

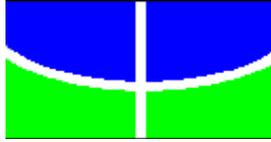
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL
COMO SUBSÍDIO PARA INCREMENTO DA EFICÁCIA DA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO EM OVINOS**

PRISCILLA PEREIRA MOURA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2009**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL
COMO SUBSÍDIO PARA INCREMENTO DA EFICÁCIA DA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO EM OVINOS**

Priscilla Pereira Moura

Orientador: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Co-orientador: Dr. Maurício Machaim Franco

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 10/2009

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2009**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MOURA, P. P. Caracterização Bidimensional de proteínas do plasma seminal como subsídio para incremento da eficácia da inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 57 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MOURA, Priscilla Pereira. **Caracterização Bidimensional de proteínas do plasma seminal como subsídio para incremento da eficácia da inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. Proteínas. 2. Sêmen. 3. Congelamento. 4. Carneiro.
I. Neves, J. P. II. PhD

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL
COMO SUBSÍDIO PARA INCREMENTO DA EFICÁCIA DA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO EM OVINOS**

Priscilla Pereira Moura

**Dissertação de mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Animais, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de mestre
em Ciências Animais.**

APROVADA POR:

PROF. DR. JAIRO PEREIRA NEVES (Universidade de Brasília)
CPF: 065.863.509-30
E-mail: jpneves@unb.br

PROFA. DRA. CAROLINA MADEIRA LUCCI (Universidade de Brasília)
CPF: 490.390.241-20
E-mail: cmlucci@unb.br

PROF. DR. ALEXANDRE FLORIANI RAMOS (Embrapa)
CPF: 014.334.559-19
E-mail: aleframos@cenargen.embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 09 de Março de 2009.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me iluminar e me dar forças para seguir meu caminho.

À minha família e amigos pela compreensão e incentivo.

Ao Prof. Dr. Jairo Pereira Neves pelos ensinamentos, incentivo e disponibilidade durante esses dois anos.

Ao Dr. Maurício Machaim Franco por toda atenção, orientação e auxílio.

À Profa. Dra. Concepta McManus pela ajuda e orientação estatística.

Às amigas de mestrado, Déborah Máximo e Lígia Freitas, pelo companheirismo e apoio.

Aos estagiários, Diogo Leal, Pedro Ivo Passos e Hetielle; e ao funcionário da Fazenda Sucupira, Normandes Vieira (Teco), pela ajuda durante o projeto e pela amizade.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

ÍNDICE

Capítulo	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.2.1 O sêmen e a fecundação	3
1.2.2 Capacitação espermática	4
1.2.3 Criopreservação do sêmen.....	5
1.2.4 Plasma seminal - Proteínas e fertilidade.....	6
1.2.5 Análise do perfil protéico	10
1.3 OBJETIVOS.....	13
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.2.1 Coletas e avaliação do sêmen	24
2.2.2 Coletas de plasma seminal.....	25
2.2.3 Processamento e criopreservação do sêmen.....	25
2.2.4 Avaliações do sêmen fresco.....	26
2.2.5 Descongelamento do sêmen	26
2.2.6 Integridade de membrana plasmática	26
2.2.7 Teste de Termo Resistência (TTR)	27
2.2.8 Eletroforese bidimensional do plasma seminal	27
2.2.9 Análise estatística.....	29
2.3 RESULTADOS	29
2.4 DISCUSSÃO	33
2.5 CONCLUSÕES	41
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
2.7 ANEXOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura	Página
Figura 2.1 – Equação de regressão gerada e utilizada para a quantificação de proteína total nas amostras de plasma seminal dos cinco animais estudados.....	27
Figura 2.2 – Gel de Eletroforese Bidimensional SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata (animal 21), mostrando os <i>spots</i> 03 e 23 (setas) presentes somente nesse animal.....	32
Figura 2.3 – Gel de Eletroforese Bidimensional SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata (animal 05), mostrando o <i>spot</i> 31 (seta) presente somente nesse animal.....	32
Figura 2.4 – Dendograma baseado no perfil protéico dos animais 05 (1), 21 (2), 79 (3), 145 (4) e 271 (5).....	33

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela	Página
Tabela 2.1 – Médias (\pm desvio-padrão) da Motilidade Espermática (%) para o sêmen fresco (Fr) e nas horas zero (H0), dois (H2) e quatro (H4) de descongelamento.....	29
Tabela 2.2 – Médias (\pm desvio-padrão) do Trypan Blue Giemsa (%) - Vivo íntegro (VI) e Morto íntegro (MI) para o sêmen fresco (Fr) e na hora zero (H0) de descongelamento.....	30
Tabela 2.3 – Médias (\pm desvio-padrão) do Trypan Blue Giemsa (%) - Vivo reagido (VR) e Morto reagido (MR) para o sêmen fresco (Fr) e na hora zero (H0) de descongelamento.....	30
Tabela 2.4 – Médias (\pm desvio-padrão) da integridade de membrana (%) para o sêmen na hora zero (H0) de descongelamento.....	31
Tabela 2.5 – Concentração de proteínas totais (média \pm dp) nas amostras de plasma seminal.....	31
Tabela 2.6 – Peso Molecular, Ponto Isoelétrico (pI) e Animais que possuem a proteína no plasma seminal.....	46
Tabela 2.7 - Quantidade de <i>spots</i> totais identificados por animal e as diferenças de expressão entre eles.....	47

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

°C – Graus Celsius

% – Porcentagem

2D-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Bidimensional

aSFP – Proteína ácida do fluido seminal

BSA – Albumina Sérica Bovina

BSP – Proteínas do plasma seminal bovino

CHAPS – Cholanilopropyl-Dimethylammonio-Propane Sulfonate

DIC – Diacetato de Carboxifluoresceína

DTT – Detergente Dithiotritol

gACE – Enzima conversora de angiotensina I

GAGS – Glicosaminoglicanos

HPBs – Proteínas ligadoras de heparina

I.A – Inseminação Artificial

IEF – Focalização isoelétrica

IMP – Integridade de membrana plasmática

IP – Iodeto de Propídio

IPG – Immobilized pH gel

kDa – Kilodalton

MI – Morto com o acrossomo íntegro

MMPs – Metaloproteinases de matriz

Mr – Mobilidade relativa

MR – Morto com o acrossomo reagido

PGDS – Prostaglandina D sintetase

pI – Ponto isoelétrico

PLA2 – Fosfolipase A2

PM – Peso molecular

SAS – Statistical Analysis System

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate* PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TTR – Teste de termo-resistência

VI – Vivo com o acrossomo íntegro

VR – Vivo com o acrossomo reagido

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL COMO SUBSÍDIO PARA INCREMENTO DA EFICÁCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO EM OVINOS. Priscilla Pereira Moura. Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar o perfil protéico do plasma seminal ovino por meio de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D-PAGE) e verificar se alguma dessas proteínas está relacionada com a congelabilidade do sêmen, podendo ser utilizadas como marcadores para essa característica. Foram utilizados os ejaculados de cinco reprodutores, nos quais foram realizadas avaliações espermáticas e dos quais os plasmas seminais obtidos por centrifugação foram submetidos 2D-PAGE em gel a 12% de poliacrilamida. Foram identificados 92 *spots*, considerando todos os animais analisados. Destes, 41 (44,57%) foram identificados em todos os animais e 51 (55,43%) expressaram-se diferencialmente entre eles. Dentre as proteínas que se expressaram diferentemente, as proteínas 03 (7,9 kDa), 23 (13,6 kDa) e 31 (21,4 kDa) se destacaram, por apresentarem maior expressão e relações com as características espermáticas dos animais. A proteína 31 foi encontrada somente no animal 05 e apresentou alta expressão no mesmo. Esse animal apresentou os menores valores de integridade de membrana e espermatozóides vivos íntegros; e alto valor de espermatozóides mortos reagidos no sêmen descongelado. Já as proteínas 03 e 23 foram encontradas somente no animal 21 e se destacaram devido à alta expressão nesse animal, que apresentou a maior média de integridade de membrana no sêmen descongelado. A avaliação dos dados obtidos evidenciou variações significativas nos resultados das análises do sêmen dos animais e uma variabilidade no perfil protéico no plasma seminal dos carneiros, sugerindo as proteínas 03, 23 e 31 como possíveis marcadores da capacidade criopreservadora do sêmen. A proteína 31 como possível indicador da menor congelabilidade e as proteínas 03 e 23 como marcadores da maior congelabilidade do sêmen.

Palavras chave: Proteína, sêmen, carneiro, congelabilidade, eletroforese.

ABSTRACT

TWO-DIMENSIONAL CHARACTERIZATION OF OVINE SEMINAL PLASMA PROTEINS AS SUBSIDY TO INCREASE THE EFFECTIVENESS OF THE ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN. Priscilla Pereira Moura. Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

The objective of this study was to identify and characterize the protein profile of ram seminal plasma using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and to verify if any of these proteins was associated with semen freezability, which could be used as markers for predicting semen freezability. Semen from five rams were used. The sperm analysis was held and the seminal plasma obtained by centrifugation was submitted to 2D-PAGE using 12% acrylamide gel. Ninety two spots were identified considering the analyzed animals. Forty one (44.57%) were found in all animals and 51 (55.43%) were differentially expressed among them. From that proteins differently expressed, the proteins 03 (7.9 kDa), 23 (13.6 kDa) and 31 (21.4 kDa) stood out because they showed higher expression and because of relations with the sperm characteristics of the animals. The protein 31 was found just in animal 05 and showed high expression in it. This animal had the worst values for live spermatozoa with intact acrosome and plasmatic membrane integrity; and high value for dead spermatozoa with reacted acrosome in thawed semen. Proteins 03 and 23 were found just in animal 21 and showed high expression in this animal, which presented the best values for plasmatic membrane integrity in thawed semen. The results showed a significant variation among sperm analysis of the animals and variability in the protein profile of the seminal plasma of the rams, suggesting that proteins 03, 23 and 31 are possible markers of semen freezability. Protein 31 predicting low semen freezability, and proteins 03 and 23 predicting high semen freezability.

Key words: Protein, semen, ram, frezability, electrophoresis.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem despertando, principalmente nos últimos anos, um maior interesse de produtores e dos órgãos governamentais, considerando que é uma alternativa desejável para o incremento da atividade pecuária no país, não só como atividade principal, mas como fonte adicional de renda para as empresas rurais tanto de pequeno, médio ou grande porte. Portanto, o desenvolvimento das biotecnologias aplicadas à reprodução, como a criopreservação de sêmen, tem despertado o interesse de produtores com o intuito de acelerar o ganho genético dos animais de produção.

