T.; SHINAGAWA, T.; OSAMURA, Y.; GAGNON, C. Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. **Mol. Reprod. Devel.**, v. 36, p. 575-481, 1993.

JENNE, D. E.; LOWIN, B.; PEITSCH, M. C.; BOTTCHEER, A.; SCHIMITZ, G.; TSCHOPP, J. Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-1 in human plasma. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 11030-11036, 1991.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VENT, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. .G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fert.**, v.70, p. 219-228, 1984.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D.; CIMAROSTI, H. I.; MATTOS, R. C. Albumina e osteopontina – Proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Enviado para publicação.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D.; WALD, V. B.; MATTOS, R. C. Relação do perfil das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade de touros doadores de sêmen, através de SDS-PAGE bidimensional. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.** Enviado para publicação

JONDET, R.; MIES FILHO, A.; RABBADEAUX, Y. L'preuve thermoresistance dans l'appréciation de la valeur du sperm bovin congelé. **C. R. Soc. Biol.**, v.172, p.764-769, 1978.

JONDET, R.; RABBADEAUX, Y. Utilization du test de thermoresistance dans l'appréciation de la valeur du sperm congelé du taureau. **Elev. Insem.**, v.156, p. 13-19, 1976.

KERR, J. M.; FISHER, L.W.; TERMINE, J. D., YOUNG, M. F. the cDNA clonig and RNA distribution of bovine osteopontin. **Gene**, v. 108, p. 237-243, 1991.

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

KOISTINEN, H.; KOISTINEN, R.; DELL, A; MORRIS, H. R.; EASTON, R. L. ;PATANKAR, M. S.; OENHNINGER, S.; CLARK, G.F.; SEPPALA, M. Glycodelin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodelin – A. **Mol. Hum. Reprod.**, v.10, n.2, p. 759-765, 1996.

KOISTINEN, H.; KOISTINEN; R.; HYDEN-GRANSKOG, C.; MAGNUS, O.; SEPPALA, M. Seminal plasma glycodelin and fertilization in vitro. **J. Androl.**, v.5, n. 21, p. 636-40, 2000.

- KULKARNI, B. A.; DHANDE, S. G., PATANKAR, D. D. Seminal plasma proteins profiles of holstein friesian, jersey and crossbreed bulls. **Int. J. An. Sci.**, v.11, n.1, p. 133-137, 1997.
- KULKARNI, B.A.; RUPAL, P., K., HEDGE, U. C. Comparative SDS- polyacrylamide gel electrophoresis of seminal plasma proteins and blood plasma proteins of the Indian buffalo and cattle bulls. **Ind. J. Anim. Sci.**, v. 68, n.1, p. 66-67, 1998.
- KUNUGIYAMA I.; ITO, N.; TAKAGASHI, S.; SONE, K.; GOTOH, H.; SAITOH, T.; FURUKAWA, Y.; YAMAGAUCHI, T. Measurement of beta 2-microglobulin in bovine serum and urine by radioimmunoassay. **J. Vet. Med. Sci.**, n.58, v. 7, p. 617-622, 1996.
- LARSEN, L. B. ; RAVN, P.; BOISEN, A.; BERGLUND, L.; PETERSEN, T. E. Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain. **Eur. J. Biochem.**, v. 15, n. 243, p. 437-441, 1997.
- LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretics studies. **J. Biol. Chem.**, v.206, n.2, p.741-749, 1954.
- LASLEY, J. F.; EASLEY, G. I.; MCKENZIE, F. F. A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. **Anat. Rec.**, v.82, 1942.
- LECLERK, P.; SIRARD, M. A.; CHAFOULEAS, J. G.; LAMBERT, R. D. Decrease binding of calmodulin to bull sperm proteins during heparin-induced capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 42, p. 483-489, 1990.
- LEHNINGER, A. L. Digestão, transporte e integração do metabolismo. In: LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1993. cap. 24, p. 487-512.
- LOWRY, O H.; ROSEBROUGH, W. J.; FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p. 265-275, 1951.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins from bovine seminal plasma. **Biochim. J.**, v.241, p.685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Biosci. Rep.**, v.7, n. 3, p. 231-238, 1987.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.49, p.27-37, 1993.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. New York: Springer-Verlag, 1981. 495 p.

MARCHINI, M.; AMORETTI, M.; GIUNTA, A M.; PIFFARETI-YANES, A.; MEDIDI, G.; BALERNA, M. Electrophoretical patterns of seminal plasma proteins in patients with cystic fibrosis. **Fert. Ster.**, v. 53, n. 3, p. 542-545, 1990.