A criopreservação do sêmen há muito tem sido vista como uma forma de beneficiar a reprodução dos animais de importância agropecuária. Para a maximização do desempenho dos machos, as técnicas envolvendo a criopreservação do sêmen ovino vêm ganhando destaque por propiciarem, além de um banco genético de fácil acesso, a total utilização de machos que apresentem boas características de produção (WATSON, 2000).

Entretanto, o processo de criopreservação acarreta uma série de alterações resultando em uma redução marcante da capacidade fecundante dos espermatozoides em relação com o sêmen fresco. Os danos criogênicos na bioquímica e na ultra estrutura dos espermatozoides podem ser os responsáveis pelo decréscimo da integridade funcional, sobrevivência e capacidade de fertilização (SALAMON & MAXWELL, 1995). No carneiro, alguns aspectos do processo de resfriamento-congelamento-descongelamento tornam a membrana espermática com maturação excessiva e aumenta a proporção de espermatozoides capacitados e acrossoma reagidos precocemente (SALAMON & MAXWELL, 1995; HOLT, 2000).

Atualmente nas fêmeas ovinas, os melhores índices de fertilidade com sêmen congelado são obtidos após I.A. por via laparoscópica, com deposição do sêmen diretamente no útero. O método de aplicação laparoscópica permite a utilização de sêmen congelado incrementando o processo de melhoramento genético, propiciando índices de prenhez semelhantes aos obtidos com a monta natural. Por outro lado, tal técnica apresenta limitada aplicação a campo de forma rotineira, pois requer instrumentais de custo elevado e mão-de-obra especializada (NEVES, 1990). A técnica de I.A. cervical surge como alternativa, pois permitiria um uso mais expressivo do sêmen ovino congelado, por ser de baixo custo e de fácil execução (SOUZA, 1993).

Porém, a utilização do sêmen ovino congelado por via cervical também possui suas limitações, como difícil transposição da cérvix da ovelha com seus anéis tortuosos, e inabilidade dos espermatozóides criopreservados em atravessá-la devido à motilidade e viabilidade reduzida no trato genital da fêmea. Além disso, observa-se maturação excessiva das membranas espermáticas, oriundas do processo de criopreservação, que promove um aumento na população de espermatozóides capacitados e acrossomos reagidos (MAXWELL & WATSON, 1996; SALAMON & MAXWELL, 2000).

Em busca de alternativas para aumentar a viabilidade espermática do sêmen congelado de ovinos, pela inseminação artificial via cervical superficial, estudos vêm sendo desenvolvidos com a utilização de plasma seminal. O plasma seminal é um fluido com papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fertilização (KRAUS et al., 2005). Estudos mostraram que a utilização de plasma seminal melhora a viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do sêmen de carneiro criopreservado (OLLERO et al., 1997).

A membrana plasmática do espermatozóide pode sofrer remodelações quando o espermatozóide interage com proteínas do plasma seminal durante a ejaculação. Dois tipos de interações protéicas podem estar envolvidos nesse processo: a interação de proteínas com a membrana espermática e interações mútuas entre proteínas de formas monoméricas (MANÁSKOVÁ et al., 2003). Outras funções e características dos espermatozóides que podem ser influenciadas por proteínas do plasma seminal incluem a capacitação e a reação acrossômica (MANJUNATH E THÉRIEN, 2002), bem como a motilidade espermática (CURI et al., 2003), e a integridade genômica (CHEN et al., 2002). Por isso, a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies pode fornecer elementos para a certificação da fertilidade e da congelabilidade do sêmen (KILLIAN et al., 1993; RONCOLETTA et al., 1999; JOBIM et al., 2004; MOURA et al., 2006).

Diversos autores procuram marcadores para fertilidade em machos de várias espécies, sendo as proteínas do plasma seminal um dos principais alvos de estudos (HENAULT & KILLIAN, 1996).

Neste trabalho avaliou-se as proteínas presentes no plasma seminal de ovinos por meio da eletroforese bidimensional, comparando a presença ou ausência de tais proteínas com os resultados das análises espermáticas realizadas no sêmen descongelado de tais animais. Tais avaliações foram efetuadas com o objetivo de verificar diferenças no perfil protéico do plasma seminal dos animais estudados, identificando proteínas que possam ser utilizadas como marcadores protéicos da capacidade criopreservadora do sêmen.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 O sêmen e a fecundação

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozóides cuja fração é variável nas diferentes espécies e o plasma seminal. As interações entre as células espermáticas e o fluido seminal iniciam-se na espermatogênese (TULSIANI et al., 1997; NAABY-HANSEN et al., 1997). As células espermáticas ao alcançarem o epidídimo estão com a membrana plasmática não bem maturada e sofrem diversas alterações biológicas durante sua passagem pelo epidídimo (TULSIANI et al., 1997); incluindo estabilização da cromatina nuclear, aquisição de motilidade, compactação de fibras da cauda, alterações na composição da membrana com a incorporação de proteínas, açúcares, lipídios e outras modificações bioquímicas (MOORE & HIBBIT, 1976; AMANN, 1993). Na interação das células espermáticas com o meio epididimário e secreções das glândulas acessórias, algumas das proteínas que são incorporadas estão envolvidas na ligação do espermatozóide ao ovócito.

A membrana plasmática do espermatozóide passa por significativas mudanças bioquímicas durante seu trânsito ao longo do epidídimo. Além da maturação epididimária, os espermatozóides dos mamíferos devem passar por uma série de modificações bioquímicas e funcionais que ocorrem no trato genital da fêmea, conhecidas como capacitação espermática (TULSIANI et al., 1997).

Os principais fenômenos que devem ocorrer previamente à fecundação do gameta feminino são a capacitação espermática e a reação acrossomal. A fertilização é resultado destes eventos moleculares em que os espermatozóides capacitados se ligam ao ovócito e realizam uma série de outros eventos programados antes da penetração na zona pelúcida e fusão com o óvulo (ABOU-HAILA et al., 2000). Os espermatozóides, mesmo apresentando motilidade e aparente normalidade morfológica logo após a ejaculação, não têm capacidade de fecundar um ovócito, sendo esta adquirida no trato genital feminino em um processo denominado capacitação espermática (YANAGIMACHI, 1994; PÉREZ et al., 1996).

1.2.2 Capacitação espermática

As mudanças associadas à capacitação dos espermatozoides ocorrem por uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos da membrana plasmática dos espermatozoides permitindo sua interação com os ovócitos. As modificações moleculares ocorridas são a desestabilização celular onde há a redistribuição de partículas intramembrana; mudanças bioquímicas da superfície da membrana levando ao aumento da fluidez; remodelagem da superfície do espermatozoide; fosforilação de proteínas; aumento do cálcio e do pH interno e hiperpolarização da membrana. Durante esta fase, algumas proteínas de elevada massa molecular e alguns peptídeos, assim como lipídios e colesterol são perdidos da célula, culminando com o aumento da motilidade dos espermatozoides, ou seja, hiperativação espermática (AUSTIN E SHORT, 1990; TOPFER-PETERSEN et al., 2000). A perda de colesterol e ácidos graxos aumenta a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática, iniciando-se o processo de capacitação e reação do acrossoma (YANAGIMACHI, 1994).

As alterações iniciais na membrana plasmática durante a capacitação, envolvem a remoção periférica de antígenos de superfície e glicoproteínas de origem epididimal e/ou do plasma seminal, os fatores de decapacitação, que podem restringir o movimento de proteínas e lipídeos através da membrana (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Em resumo, a capacitação resulta de mudanças moleculares múltiplas nos componentes protéicos, glicoprotéicos e lipídicos da membrana. Estas modificações permitem o fluxo de íons transmembrana, importantes no início da capacitação, hipermotilidade e reação acrossomal (TULSIANI et al., 1997).

A capacitação também pode ser realizada *in vitro* em um meio contendo albumina, heparina e substâncias energéticas como glicose e piruvato. A albumina e a heparina são encontradas nas secreções do trato genital feminino em boas quantidades e são componentes importantes na capacitação tanto *in vivo* como *in vitro*. A heparina é uma glicosaminoglicano (GAGS) que estimula a capacitação dos espermatozoides. Estudos têm indicado que a habilidade dos espermatozoides de se ligarem a heparina e outros GAGS presentes nos fluidos do trato genital está correlacionada com a fertilidade. Assim os espermatozoides de touros com alta fertilidade possuem maior afinidade pela heparina do que os de baixa fertilidade. Essa afinidade é expressa pela maior frequência de reação de acrossoma à heparina que ocorre nos touros de maior fertilidade (YANAGIMACHI, 1994).

A reação do acrossomo é um processo exocitótico do espermatozoide necessário para que ocorra a fecundação. Somente os espermatozoides com o acrossomo reagido estão aptos a

atravessar a zona pelúcida, e assim, se ligam à membrana plasmática do ovócito e se fundem à ele. A reação do acrossomo leva à liberação de uma variedade de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, principalmente a acrosina e a hialuronidase, que são essenciais para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do ovócito (YANAGIMACHI, 1994).

1.2.3 Criopreservação do sêmen

A criopreservação do sêmen dos mamíferos promove a redução da capacidade fecundante dos espermatozóides em relação ao sêmen fresco. Isto se deve, em primeiro lugar, porque 40-50% dos espermatozóides criopreservados não sobrevivem, mesmo utilizando-se protocolos de congelamento mais eficientes, devido a modificações bioquímicas, funcionais e da estrutura da membrana plasmática, permanecendo apenas uma subpopulação de espermatozóides viáveis. Além disso, os danos criogênicos na bioquímica e na ultra-estrutura dos espermatozóides podem ser os responsáveis pelo decréscimo da integridade funcional, sobrevivência e capacidade de fertilização (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Uma maior severidade nos danos da membrana espermática ocorre com maior intensidade no sêmen dos carneiros do que nos touros. No mesmo sentido, a perda de lipoproteínas e aminoácidos após o congelamento é maior nos carneiros que nos touros, bem como as perdas dos fosfolipídios, levando ao decréscimo da atividade da fosfatase, a qual diminui de 15-50% o colesterol ligado a proteínas. A criopreservação também aumenta o conteúdo de sódio e diminui o de potássio nos espermatozóides. (HOLT, 2000).

No carneiro, alguns aspectos do processo de resfriamento-congelamento-descongelamento tornam a membrana espermática com maturação excessiva e aumenta a proporção de espermatozóides capacitados e com acrossoma reagidos precocemente. As mudanças na membrana não afetam a motilidade, mas encurtam a sobrevivência espermática, levando a perda da fertilidade, ou a incapacidade de fertilizar. O envelhecimento dos espermatozóides capacitados no trato genital após a inseminação cervical superficial agrava essa situação (SALAMON & MAXWELL, 1995; HOLT, 2000).

O processo de criopreservação causa danos subcelulares que podem afetar a habilidade fertilizante do espermatozóide sem um impacto concomitante sobre a motilidade o que significa que uma boa motilidade pós-descongelamento nem sempre está relacionada com boa fertilidade (GRONDHAL et al., 1992).

1.2.4 Plasma seminal - Proteínas e fertilidade

O plasma seminal é o produto das secreções das glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e bulbo-uretrais) bem como, dos epidídimos, ductos deferentes e ampolas dos ductos deferentes (EVANS & MAXWELL, 1990). A maior parte do plasma seminal se integra aos espermatozóides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas (MILLER et al., 1990). A sua composição inclui aminoácidos, açúcares, ácido cítrico, minerais, fosfatases, prostaglandinas e proteínas de uma faixa ampla de massa molecular (BARTH E OKO, 1989).

No plasma seminal, diversas proteínas exercem diferentes funções em diferentes estágios do processo de fertilização. Além de influenciar no equilíbrio osmótico e na inibição imunológica, algumas proteínas especialmente enzimas catalíticas, estão envolvidas no metabolismo espermático (SHIVAJI et al., 1990). Outras proteínas desempenham importantes funções na motilidade espermática, na capacitação, na reação acrossômica e na fusão ovócito-espermatozóide (WASSARMAN, 1999). A composição, a conformação e o tamanho dessas proteínas são específicos para cada espécie e elas são estáveis, dependendo das condições do sêmen (JELÍNKOVÁ et al., 2003).

O plasma seminal auxilia positivamente na fertilidade, servindo de diluente e veículo para os espermatozóides, exercendo efeitos estimulantes na motilidade espermática durante a ejaculação. Determinadas proteínas do plasma seminal apresentam um potencial para influenciar na motilidade espermática. Dentre elas estão as proteínas do plasma seminal bovino (BSP) A1/A2 (SANCHEZ-LUENGO et al., 2004), a proteína ácida do fluido seminal - aSFP (SCHONECK et al., 1996) e a fosfolipase A2 (BAO et al., 2004).

O plasma também é fonte de energia para o espermatozóide, possui capacidade tamponante e mantém a integridade da membrana celular dos espermatozóides (MAXWELL & JOHNSON, 1999). Ele possui proteínas, que se ligam aos espermatozóides, e que podem influenciar positivamente na capacidade de fertilização da célula (KILLIAN et al., 1993). Porém, fatores que interferem negativamente na fertilidade já foram identificados no plasma seminal como a seminaplasmina bovina e o fator 1 da antifertilidade humana, que inibem a capacitação ou a reação acrossômica, interferindo na fertilidade (KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1994).

O plasma seminal também atua modulando a reação acrossômica, evitando que esta ocorra prematuramente, o que levaria a falhas na fertilização. A adição de plasma seminal como solução de descongelamento exerce efeito protetor sobre os espermatozóides não

capacitados e previne a reação do acrossoma precoce no período pós-descongelamento do sêmen ovino (LAUSMANN et al., 2004; SILVA et al., 2005a). Isto ocorre devido aos “fatores decapacitantes” presentes no plasma seminal que previnem o desencadeamento do processo de capacitação do espermatozóide por meio da estabilização da membrana plasmática, tanto pela manutenção da razão colesterol/fosfolípidios quanto pelo bloqueio da calmodulina, a qual facilita o transporte transmembrânico de cálcio (FRAZER, 1998). A adição do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino criopreservado em pellets e aplicado pela via transcervical em ovelhas com estro sincronizado, proporcionou resultados significativamente superiores em relação ao descongelado sem adição do plasma seminal (SILVA et al., 2005b).

A capacitação é um dos eventos iniciais que ocorrem logo que os espermatozóides são misturados com as secreções das glândulas acessórias. O complexo de proteínas do plasma seminal bovino (BSP A1/A2, A3 e BSP 30 kDa) influenciam de modo significativo neste processo atuando no fluxo de colesterol na membrana do espermatozóide (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002). Um estudo de Nauc & Manjunath (2000) demonstrou que as proteínas BSP possuem a propriedade de ligação à superfície do espermatozóide, diminuindo sua quantidade após a criopreservação do sêmen e sugerindo alguma relação com a congelabilidade do sêmen.

Segundo Yuan et al. (2003) a fosfolipase A2 (PLA2) tem um amplo espectro de funções, algumas delas relacionadas à reação acrossômica e a fusão das membranas dos gametas. Entretanto, também existem evidências que a PLA2 estimula células imunológicas (GRANATA et al., 2005) e realiza uma atividade antimicrobiana no plasma seminal (BOURGEON et al., 2004). A expressão da PLA2 é detectada em maior abundância em touros com alta capacidade de fertilização (MOURA et al., 2006).

Miller et al. (1990), analisando sêmen bovino, mencionaram que a presença do plasma seminal é indispensável para a capacitação espermática e posterior fecundação, devido à presença de algumas proteínas denominadas HPBs (“heparin binding proteins”), que são produzidas pelas glândulas acessórias masculinas e secretadas no plasma seminal. Essas proteínas se ligam a membrana plasmática do espermatozóide quando estes entram em contato com o plasma seminal. Uma vez ligados a essas proteínas, os espermatozóides adquirem receptores específicos, através dos quais respondem ao efeito da capacitação pela heparina (MILLER et al., 1990). A análise das HBPs no plasma seminal e membrana plasmática do espermatozóide identificaram que essas proteínas têm pesos moleculares diferentes, sendo então classificadas em cinco grupos: B1, B2, B3, B4, B5. Bellin et al., (1994), avaliando a relação entre a presença da HBP e a fertilidade de touros, observaram que

os touros com alta fertilidade tinham maior presença de HBP – B5 na membrana plasmática do espermatozóide do que os de baixa fertilidade, embora a concentração total de HBP tenha sido semelhante para ambos os grupos. Esses resultados indicam que o tipo e não a quantidade total de HBP é que está relacionado com o potencial dos espermatozóides bovinos fecundarem.

A proteção dos gametas masculinos está direta ou indiretamente relacionada com proteínas presentes no plasma seminal, onde estas atuam em mecanismos de proteção da membrana plasmática, na prevenção do estresse oxidativo e do ataque imunológico (MOURA et al., 2006). A albumina absorve peróxidos de lipídeos, o que contribui como efeito protetor para o espermatozóide (ALVAREZ & STOREY, 1995) e sabe-se que a proteína ácida do fluido seminal (aSFP) age inibindo o estresse oxidativo (SCHÖNECK et al., 1996). Tedeschi et al. (2000) observaram que a aSFP do plasma seminal bovino demonstra 50% de homologia com a espermedesina Z13. Entretanto, esta espermedesina tem uma relação inversa com a fertilidade (MOURA et al., 2006), mas o mecanismo de ação desta proteína ainda não foi esclarecido.

A clusterina é um constituinte multifuncional do plasma seminal e pode prevenir contra o dano oxidativo do espermatozóide (REYES-MORENO et al., 2002), se ligar e aglutinar espermatozóides defeituosos (IBRAHIM et al., 1999) e proteger os gametas masculinos dos efeitos tóxicos da precipitação de proteínas (WILSON & EASTERBROOK-SMITH, 2000). A proteção do esperma do dano oxidativo, da aglutinação e da lise celular pode ser importante para os espermatozóides uma vez presentes no trato reprodutivo feminino.

Diversos autores procuram marcadores para fertilidade em machos de várias espécies, sendo as proteínas do plasma seminal um dos principais alvos de estudos. Sua presença, ausência ou concentração no plasma seminal é responsável pelos efeitos desta fluido na fertilidade espermática (HENAULT & KILLIAN, 1996). Para a separação e identificação dos componentes protéicos do plasma seminal podem ser utilizadas a gel filtração, a eletroforese unidimensional e a eletroforese bidimensional (KILLIAN et al., 1993; FRASER et al., 1996; BRANDON et al., 1999).

Marcadores bioquímicos de plasma seminal são também sugeridos por diversos autores para identificar animais superiores ou inferiores quanto ao seu potencial de fertilidade e diferenciar graus de congelabilidade do sêmen. Roncoletta (1999) estudou o perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas de membrana de espermatozóides e plasma seminal de touros taurinos e zebuínos doadores de sêmen, comparando os resultados obtidos

com o grau de congelabilidade destes touros. Observou uma quantidade de cerca de 20% a mais de proteínas totais no plasma seminal de zebuínos quando comparados aos taurinos, e encontrou diferenças na concentração e frequência de algumas bandas, entre os grupos de alta, média e baixa congelabilidade.

Alguns autores já correlacionaram as proteínas presentes no plasma seminal com o grau de congelabilidade do sêmen de diversas espécies, como búfalos (DHAMI & KODAGALI, 1986) e bovinos (PANGAWKAR et al., 1988). Moore e Hibbit (1976) e Moustafa e Meszauros (1981) postularam que as proteínas presentes no plasma seminal ligam-se às proteínas de membrana dos espermatozoides, provocando alterações bioquímicas; isso poderia aumentar a permeabilidade da membrana, promovendo injúria celular e choque térmico, durante a criopreservação. Garcia & Graham (1987) demonstraram que uma fração protéica de baixo peso molecular (< 12-14 kDa) não é benéfica para as células espermáticas durante a congelação, sugerindo a diálise para a retirada destas proteínas, para melhorar a congelabilidade do sêmen. Al-Somai et al. (1994 a,b), citam que as proteínas em maior concentração no plasma seminal, com peso molecular entre 15 e 16 kDa, aniônicas, são desfavoráveis à motilidade espermática e que sua retirada por diálise poderia melhorar este parâmetro. Afirmaram, ainda, que o prejuízo à motilidade espermática depende da concentração destas proteínas no plasma seminal.

Henault & Killian (1996) verificaram que os espermatozoides bovinos, quando colocados em meio contendo plasma seminal proveniente de animais de alta fertilidade, têm maior habilidade para penetrar em ovócitos em ensaios *in vitro*, quando comparados a meios contendo plasma seminal de animais de baixa fertilidade, sejam estes espermatozoides de animais de alta ou baixa fertilidade. Barrios et al. (2000) submeteram amostras de espermatozoides ovinos, separados do plasma seminal por dextran/swim-up, a choque térmico pelo frio. Posteriormente, incubaram estes espermatozoides com proteínas do plasma seminal, e demonstraram a reversão dos danos causados pelo choque térmico à membrana, indicando que proteínas presentes no plasma seminal são adsorvidas pela membrana espermática e modificam as características funcionais de espermatozoides danificados, reproduzindo as de uma célula intacta.

Na espécie eqüina, a adição de plasma seminal de garanhões de alta fertilidade a espermatozoides de animais de baixa fertilidade elevou a resistência dos espermatozoides à congelação e descongelação, concluindo que a composição do plasma seminal é um fator que determina a suscetibilidade individual de garanhões para a criopreservação do sêmen (AURICH et al., 1996).