MARTINS JÚNIOR, A.; COSTA, M. T. A.; VIEIRA, F. V., PINTO, E. H. C. C. Associação entre os padrões eletroforéticos das proteínas do plasma seminal e os parâmetros espermáticos de touros doadores de sêmen . In: CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995a. p. 273.

MARTINS JÚNIOR, A.; RAMOS, P. R. R.; SILVA, R. L. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de touros de origem européia e zebuína. In: CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995b. p. 272.

MAXWELL, W. M. C.; WELCHG, R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reprod. Fert. Dev.**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MAXWELL, W. M. C., JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriog.**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

McNUTT, T. L.; KILLIAN, G. J. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. **J. Androl.**, v.12, p. 244-252, 1991.

MELOUN, B.; CECHOVA, D.; JONAKOVA, V. Homologies in the structures of bull seminal plasma acrosin inhibitors and comparison with the homologous proteinase inhibitors of the Kazal type. **Hop.-Sey. Phys. Chem.**, v. 364, p. 1665-1670, 1983.

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

MILLER, J.; AX, R. L. The seminal plasma: What is it and why is it important. In: TECHNICAL CONFERENCE ON A.I. AND ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1988, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1988. p.97-112.

MONTGOMERY, A. M.; MUELLER, B. M.; REISFELD, R. A; TAYLOR, S. M.; DE CLERK, Y.A., Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. **Cancer Res.**, v. 54, n. 15, p. 5467-5473, 1994.

MOORE, H. D. M., HIBBITT, K. C. S. The binding of labelled basic proteins by boar spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.46,p.71,1976.

MORGENTALER, A. ; SCHOPPERLE, W. M.; CROCKER, R. H., WOLF, W. C. Protein differences between normal and oligospermic human sperm demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis. **Fert. Ster.**, v.54, n.5, p.902-905,1990.

MORTARINO, M.; TEDESCHI,G.; NEGRI, A.; CECILIANI, F.; GOTTARDI, L.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal proteins. **Electroph.**, v.19, p.797-801, 1998.

MOUSTAFA, A., R.; MÉZÁROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing - and - thawing. **Acta Vet. Acad. Scient. Hungar.**, v.28, n. 4, p.403-408, 1980.

NAKAMURA, Y., NORIYASU, N.; MINAMATANI, T.; IKUTA, T.; ARIGA, H.; MATSUMOTO, K. Primary structure, genomic organization and expression of the major secretory protein of murine epididymis ME 1. **Gene**, v. 251, p. 55-62, 2000.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.

O' BRYAN, M. K.; CHENG, C. Y. Purification and cellular localization of beta 2-microglobulin in the testis. **Life Sci.**, v. 61, n. 5, p. 487-494, 1997.

O'FARREL, P. Z. ; GOODMAN, H.M.; O'FARREL ,P. H. High resolution of wo-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p.1133-1142, 1977.

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

OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUINO-BLANCO,T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriog.**, v.49, p. 547-555,1998.

OLLERO, M.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeinety and viability by addition of seminal plasma. **J. Androl.**, v.6, n.18, p. 732-739, 1997.

PACE, M. M. Fundaments of assay of spermatozoa. INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 9., 1980, Madrid. **Anais**. Madrid, [s.n.].1980. vol. 1, p. 133-146.

- PACHECO, A .R. I. A. - Situação atual e perspectivas para a próxima década. **Rev. Bras. Repr. An.**,v. 22, n. 2, p. 73-74, 1998.
- PANGAWAKAR, G. R.; SHARMA, R. D., SINGH, R. Protein, sialic acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freeability of semen. **Ind. Vet. J.**, v.65, p.58-60,1988.
- PANKHURST, J. G.; BENNET, C. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. **Biochem.**, v.7, n. 14, p. 4823-4830, 1998.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.;WINER, M.A. ; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.**, v.38, p. 1171-1180,1988.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; HANDROW,R. R.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. **Biol. Reprod.**, v. 40, p. 1020-1025, 1989.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; UGUZ, C. ; FIRST, N. L. differences in the role of cyclic adenosine 3-5-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biol. Reprod.**, v. 41, p. 1099-1108, 1994.
- PEREIRA, J. C.C. **Melhoramento genético aplicado a produção de leite.** Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 170p.
- PERRY, V E. A. ; MUNRO, R. K.; CHENOWEETH, P. J. ; POST, T. B.; BOERO, D. A .V. Relationship between bovine male and female reproductive traits. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND A .I. 11., 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin [s.n.] :1988. vol. 3, p. 377.
- PINEDA, N.; LEMOS, V. F.; FONSEDA, V. O. Comparação entre dois testes de avaliação de comportamento sexual (libido) de touros Nelore *Bos taurus indicus.* **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v.21, n.4, p.29-34,1997.
- PINHEIRO , L. E. Biotecnologia: perspectivas em reprodução animal. **Rev. Cons. Fed. Med. Vet.**, n.8, p.8-9, 1997.
- PREDOJEVIC, R. M. Sperm penetration through oestral mucus in relation to optimal insemination time and bovine conception rates. In: TECHNICAL CONFERENCE ON A.I. AND ANIMAL REPRODUCTION, 3., 1970, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1970. vol. 2, p. 62-64.
- PROOST, P.; WUYTS, A .,VAN DAMME, J. Human monocyte chemotatic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. **J. Leukoc. Biol.**, n. 59, v.1, p. 67-74, 1996.

- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J. Anim.Sci.**, v.37, p.528-531, 1973.
- ROBERTSON, L.; WATSON, P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **J. Reprod. Fertil.**, v.77, p. 177- 185, 1986.
- ROBERTSON, L.; WATSON, P. F. The effects of egg yolk on the control of intracellular calcium in ram spermatozoa cooled and stored at 5°C. **Anim. Reprod. Sci.**,v.15, p. 177-187, 1987.
- ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S.; FERREIRA NETO, J. M.; SCOHNS, J. A .B Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus normais e com alterações testiculares.. **Arq.Esc. Vet. UFMG**, v.26, n.2, p.223-233, 1974a.
- ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S.; FERREIRA NETO, J. M.; SCOHNS, J. A .B. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus normais. **Arq.Esc. Vet. UFMG**, v.26, n.1, p.69-75, 1974b.
- RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of the experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **J. Neurosci. Meth.**, n. 24, p. 27-48, 1988.
- RONCOLETTA, M. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade de sêmen de touros.** 1999, 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H., OLIVEIRA, M. A., SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **Ars Vet.**, v.13, n.2, p.135-140, 1997.
- RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H., OLIVEIRA, M.A., da SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, n.2, 1999.
- SAACKE, R. G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In: TECHNICAL CONFERENCE ON A.I. AND ANIMAL REPRODUCTION, 3., 1970, Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Association of Animal Breeders, 1970. p.17-30.
- SAACKE, R.G.; AMANN, R. R.; MARSHAL, C. E. Acrossomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls . **J. Anim. Sci.**, v.27, p.1391-1400, 1968.

- SAACKE, R.G.; MARSHAL, C. E. ;VINSON, W. E.; O'CONNOR, M. L.; CHANDLER, J. E.; MULLINS,J.; AMANN, R. R. Semen quality and heterospermic insemination in cattle. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND A. I., 9., 1980, Madrid. **Proceedings...**, Madrid: [sn], 1980. v.3, p. 285.
- SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriog.**, v. 41, p.45-50, 1994.
- SAACKE, R.G.;WHITE, J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: TECH. CONF. A.I. AND ANIM. REPROD., 4., 1972, **Proceedings...**, National Association of Animal Breeders, 1972. p. 22-27.
- SCHEIT, K. H.; ZIMMER, M.; RAO, N.S.; PRASAD, K.S.N.; BHAGARVA, P. M. Antibacterial activity of seminalplasmin, a basic protein from bovine seminal plasma. **Microbios**, n.45, p.105-112, 1986.
- SCHÖNECK, C.; BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriog.**, v. 45, p.633-642, 1996.
- SCHÖNECK, C.; EINSPANIER, R. SCHALLENGER, E.; SCHAMS, D. Effects of the bovine seminal protein aSPF: protection of spermatozoa and rapid uptake by female mucosa. **J. Reprod. Fert.**, v.12, p. 21, 1993. Abstract.
- SIITERI, J. E.; ENSRUD, K. M.; MOORE, A., HAMILTON, D. W. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 40, p. 16-28, 1995.
- SIMPSON, A. M.; SWANN,M. A., WHITE, I. G. Action of phosphatidylcoline in protecting ram sperm from cold shock. **Gam. Res.**, n.15, p. 43-56, 1986.
- SILVA, N. Biotecnologia aplicada à reprodução animal: Perspectivas presentes e futuras. **Rev. Col. Bras. Repr. Anim.**,v.24, p.17-20, 2000.
- SINGER, S.J.;NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model for structure of cell membrane. **Sci.**, v.175, p.720-731, 1972.
- SITARAM, N.; KUMARI,V. K.; BHARGAVA, P.M. Seminalplasmin and caltrin are the same protein. **FEBS Lett.**, v. 201, n.2, p.233-236,1986.
- SORENSEN, E. S., PETERSEN, T. E. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. **J. Dai. Res.**, v. 60, p.189-197, 1993.