Killian et al. (1993) avaliaram a composição protéica do plasma seminal de 35 touros holandeses de fertilidade conhecida, através da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Detectaram duas proteínas mais prevalentes em touros de alta fertilidade (55 kDa, PI 4,8 e 26 kDa, PI 6,4) e duas proteínas mais prevalentes em touros de baixa fertilidade (16 kDa, PI 4,1 e 6,7). Uma equação de regressão linear múltipla foi desenvolvida para a população de touros, baseada nas quantidades relativas das quatro proteínas do plasma seminal associadas à fertilidade. Os valores preditivos de fertilidade, calculados a partir desta equação, mostraram alta correlação (coeficiente de correlação de 0,89) com a fertilidade real dos touros. As duas proteínas relacionadas à alta fertilidade, presentes no plasma seminal, foram identificadas como osteopontina (CANCEL et al., 1997) e prostaglandina D sintetase tipo-lipocalina (GERENA et al., 1998).

1.2.5 Análise do perfil protéico

As proteínas exercem papéis cruciais em todos os processos biológicos (STRYER, 1988; JOBIM et al., 2003). Isto justifica, portanto, a gama de estudos desenvolvidos nesta área, os quais visam o entendimento dos complexos mecanismos de ação das mesmas dentro das mais variadas classes de seres vivos. O conjunto de proteínas expresso por um genoma ou tecido é chamado de proteoma (WILKINS & GOOLEY, 1997). Técnicas como a eletroforese bidimensional, espectrometria de massa e bioinformática são importantes ferramentas para a análise de proteomas. A identificação de proteínas a partir dessas técnicas são métodos estabelecidos e têm sido aplicados a numerosos sistemas biológicos.

Em diversas espécies, técnicas avançadas de proteômica têm sido empregadas para a detecção de marcadores bioquímicos de fertilidade e de congelabilidade dos espermatozoides. Grande parte dos estudos sobre proteínas do plasma seminal é relacionada com espécies de mamíferos domésticos como bovinos, suínos, ovinos e eqüinos, as quais são espécies com alto valor econômico e estudos sobre a fisiologia da reprodução são conduzidos há muitos anos (KILLIAN et al., 1993; RONCOLETTA et al., 1999; JOBIM et al., 2004; MOURA et al., 2006).

O método mais comum aplicado nas análises de proteomas é a eletroforese unidimensional do tipo SDS-PAGE, que apesar da limitação de separar proteínas apenas pelo peso molecular, é uma alternativa mais barata e que em estudos iniciais de proteomas pode contribuir de maneira significativa. Até agora, um dos métodos com melhor resolução na

separação de proteínas é a eletroforese bidimensional. Esta técnica é considerada como a base para construir mapas de proteoma e foi desenvolvida em 1975 (JAMES, 1997). A técnica de eletroforese bidimensional foi submetida a uma série de modificações melhorando a resolução e reprodutibilidade (LOPEZ, 1999).

Nas décadas de 1950 e 1960, a técnica de eletroforese começou a ser utilizada para mapear e identificar componentes protéicos solúveis de ejaculados (LARSON & SALISBURY, 1954; BENNET, 1964). Através de eletroforese unidimensional, o perfil protéico do plasma seminal bovino foi correlacionado com padrões de fertilidade normais (NASS et al., 1990) e alterados (WOLF et al., 1993); com a congelabilidade (RONCOLETTA et al., 2000) e com a viabilidade do sêmen (AURICH et al., 1996).

A eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida representa uma técnica valiosa para separação e caracterização das proteínas e através deste método, muitas proteínas do plasma seminal de várias espécies foram descritas e caracterizadas (FLOWERS, 1998; BRANDON et al., 1999).

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) de alta resolução, envolve como o próprio nome diz, duas dimensões, de acordo com O'Farrel (1975) e Klose (1975). A primeira dimensão consiste da focalização isoelétrica (IEF) e a segunda dimensão é a SDS-PAGE. O parâmetro de separação da primeira dimensão, o pI (ponto isoelétrico), é independente do peso molecular, o qual é o parâmetro de separação da segunda dimensão. O resultado da separação é um padrão de "spots", e de acordo com o sistema de coordenadas Cartesianas, o seguinte padrão de representação é considerado: da esquerda para a direita correspondente ao aumento do pI e de baixo para cima, correspondente ao aumento do peso molecular. A autoradiografia de proteínas marcadas e a coloração com prata são usadas freqüentemente na obtenção destes mapas bidimensionais, os quais oferecem alta resolução na separação de proteínas.

Alta reprodutibilidade da posição dos spots é muito importante na interpretação. A avaliação dos padrões 2D-PAGE é feita em computador, onde os eletroferogramas são então convertidos em sinais digitais com densitômetros, scanner desk top de alta resolução ou câmeras de vídeo. Com um software para avaliação apropriada, os dados são processados para análise qualitativa e quantitativa, a qual pode ser auxiliada por bases de dados via rede internacional (WESTERMEIER, 1997).

Outro método aplicado de forma expressiva nos últimos anos para estudar os mecanismos celulares envolvendo proteínas é a espectrometria de massa, a qual é uma técnica analítica que identifica qualquer molécula específica ou moléculas componentes de uma

mistura. Em geral, esta não é uma técnica quantitativa, entretanto, oferece alta exatidão no mensuramento de massa. O nível de precisão de espectrômetros de massa chega ao ponto da possibilidade de distinção de duas moléculas que diferem entre si apenas pela presença de um carbono-13 (CUNHA et al., 2006).

Com o rápido conhecimento desenvolvido nos últimos anos, marcadores bioquímicos têm sido descritos para a detecção de algumas propriedades biológicas de qualidade seminal (FRASER et al., 2006). O uso destes marcadores bioquímicos poderá ajudar a desenvolver novos critérios para a predição e aumento da fertilidade de reprodutores.

1.3 OBJETIVOS

Identificar e caracterizar o perfil de proteínas do plasma seminal relacionado com a capacidade de criopreservação de sêmen como alternativa para aumentar a viabilidade espermática do sêmen ovino congelado.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil protéico do plasma seminal, relacionando à congelabilidade de sêmen;
- Determinar a existência de variações no perfil protéico do plasma seminal entre os reprodutores;
- Identificar proteínas do plasma seminal para serem utilizadas como possíveis marcadores protéicos da congelabilidade do sêmen.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-HAILA, A., TULSIANI, D.R.P. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents and Function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Paris, v. 379, n. 2, p.173-182, 2000.
- AL SOMAI, N.; VISHWANATH, N.; SHANNON, P.E. et al. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.41, p.165-171, 1994a.
- AL-SOMAI, N., VISHWANATH, R., MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Anionic and Cationic components from protein aggregates in Bovine Seminal Plasma and their effects on sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**, v.39, p. 328-336, 1994b.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.334-346, 1995.
- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. **Equine Reproduction**, Malvern p.715-745, 1993.
- AURICH, J.E., KÜHNE, A., HOPPE, H. & AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p. 791-7, 1996.
- AUSTIN, C.R., SHORT, R. V. Reproduction in mammals – **Germ Cells and Fertilization**. New York: Cambridge University Press, v. 1, 1990, 177p.
- BAO, S.; MILLER, D. J.; MA, Z.; WOHLTMANN, M.; ENG, G.; RAMANADHAM, S.; MOLEY, K.; TURK, J. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.38194-38200, 2004.
- BARRIOS, B., PEREZ-PE, R., GALLEGO, M., TATO, A., OSADA, J., MUINO BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**; 63: 1531-1537. 2000.
- BARTH, A. D. OKO, R. J. Normal Bovine Spermatogenesis and Sperm Maturation. In: BARTH, A. D., OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**, Ames, Iowa State University, 1989.
- BELLIN, M. E., HAWKINS, H. E., AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal plasma. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 2441 – 2448, 1994.
- BENNET, J.P. Microeletrophoresis of bull, ram, boar & rabbit seminal plasma proteins. In: **Atti del V° Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale** (Trento, Itália). pp.186-189, 1964.
- BENTLEY, L.G., ANSAH, G.A., BUCKLAND, R.B. Seminal plasma proteins from a line of chickens selected for fertility of frozen-thawed semen and control line. **Poultry Science**, v.63, p.1444-1445, 1984.
- BOURGEON, F.; EVRARD, B.; BRILLARD-BOURDET, M.; COLLEU, D.; JÉGOU, B.; PINEAU, C. Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.70, p.768-774, 2004.

- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B. e FAYER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-873, 1999.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin Localization in the Holstein Bull Reproductive Tract. **Biology of Reproduction**, v.60, p.454 – 460, 1999.
- CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H. et al. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v.124, p.491-499, 2002.
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.36, p.40-46, 2006.
- CURI, S.M.; ARIAGNO, J.I.; CHENLO, P.H. et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. **Arch. Androl.**, v.49, p.343-349, 2003.
- DHAMI, A.J.; KODAGALI, S.B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.57, n.12, p.1283-6, 1986.
- EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1990. 191p.
- FLOWERS, W.L. Boar fertility and artificial insemination. **In: Proceedings of the 15th IPVS CONGRESS** (Birmingham,U.K.). pp. 45-52, 1998.
- FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reproductive Biology**, v.6 ,p.5-20, 2006.
- FRASER, L.R., Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fructose residues and a GPI-anchored receptor. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.193–202, 1998.
- FRAZER, G. S., BUCCI, D. M., BROOKS, C. L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-mililiter straws. **Theriogenology**, v. 46, p. 1103 – 1115, 1996.
- GARCIA,M.A.; GRAHAM,E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 446-454, 1987.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D syntetase. **Biology of Reproduction**, v.58, p. 826-833, 1998.
- GRANATA, F.; PETRAROLI, A.; BOILARD, E.; BEZZINE, S.; BOLLINGER, J.; DEL VECCHIO, L.; GELB, M. H.; LAMBEAU, G.; MARONE, G.; TRIGGIANI, M. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. **Journal Immunology**, v.174, p.464-474, 2005.
- GRONDHAL, C., HYTTEL, P., GREVE, T. Acrosome status in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. **In. International Congress of Animal Reproduction**, v. 12, p 1870-1872, 1992.
- HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,509p, 2000.

- HENAULT, M. A., KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterogenous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zone-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 199 – 204, 1996.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, London, v. 53, p. 47-58, 2000.
- IBRAHIM, N. M.; TROEDSSON, M. H.; FOSTER, D. N.; LOSETH, K. J.; FARRIS, J. A.; BLASCHUK, O.; CRABO, B. G. Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**, v.20, p.230-240, 1999.
- JAMES, P. Genomes and proteomes. **Biochemistry Biophysics Research Community**, v.3, 231 p. 1-6. 1997.
- JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.32, p.99-107, 2003.
- JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R, SALBEGO, C.G, SOUZA, D.O., WALD, V.B., MATTOS, R. C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 31 p. 21-30, 2003.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255-266, 2004.
- KILLIAN, G. J., CHAPMAN, D. A., ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**, v.49, p. 1202-1207, 1993.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. **Human Genetic**, v. 26: p. 231-243, 1975.
- KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, p.33-46, 2005.
- LARSON, B.L. e SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretic studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 206, p. 741-749, 1954.
- LAUSMANN, C. V., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D. Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.3. p.150-157, 2004.
- LOPEZ, M. F., Proteome analysis. Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B. Biomedical Science**, v. 5; p. 191-202. 1999.
- MANÁSKOVÁ, P.; BALINOVA, P.; KRAUS, M. et al. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.50, p.399-410, 2003.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109-119, 2002.

- MAXWELL, W. M. C., EVANS, G., MORTIMER, S. T. et al. Normal fertility in ewes after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p.123-126, 1999.
- MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p. 55-65, 1996.
- MILLER, D.J., WINER, M. A., AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 42, p 899-915, 1990.
- MOORE, H. D. M., HIBBITT, K. G. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 46, p.71-76, 1976.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v.98, p. 169-88, 2006.
- MOUSTAFA, A. R. & MÉZAROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing-and-thawing. **Acta Veterinariae. Academiae. Scientiarum. Hungaricae**, v. 28, p.403-408, 1981.
- NAABY-HANSEN, S., FLICKINGER, C.J., HERR, J.C. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.56, p.771-87, 1997.
- NASS, S.J.; MILLER, D.J.; WINER, M.A. e AX, R.L. Male accessory Sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular and Reproduction Development**, v.25, p.237-246, 1990.
- NAUC, V. e 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. **Biology of Reproduction**. v.63, p.1058-1066, 2000.
- NEVES, J. P. Novas técnicas da inseminação artificial em ovinos. *In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, Caprinocultura e Ovinocultura, 1990, Campinas – SP. Anais...Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990, p.57-67.*
- O' FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 250: p. 4007-4021. 1975.
- OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 381-390, 1997.
- PANGAWKAR, G. R., SHARMA, R. D., SINGH, R. Proteins, silica acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 65, p 58-60, 1988.
- PÉREZ, L. J., VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., et al. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, Buenos Aires, v.47, p.549-558, 1996.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p.425-34, 2001.
- REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, p.500-509, 2002.

- RONCOLETTA, M., FRANCESCHINI, P.H., LIMA, V. F., 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 doadores da raça gir. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 36, n. 2, 1999 .
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C; FRANCESCHINI, P.H. e RAMOS, P.R.R. 2000. Caracterização da proteína 26kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. 28 (Supl): 323.
- SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen: causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Sydney, v.38, p.1-36, 1995.
- SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Sydney, v.62, p.77-111, 2000.
- SANCHEZ-LUENGO, S.; AUMULLER, G.; ALBRECHT, M.; SEN, P. C.; ROHM, K.; WILHELM, B. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. **Journal of Andrology**, v.25, p.234-244, 2004.
- SCHÖNECK, C., BRAUN, J. e EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45: p. 633-642, 1996.
- SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P. J. Proteins of Seminal Plasma. **New York: J.H.Wiley and Sons, Inc.**, 1990.
- SILVA, T.A.S.N., NEVES, J.P., NETO, A.G.G., GUIMARÃES, A.P., RUMPF, R., SARTORI, R. Viabilidade e estado acrossomal do sêmen ovino descongelado e incubado com plasma seminal. **Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – XVI CBRA** Goiânia, 2005a.
- SILVA, T. A. S. N., NEVES, J.P., BRAGANÇA, J. M., GONÇALVES, P.B.D., RUMPF, R. Uso do plasma seminal no descongelamento do sêmen ovino para inseminação transcervical em ovelhas com estro sincronizado. **Anais da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – XIX SBTE** Angra dos Reis, 2005b.
- SOUZA, M.I.L. A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado. **(Dissertação, Mestrado)** – Universidade Federal de Santa Maria, 47p, 1993.
- STRYER, L. Introduction to biological membranes. **Biochemistry**, 3 ed., New York, p. 83-310. 1988.
- TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.6175-6179, 2000.
- TOPFER-PETERSEN, PETROUNKINA, A.M. Oocyte-sperm interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 653-662, 2000.
- TULSIANI, D. R. P., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 487 – 494, 1997.
- WASSARMAN, P. M.. Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. **Cell**, v. 96, p. 175-183, 1998.

- WATSON, P. F. The causes of reduces fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, London, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide for methods and applicacions of DNA and protein separations**. 2. Ed., Weinheim: VHC. 1997.
- WIKINS, M.R., GOOLEY, A.A. **Protein identification in proteome projects**. Cap. 3, pg. 47 EM. Proteome research: News Frontiers in functional genomics. 1997.
- WILSON, M. R.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. **TIBS**, v.25, p.95-98, 2000.
- WOLFE, D.F., BRADLEY, J.T. & RIDDEL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins inejaculates from normospermic bulls and bulls whith thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083-1091, 1993.
- YANAGIMACHI, R., Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. The **Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 1994.
- YUAN, Y. Y.; CHEN, W. C.; SHI, Q. X.; MAO, L. M.; YU, Q.; FANG, X.; ROLDAN, E. R. S. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.68, p.904-913, 2003.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS DE QUALIDADE DO SÊMEN EM OVINOS

Priscilla Pereira Moura^I, Lígia Freitas de Lima^{II}, Pedro Ivo Braga Passos^{III}, Diogo Ramos
Leal^{III}, Maurício Machaim Franco^{IV}, Jairo Pereira Neves^V

^I Pós-graduação em Ciências Animais, Reprodução Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília – DF, CEP 70910-900, plismoura@gmail.com Autor para correspondência.

^{II} Pós-graduada na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB.

^{III} Graduação na Faculdade Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB.

^{IV} Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária – Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen.

^V Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV/UnB

Trabalho submetido à publicação na revista Ciência Rural da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS DE QUALIDADE DO SÊMEN EM OVINOS.

Priscilla Pereira Moura. Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar o perfil protéico do plasma seminal ovino por meio de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D-PAGE) e verificar se alguma dessas proteínas está relacionada com a congelabilidade do sêmen, podendo ser utilizadas como marcadores para essa característica. Foram utilizados os ejaculados de cinco reprodutores, nos quais foram realizadas avaliações espermáticas e dos quais os plasmas seminais obtidos por centrifugação foram submetidos 2D-PAGE em gel a 12% de poliacrilamida. Foram identificados 92 *spots*, considerando todos os animais analisados. Destes, 41 (44,57%) foram identificados em todos os animais e 51 (55,43%) expressaram-se diferencialmente entre eles. Dentre as proteínas que se expressaram diferentemente, as proteínas 03 (7,9 kDa), 23 (13,6 kDa) e 31 (21,4 kDa) se destacaram, por apresentarem maior expressão e relações com as características espermáticas dos animais. A proteína 31 foi encontrada somente no animal 05 e apresentou alta expressão no mesmo. Esse animal apresentou os menores valores de integridade de membrana e espermatozóides vivos íntegros; e alto valor de espermatozóides mortos reagidos no sêmen descongelado. Já as proteínas 03 e 23 foram encontradas somente no animal 21 e se destacaram devido à alta expressão nesse animal, que apresentou a maior média de integridade de membrana no sêmen descongelado. A avaliação dos dados obtidos evidenciou variações significativas nos resultados das análises do sêmen dos animais e uma variabilidade no perfil protéico no plasma seminal dos carneiros, sugerindo as proteínas 03, 23 e 31 como possíveis marcadores da capacidade criopreservadora do sêmen. A proteína 31 como possível indicador da menor congelabilidade e as proteínas 03 e 23 como marcadores da maior congelabilidade do sêmen.

Palavras chave: Proteína, sêmen, carneiro, congelabilidade, eletroforese.

ABSTRACT

TWO-DIMENSIONAL CHARACTERIZATION OF SEMINAL PLASMA PROTEINS AND ITS RELATIONSHIP WITH QUALITY PARAMETERS OF FROZEN SEMEN IN RAM. Priscilla Pereira Moura. Jairo Pereira Neves, PhD. Brasília, DF.

The objective of this study was to identify and characterize the protein profile of ram seminal plasma using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and to verify if any of these proteins was associated with semen freezability, which could be used as markers for predicting semen freezability. Semen from five rams were used. The sperm analysis was held and the seminal plasma obtained by centrifugation was submitted to 2D-PAGE using 12% acrylamide gel. Ninety two spots were identified considering the analyzed animals. Forty one (44.57%) were found in all animals and 51 (55.43%) were differentially expressed among them. From that proteins differently expressed, the proteins 03 (7.9 kDa), 23 (13.6 kDa) and 31 (21.4 kDa) stood out because they showed higher expression and because of relations with the sperm characteristics of the animals. The protein 31 was found just in animal 05 and showed high expression in it. This animal had the worst values for live spermatozoa with intact acrosome and plasmatic membrane integrity; and high value for dead spermatozoa with reacted acrosome in thawed semen. Proteins 03 and 23 were found just in animal 21 and showed high expression in this animal, which presented the best values for plasmatic membrane integrity in thawed semen. The results showed a significant variation among sperm analysis of the animals and variability in the protein profile of the seminal plasma of the rams, suggesting that proteins 03, 23 and 31 are possible markers of semen freezability. Protein 31 predicting low semen freezability, and proteins 03 and 23 predicting high semen freezability.

Key words: Protein, semen, ram, frezability, electrophoresis.

2.1 INTRODUÇÃO

Dentre as biotécnicas de reprodução, a inseminação artificial é aquela que propicia maior amplitude de resultados nos programas de melhoramento animal, viabilizando a disseminação de material genético superior.

O crescimento da inseminação artificial tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento da tecnologia para utilização de sêmen congelado, cujo uso tem sido limitado devido os baixos índices de fertilidade conseguidos com a inseminação via cervical nos ovinos (MAXWELL & WATSON, 1996). A criopreservação do sêmen ovino reduz a sua capacidade fertilizante ao induzir danos na sua membrana espermática. No carneiro, alguns aspectos desse processo tornam a membrana espermática com maturação excessiva e aumenta a proporção de espermatozoides capacitados e acrossoma reagidos precocemente (SALAMON & MAXWELL, 1995; HOLT, 2000).

Nos últimos 50 anos, desde o primeiro relato mundial de congelação do sêmen ovino (ARAÚJO, 1955), ocorreram diversos investimentos nessa tecnologia, porém, a solução ideal para o uso do sêmen congelado nessa espécie ainda não foi obtida, nem se popularizou com a repetição de resultados (MORAES, 2003).