SPROTT, L.R.; HARRIS, M.D.; FORREST, D. W.; ZHANG, H. M.; OYARZO, J. N.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **J. Anim. Sci.**, v.78, n. 4, p. 795-798, 2000.

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

SZUMOWSKI, P. L'électrophorèse des protéines du plasma seminal dans la recherche des troubles de la fertilité du male. **Rec. Med. Vet.**, n. 135, p. 937-946, 1959.

SZUMOWSKI, P. Quelques résultats de l'examen électrophorétique des protéines du plasma seminal de taureau. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE PER LA RIPRODUZIONE ANIMALE E LA FECONDAZIONE ARTIFICIALE, 3., 1956, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: [s.n.], 1956. p.102-105. [s.n.]

SZUMOWSKI, P., PERNOD, E. Étude électrophorétique et immuno-électrophorétique des protéines du plasma seminal de taureau. **Bull Soc. Chim. Biol.**, v. 11, n. 40, p. 1423-1434, 1958.

TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G., RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **Eur. J. Biochem.**, n. 267, p. 6174-6179, 2000.

TELES LOBO, A. S. M. Andrologia. **Revista Nelore**, v. 55, p.54-56, 1999.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 768-776, 1999.

TOKUGAWA, Y.; KUNISHIGE, I.; KUBOTA, Y.; SHIMOYA, K.; NOBUNAGA, T.; KIMURA, T.; SAJI, F.; MURATA, Y.; EGUCHI, N.; ODA, H.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Lipocalin-type prostaglandin synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. **Biol. Reprod.**, n. 58, v. 2, p. 600-607, 1998.

TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETTE, J.J.; DOSTALOVA, Z.; REINERT, M.; WABERSKI, D.; SANZ, L.; HUBNER, T. One year in the life on the spermadhesin family. **Fertilität**, v.11, p. 233-241, 1995.

TRENKE, A., WILLHAM, R. L. Beef production efficiency. **Sci.**, n. 198, p.1009, 1977.

URADE, Y. New aspects on prostaglandin D synthases. **Nippon Yaku. Zs.**, n. 110, Suppl. 1, p.56-58, 1997.



URADE, Y., HAYAISHI, O. Prostaglandin D synthase: structure and function. **Vitam. Horm.**, v.58, p. 89-120, 2000.

VALE FILHO, V. R. ; FONSECA, V. O.; PINTO, A. A; SOARES, L. C. O.; PEREIRA, J. R. Biometria testicular de touros adultos clinicamente normais, estudo comparativo de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINÁRIA DE LÍNGUA PORTUGUESA, 10; 1978, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 1978. p. 72-73.

VALE FILHO, V.R.; PINTO, P.A.; FONSECA, J.D.; VEIGA SOARES, L.C.O. **Diagnóstico andrológico e classificação de *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à fertilidade, para uso como reprodutores, em condições de Brasil. De um estudo em 1988 touros.** São Paulo: [Dow Chemical], 1979. p.54.

VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil. Análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. p.94-118.

VALENTIN, R.; MERCADANTE, C. F.J.; AMARAL, R.; Características andrológicas de touros Simentais na região de Bauru-SP, In: 1º Simpósio de Pesquisa em Medicina Veterinária, São Paulo, 1995. **Anais:** São Paulo, 1995, p.118.

VALENTIN, R. **Biometria testicular e características seminais de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) e touros cruzados Nelore-Europeus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*).** 1998, f.90 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VESSELINOVITCH, S. D. Electrophoresis of bovine semen. Part. III. Characterization of the seminal plasma proteins. **Canad. J. Comp. Med.**, v. 23, n. 1, p. 10-20, 1959.

WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessments of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Dev.**, v. 7, p. 781-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WEITZE, K. Long term storage of extended boar semen. **Reprod. Dom. Anim.**, Supplement 1, p.231-253, 1992.

WEMPE, F.; HENSCHEN, A., SCHEIT, K.H. Gene expression and cDNA cloning identified a major basic protein component of bovine seminal plasma as bovine monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1). **DNA Cell Biol.**, v.9, n. 10, p. 671-679, 1991.

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 183, n. 1, p. 232-237, 1992.

WOLF, F. R.; ALMIQUIST, J. O.; HALE, E. B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **J. Anim. Sci.** ,v. 24, n.2, p. 761-764,1965.

WOLFE, D. F.; BRADLEY, J.T., RIDDEL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with termally-induced testicular degeneration. **Theriogen.**, v.40, p. 1083-1091,1993 .

## 8 ANEXOS