Entretanto, os índices de fertilidade das fêmeas inseminadas com sêmen congelado podem ser melhorados com os avanços positivos alcançados na técnica de inseminação transcervical (CARNEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2005) e, principalmente, com as melhorias que ainda podem ser implementadas na técnica de congelamento de sêmen (AISEN et al., 2005; BICUDO, 2005; AISEN et al., 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que componentes do plasma seminal inibem a capacitação e possuem a habilidade de reverter os efeitos deletérios provocados pelo choque térmico, melhorando a viabilidade e heterogeneidade da membrana plasmática do sêmen de carneiro criopreservado (OLLERO et al., 1997; PÉREZ-PÉ et al., 2001). A adição de plasma seminal como solução de descongelamento exerce efeito protetor sobre os espermatozoides não capacitados e previne a reação do acrossoma precoce no período pós-descongelamento do sêmen ovino (LAUSMANN et al., 2004; SILVA et al., 2005).

Os componentes do plasma seminal, especialmente as proteínas, desempenham um papel crucial em todos os processos relacionados com a capacidade fecundante dos espermatozoides. Com isso, diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de encontrar proteínas no plasma seminal ovino que possam ser utilizadas como possíveis

marcadores da congelabilidade e da fertilidade do sêmen (STRYER, 1988; JOBIM et al., 2003)

A eletroforese é uma técnica que vem sendo utilizada há anos para mapear e identificar componentes protéicos solúveis de ejaculados, na busca de marcadores bioquímicos para diferenciação de animais quanto ao grau de sua fertilidade (RONCOLETTA et al., 1999). O objetivo do presente estudo foi relacionar o perfil das proteínas do plasma seminal ovino, obtido pela técnica de eletroforese bidimensional, com a congelabilidade do sêmen, identificando proteínas que possam ser utilizadas como possíveis marcadores da congelabilidade do sêmen ovino.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas, criopreservações e avaliações do sêmen e plasma seminal foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen, Brasília – DF; e no Laboratório de Reprodução Animal II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado na Fazenda Experimental Sucupira, Brasília, DF.

Foram utilizados cinco reprodutores da raça Santa Inês em idade adulta, boa condição corporal, clinicamente sadios e com mesmo regime de alimentação (feno de coast-cross, silagem e sal mineral).

Anteriormente ao programa de criopreservação, os animais foram submetidos a exames andrológicos, sendo que todos apresentaram características espermáticas acima dos padrões mínimos preconizados para congelamento, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

2.2.1 Coletas e avaliação do sêmen

Cada reprodutor foi submetido a 16 coletas de sêmen com vagina artificial, sendo que o sêmen de 8 coletas foi utilizado para a criopreservação e o sêmen das outras 8 coletas foi utilizado para obtenção das amostras de plasma seminal.

Os animais foram separados em dois lotes: lote A (79, 145 e 271) e lote B (05 e 21). Em cada dia de coleta o sêmen de um grupo era congelado e o do outro grupo era utilizado para separação do plasma. O intervalo entre as coletas era de 48 horas.

Os ejaculados utilizados para criopreservação foram analisados considerando os seguintes itens: coloração, aspecto, odor, volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática. Os ejaculados utilizados foram aqueles que apresentaram os seguintes padrões mínimos: motilidade de 60%, vigor 3 e concentração de 3×10^9 spz/ml.

2.2.2 Coletas de plasma seminal

Para obtenção das amostras de plasma seminal, as amostras de sêmen foram submetidas a uma primeira centrifugação para separação do plasma e células, sendo o plasma coletado (sobrenadante) e imediatamente armazenado a -20°C . Após todas as coletas e processamento, foram encaminhadas ao Laboratório de Reprodução Animal I da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As amostras foram novamente centrifugadas a $12.000g$ por 10 minutos a 4°C duas vezes para separação total do plasma e espermatozoides. Em seguida, as amostras de plasma de cada animal, de cada uma das oito coletas, foram aliquotadas em dois tubos de 1,5 mL e acondicionadas a -80°C até a avaliação das proteínas.

2.2.3 Processamento e criopreservação do sêmen

Após as avaliações iniciais dos ejaculados, procedeu-se a pré-diluição na proporção de 1:1 (sêmen/meio diluidor), sob temperatura de 35°C , com meio composto por glicina, gema de ovo, leite e glicerol (Nutricell). Após a obtenção da concentração espermática por meio de contagem em Câmara de Neubauer, o sêmen foi então rediluído, ajustando-se a uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides totais/dose e envazado em palhetas de 0,25ml. Imediatamente após esses procedimentos as palhetas com sêmen foram submetidas à refrigeração em refrigerador doméstico (Consul compacto 120) por 90 minutos. Após esse período, as bandejas contendo as palhetas foram transferidas para uma caixa de polietileno (isopor) contendo nitrogênio líquido a uma distância de 5 cm acima do nível no nitrogênio, permanecendo por 20 minutos, sendo então, mergulhadas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196°C .

2.2.4 Avaliações do sêmen fresco

O sêmen fresco foi avaliado, primeiramente, quanto à motilidade e vigor espermático.

Antes da diluição do sêmen para iniciar o processo de criopreservação foram coletadas amostras para realização de morfologia espermática e para avaliação de viabilidade e integridade de acrossoma.

As amostras para avaliação da morfologia espermática foram obtidas com vinte microlitros de sêmen diluídos em 1 ml de solução formol-salina armazenados em microtubos de 1,5ml a 5°C para posterior leitura em microscopia de contraste de fase. Foram contadas 200 células por lâmina e contabilizados os defeitos espermáticos encontrados.

A avaliação da viabilidade e integridade do acrossomo foi determinada por microscopia de campo claro através da coloração dupla (Trypan-blue + Giemsa) segundo Didion (1989). Foram contadas 200 células por lâmina e os espermatozóides encontrados foram classificados em vivo com o acrossomo íntegro (VI), vivo com o acrossomo reagido (VR), morto com o acrossomo íntegro (MI), morto com o acrossomo reagido (MR).

2.2.5 Descongelamento do sêmen

Foram descongeladas duas amostras de cada partida a 37°C durante 30 segundos e depositadas em tubos de vidro de 5ml mantidos à 37°C, sendo realizadas as mesmas avaliações descritas para o sêmen fresco, acrescidas de outros 2 testes: teste de integridade de membrana plasmática (IMP) e teste de termo-resistência (TTR).

2.2.6 Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada na hora zero de descongelamento utilizando-se uma combinação das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) e o Iodeto de Propídio (IP) como descrito por Zúccari (1998). Foram adicionados 10µl de sêmen descongelado a 40µl de uma solução preparada com a combinação de 10µl de formol salina tamponada, 10µl de DIC e 5µl de IP para 480µl de citrato de sódio a 2,94%. Após a incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, 10µl dessa suspensão foram depositados entre lâmina e lamínula. Duzentas células foram contadas através de um

microscópio de epifluorescência e os espermatozóides foram considerados com membrana íntegra quando corados com verde ou com membrana lesada quando corados de vermelho ou verde e vermelho.

2.2.7 Teste de Termo Resistência (TTR)

As palhetas descongeladas foram submetidas ao teste de exaustão a 37°C durante 240 minutos (PAGANINI FILHO, 1999). As avaliações de motilidade e vigor espermático foram realizadas no momento da descongelação (hora 0), aos 120 minutos (hora 2) e aos 240 minutos de incubação (hora 4).

2.2.8 Eletroforese bidimensional do plasma seminal

Para a caracterização do perfil protéico do plasma seminal em gel bidimensional, dois *pools* de cada animal foram feitos: um com as primeiras quatro amostras coletadas (primeiro mês) e outro com as quatro últimas amostras coletadas (segundo mês).

As duas amostras, *pool 1* e *pool 2*, de cada animal, foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando diluições controle com Albumina Sérica Bovina (BSA) fração V para calcular a equação de regressão (Figura 2.1).

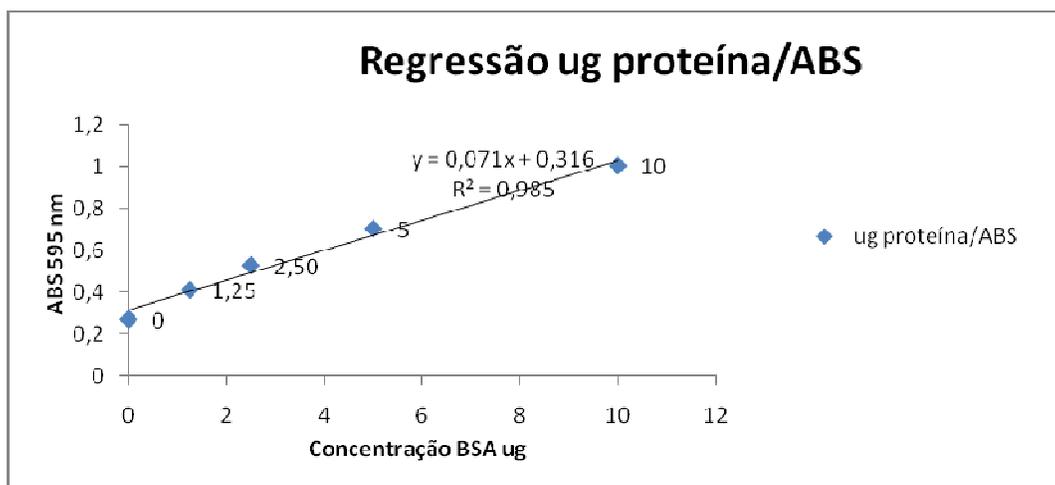


Figura 2.1 – Equação de regressão gerada e utilizada para a quantificação de proteína total nas amostras de plasma seminal dos cinco animais estudados.

Posteriormente, para caracterizar e comparar o perfil protéico bidimensional do plasma seminal, dois géis bidimensionais foram obtidos para cada animal, utilizando amostras dos *pools 1 e 2*.

Para isso, 200 µg de proteínas de cada amostra foram ressuspensas e solubilizadas durante 1 hora à temperatura ambiente em 250 µL de tampão de solubilização/rehidratação contendo 1% de DTT, 2% de IPG *buffer* e 2% de CHAPS. Em seguida, as amostras foram aplicadas em canaletas individuais para cada animal no *Reswelling Tray* (Amersham), onde uma *strip* de 4-7 L de 13 cm foi colocada sobre as amostras com o gel voltado para baixo; e então foram cobertas com 3 mL de *cover fluid* (GE), para rehidratação *overnight* (16 horas).

No segundo dia, foi realizada a focalização isoeletrica (primeira dimensão), na qual as proteínas foram separadas pelo seu ponto isoeletrico. Para isso, as tiras (*strips*) foram retiradas do *Reswelling Tray*, o excesso de óleo foi escorrido e estas foram colocadas nas canaletas do *Aligner*, o qual foi colocado no *Multiphor II* e coberto com *cover fluid* para a focalização. As condições da focalização isoeletrica foram as seguintes:

- 1) 300V 2mA 5W 1'
- 2) 3500V 2mA 5W 1:30h
- 3) 3500V 2mA 5W 5:00h

Todas as corridas foram realizadas a 18° C.

Após a focalização isoeletrica, as tiras foram acondicionadas individualmente em tubos de vidro sem nenhuma solução a -80° C até sua utilização para a segunda dimensão.

Para a segunda dimensão, na qual as proteínas foram separadas pelo seu peso molecular, foi realizada uma SDS PAGE utilizando um gel a 12%. As tiras foram retiradas do *freezer* -80° C e foram equilibradas em 10 mL de tampão de equilíbrio mais 100 mg de DTT por 30 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Após o equilíbrio, as tiras foram colocadas sobre um papel de filtro umidificado com Água MilliQ para retirar o excesso de tampão. Posteriormente, foram colocadas sobre a superfície do gel de acrilamida (15cmx14cmx1mm) e fixadas com uma solução de agarose. As condições de corrida da eletroforese foram as seguintes:

- 1) 10mA 15'
- 2) 20mA 5-7:50h*

* As corridas foram interrompidas quando o azul de bromofenol saiu do gel.

Todas as corridas foram realizadas a 18° C.

Após o término das corridas os géis foram corados com solução de nitrato de prata e scaneados. As imagens foram analisadas no programa Image Máster 2D Platinum para obtenção dos pIs e Peso Moleculares exatos dos spots estudados. Nas análises foram consideradas a presença ou ausência dos spots observados e através do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI) aproximado, foi verificada a correspondência entre os *spots* encontrados e as proteínas específicas do plasma seminal já descritas na literatura.

2.2.9 Análise estatística

Os dados coletados foram analisados por meio do *software* SAS (Statistical Analysis System, edição 2.0, 2004) utilizando-se o procedimento GLM (análise de variância).

Nos dados das avaliações espermáticas quando algum efeito foi observado utilizou-se o teste de médias Duncan, considerando nível de significância de $P < 0,05$.

2.3 RESULTADOS

Na avaliação da motilidade espermática observou-se diferença significativa entre os animais apenas para o sêmen fresco e após quatro horas de descongelamento, conforme a Tabela 2.1. Não houve diferença significativa entre os animais nas avaliações morfológicas do sêmen fresco e descongelado.

Tabela 2.1 – Médias (\pm desvio-padrão) da Motilidade Espermática (%) para o sêmen fresco (Fr) e nas horas zero (H0), dois (H2) e quatro (H4) de descongelamento.

Animal	Fr (%)	H0 (%)	H2 (%)	H4 (%)
5	71,25 ^{AB} $\pm 6,4$	40,00 $\pm 9,2$	23,75 $\pm 7,4$	8,75 ^D $\pm 5,1$
21	72,50 ^{AB} $\pm 4,6$	42,50 $\pm 11,6$	31,25 $\pm 8,3$	23,12 ^{AB} $\pm 10,3$
79	75,62 ^A $\pm 4,9$	38,75 $\pm 12,4$	26,25 $\pm 13,0$	13,75 ^{DC} $\pm 8,7$
145	67,50 ^B $\pm 7,0$	50,62 $\pm 6,7$	34,37 $\pm 9,7$	27,50 ^A $\pm 7,0$
271	76,25 ^A $\pm 5,8$	38,75 $\pm 10,6$	32,50 $\pm 8,8$	17,50 ^{BC} $\pm 7,0$

^{A,B,C,D} letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A porcentagem de espermatozoides vivos e mortos com acrossomo íntegro não diferiu entre os animais para o sêmen fresco, conforme Tabela 2.2. Porém, houve diferença significativa entre os animais para tais parâmetros no sêmen descongelado (hora zero).

Tabela 2.2 – Médias (\pm desvio-padrão) do Trypan Blue Giemsa (%) - Vivo íntegro (VI) e Morto íntegro (MI) para o sêmen fresco (Fr) e na hora zero (H0) de descongelamento.

Animal	VI Fr (%)	VI - H0 (%)	MI Fr (%)	MI - H0 (%)
5	92,24 \pm 2,8	54,30 ^C \pm 5,5	5,17 \pm 2,4	44,05 ^A \pm 5,4
21	93,63 \pm 1,0	74,49 ^A \pm 5,2	4,99 \pm 1,3	24,34 ^D \pm 5,3
79	91,98 \pm 4,5	69,42 ^{AB} \pm 5,7	5,52 \pm 4,3	28,19 ^{CD} \pm 6,2
145	93,78 \pm 2,5	62,61 ^B \pm 7,9	5,16 \pm 2,5	36,80 ^{AB} \pm 7,9
271	94,29 \pm 2,3	65,00 ^B \pm 10,0	4,57 \pm 2,2	34,24 ^{BC} \pm 9,9

^{A,B,C,D} letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Os animais não apresentaram diferença significativa quanto à porcentagem de espermatozoides vivos reagidos no sêmen fresco. No sêmen descongelado (hora zero), houve diferença significativa entre os animais. Em relação aos mortos reagidos, houve diferença significativa tanto para o sêmen fresco quanto para o descongelado (Tabela 2.3)

Tabela 2.3 – Médias (\pm desvio-padrão) do Trypan Blue Giemsa (%) - Vivo reagido (VR) e Morto reagido (MR) para o sêmen fresco (Fr) e na hora zero (H0) de descongelamento.

Animal	VR Fr (%)	VR - H0 (%)	MR Fr (%)	MR - H0 (%)
5	0,91 \pm 0,6	0,73 ^{AB} \pm 0,7	1,66 ^A \pm 1,2	0,94 ^{AB} \pm 0,6
21	0,66 \pm 0,6	0,53 ^{AB} \pm 0,5	0,70 ^B \pm 0,3	0,63 ^{CB} \pm 0,5
79	0,81 \pm 0,6	1,16 ^A \pm 1,5	1,68 ^A \pm 0,9	1,20 ^A \pm 0,6
145	0,58 \pm 0,3	0,14 ^B \pm 0,1	0,47 ^B \pm 0,4	0,43 ^C \pm 0,2
271	0,53 \pm 0,4	0,18 ^B \pm 0,2	0,60 ^B \pm 0,8	0,55 ^{CB} \pm 0,2

^{A,B} letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Para os resultados da avaliação da IMP após o descongelamento foi observada diferença significativa entre os animais, como demonstrado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Médias (\pm desvio-padrão) da integridade de membrana (%) para o sêmen na hora zero (H0) de descongelamento.

Animal	H0 – ÍNTEGROS (%)
5	15,81 ^B \pm 5,4
21	28,56 ^A \pm 7,0
79	24,37 ^A \pm 9,6
145	28,12 ^A \pm 7,3
271	22,43 ^{AB} \pm 9,2

^{A,B} letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

As concentrações de proteínas totais presentes no plasma dos diferentes animais estão apresentadas na Tabela 2.5 e apresentaram uma média de 35,62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabela 2.5 - Concentração de proteínas totais (média \pm dp) nas amostras de plasma seminal

Animal	Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
05	35,64 \pm 5,86
21	38,37 \pm 1,89
79	36,86 \pm 0,69
145	32,99 \pm 6,15
271	34,26 \pm 0,39
Média	35,62\pm2,11

Foram identificados 92 spots (numerados de 1 a 92 para identificação), considerando todos os animais analisados. Destes, 41 (44,57%) foram identificados em todos os animais e 51 (55,43%) se apresentaram diferencialmente expressos (presença ou ausência) entre os animais. Dos spots estudados, 29 (31,52%) deles estavam presentes ou ausentes em apenas um animal. Destes 29 spots, 13 se mostraram diferencialmente expressos apenas no animal 21 (spots 1; 3; 23; 48; 50; 53; 85; 86; 88; 89; 90; 91; 92); 9 no animal 05 (31; 55; 62; 63; 75; 76; 77; 78; 83); 4 no animal 79 (4; 5; 30; 32) e 3 no animal 145 (35; 37; 39), conforme apresentado nas Tabelas 2.6 e 2.7 (Anexos). No presente trabalho foi encontrada relação entre proteínas do plasma seminal e as avaliações espermáticas dos animais conforme discutido mais adiante.

Dentre as proteínas que se expressaram diferentemente, as proteínas 03 (≤ 10 kDa) e 23 (15-20 kDa) se destacaram por estarem presentes e com alta expressão somente no animal 21 (Figura 2.2) e a proteína 31 (20-25 kDa) somente no animal 05 (Figura 2.3).

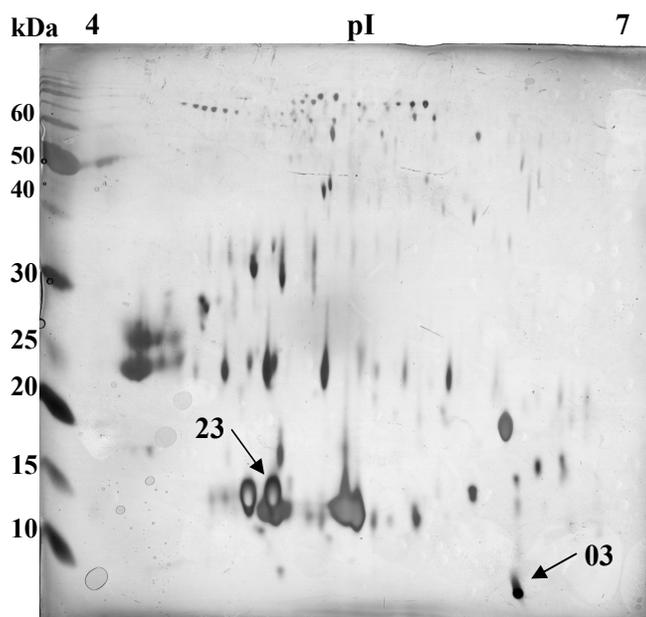


Figura 2.2 – Gel de Eletroforese Bidimensional SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata (animal 21), mostrando os *spots* 03 e 23 (setas) presentes somente nesse animal.

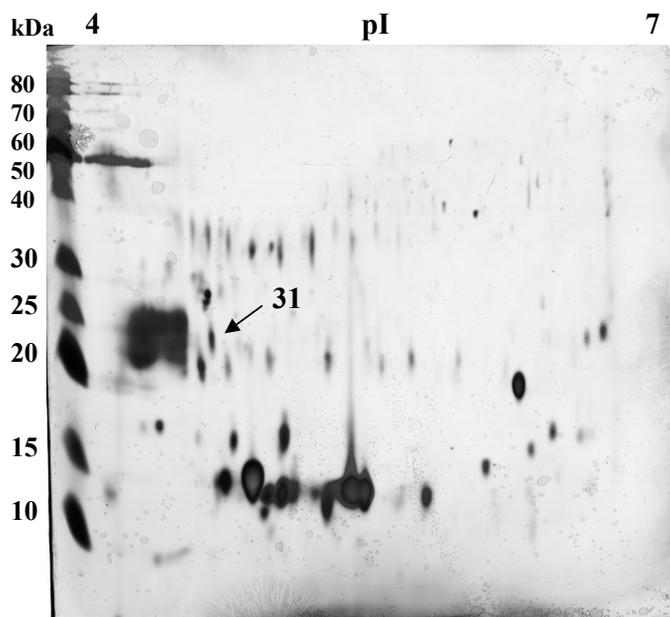


Figura 2.3 – Gel de Eletroforese Bidimensional SDS-PAGE 12%, corado com nitrato de prata (animal 05), mostrando o *spot* 31 (seta) presente somente nesse animal.

O dendograma baseado no perfil protéico dos animais (Figura 2.4) mostra que o animal 21 é o mais distante entre eles e os animais 145 e 271 os mais próximos entre si.

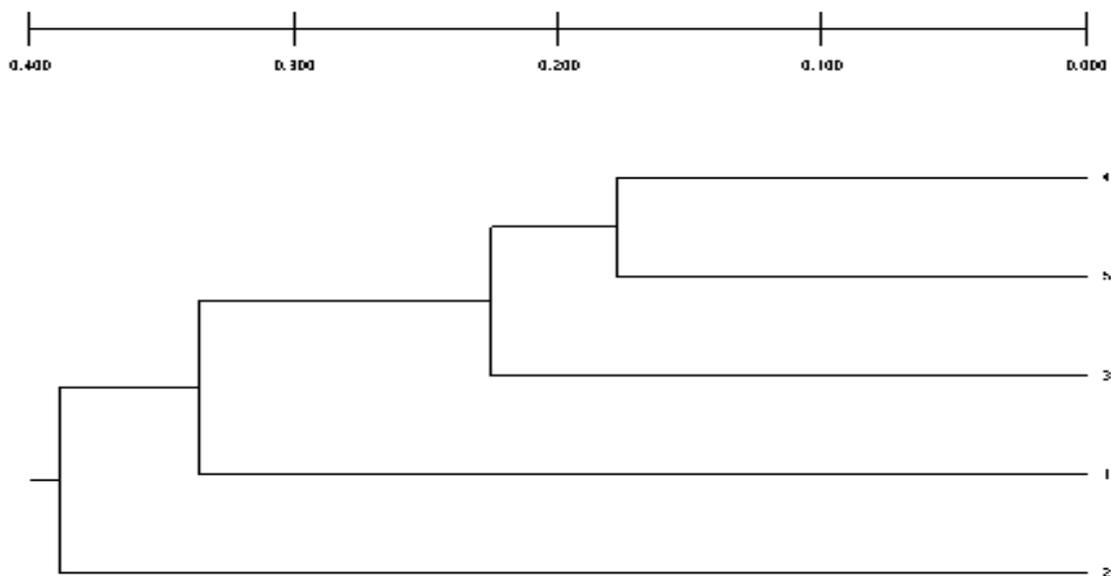


Figura 2.4 – Dendrograma baseado no perfil protéico dos animais 05 (1), 21 (2), 79 (3), 145 (4) e 271 (5).

2.4 DISCUSSÃO

A criopreservação do sêmen provoca alterações no mesmo, resultando na redução da capacidade fecundante dos espermatozoides quando comparado com o sêmen fresco. Na avaliação da motilidade espermática o animal 145 apresentou média inferior para o sêmen fresco e foi diferente estatisticamente dos animais 79 e 271, que apresentaram as maiores médias para tal parâmetro (Tabela 2.1). Porém, o animal 145, durante o processo de descongelamento, apresentou as maiores médias, sendo semelhante estatisticamente ao animal 21 e diferente dos demais animais. Tal fato demonstra uma capacidade maior de manter tal parâmetro em bons níveis após o descongelamento do sêmen e foi observada relação com proteínas presentes no plasma seminal do animal 21 e 145, como mencionado mais adiante. O animal 05 apresentou a maior queda na motilidade espermática após o descongelamento, apresentando uma média estatisticamente semelhante apenas à do animal 79 e diferente do restante dos animais. Maxwell et al. (1999) observaram que a adição de plasma seminal no sêmen descongelado de carneiros aumentou os parâmetros de motilidade espermática em relação ao grupo controle sem adição do mesmo, evidenciando que o plasma seminal exerce efeitos favoráveis aos espermatozoides.

Nas avaliações dos espermatozóides vivos e mortos com acrossoma íntegro observa-se que o animal 21 apresentou, no sêmen descongelado, um dos maiores resultados para quantidade de vivos íntegros e o menor para mortos íntegros; sendo semelhante estatisticamente apenas ao animal 79 e diferente de todos os outros. O animal 05 apresentou os menores resultados para vivos íntegros e o maior para mortos íntegros (Tabela 2.2).

Sabe-se que os processos de refrigeração, congelação e descongelação aceleram a maturação das membranas espermáticas, aumentando assim a proporção de espermatozóides capacitados e acrossomos reagidos (Salamon e Maxwell, 2000). Nas avaliações dos espermatozóides vivos reagidos observou-se que os animais 145 e 271 apresentaram as menores médias e foram semelhantes entre si, mas não diferiram dos animais 05 e 21. Já o animal 79 apresentou maior média, mas não diferiu dos animais 05 e 21; conforme Tabela 2.3. Em relação aos mortos reagidos, para o sêmen fresco os animais 05 e 79 apresentaram as maiores médias e não diferiram entre si. Já os animais 21, 145 e 271 foram semelhantes entre eles. Para o sêmen descongelado, os animais 05 e 79 apresentaram as maiores médias de mortos reagidos e não diferiram entre si. O animal 145 apresentou a menor média para tal parâmetro (Tabela 2.3).

Silva et al. (2005) em estudo sobre o efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino evidenciou que o plasma seminal foi efetivo protetor da integridade do acrossoma, prevenindo uma reação precoce. Maxwell et al. (1999), demonstraram que, após a adição do plasma seminal, houve menos células capacitadas e de acrossoma reagido no sêmen descongelado de carneiros em comparação com o grupo controle sem adição de plasma.

A integridade da membrana plasmática do espermatozóide indica sua viabilidade, e a maioria de suas avaliações verificam se a membrana está intacta ou não. A fim de fecundar o ovócito, o espermatozóide deve possuir uma membrana plasmática intacta e competente. Quando o espermatozóide é submetido à diminuição de temperatura durante as etapas da criopreservação, ocorre a desestabilização e até mesmo a ruptura da membrana. Para os resultados da avaliação da IMP o animal 21 apresentou a maior porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra. Os animais 21, 79 e 145 não diferiram entre si. Os animais 05 e 271 foram semelhantes entre si e o animal 05 apresentou a menor porcentagem de espermatozóides com a membrana íntegra (Tabela 2.4).

Os resultados obtidos a partir da eletroforese bidimensional evidenciaram uma variabilidade no perfil protéico no plasma seminal dos carneiros. Observando os géis obtidos, conclui-se que apresentaram boa resolução, uma vez que foi detectada uma quantidade alta de spots. Foram identificados 92 spots, considerando todos os animais analisados. Jobim et al.

(2005) detectaram 21 spots com peso molecular variando de 15 a 115 kDa e pI de 3,2 a 8,7 no plasma seminal ovino, por meio de eletroforese bidimensional.

Analisando os valores encontrados na quantificação de proteínas totais do plasma seminal ovino observa-se que o animal com a maior concentração de proteínas totais também apresentou os maiores resultados para integridade de membrana; e que o animal com a menor concentração de proteínas apresentou os maiores resultados para a motilidade espermática após o descongelamento (Tabela 2.5).

Barrios et al. (2000) observaram que algumas frações protéicas do plasma seminal ovino são capazes de recuperar a ultra estrutura e permeabilidade da membrana de espermatozoides já danificados pelo processo de congelação. Estes resultados foram confirmados por Pérez-Pé et al. (2001) que observaram que concentrações de proteínas do plasma seminal de 0,7; 1,4 e 2,1 mg/ml, depois de adicionadas ao sêmen, foram capazes de proteger espermatozoides ovinos contra os danos causados pela congelação dessas células, sendo que a porcentagem de membranas intactas aumentou após 1 hora de incubação no grupo com adição de maior concentração de proteínas e apresentou redução desprezível nas outras concentrações. Jobim et al. (2003) estudando proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino observaram que quanto maior a concentração de proteínas totais, menor a motilidade espermática pós-congelamento. Os resultados observados no presente estudo podem ser explicados pelas observações feitas por tais autores. Roncoletta (1999) encontrou valores significativamente superiores na concentração de proteínas totais nas amostras de reprodutores bovinos de alta congelabilidade do sêmen comparativamente às de baixa congelabilidade.

Souza et al. (2004), estudando proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês, observaram que a maioria das proteínas do plasma seminal desses animais possuem peso molecular abaixo de 75 kDa e pIs ácidos, sendo que poucas apresentam pI acima de 8. Avaliando os géis obtidos nesse experimento, observamos resultados similares no perfil protéico do plasma seminal.

Analisando os dados da avaliação espermática do sêmen fresco e descongelado e das proteínas presentes no plasma seminal desse estudo é possível observar relações entre os parâmetros espermáticos avaliados e determinadas proteínas. Pela análise dos géis obtidos pela eletroforese bidimensional dos plasmas seminais, pôde-se notar que existem diferenças marcantes e individuais entre os perfis de cada animal.

Da mesma forma que Al-Somai et al. (1994 a,b) e Garcia & Graham (1987), neste experimento foram encontradas as proteínas 21 (15,5 kDa; pI 4,68) e 49 (35,7 kDa; pI 4,57)

presentes nos animais 005 e 79, que apresentaram as menores médias para motilidade espermática e para a integridade de membrana plasmática (Tabelas 2.1 e 2.4).

Al-Somai et al. (1994 a,b) comentaram que as proteínas em maior concentração no plasma seminal, com peso molecular entre 15 e 16 kDa, aniônicas, são desfavoráveis à motilidade espermática, e que sua retirada por diálise poderia melhorar este parâmetro. Afirmaram, ainda, que o prejuízo à motilidade espermática depende da concentração destas proteínas no plasma seminal. Garcia & Graham (1987) demonstraram que uma fração protéica de baixo peso molecular (< 12-14 kDa) não é benéfica para as células espermáticas durante a congelação, sugerindo a diálise para a retirada destas proteínas, para melhorar a congelabilidade do sêmen.

Jobim et al. (2005) relacionaram proteínas de 33-35 kDa/pI 7,8-8,0; 105-108 kDa/pI 6,8-7,0; 75 - 78 kDa/pI 6,5-6,8 e 65-67 kDa/pI 6,7-7,0 às metaloproteinases de matriz (MMPs) ovinas, baseado nas massas moleculares e pontos isoelétricos semelhantes. As MMPs compreendem uma família de aproximadamente vinte enzimas proteolíticas com papel essencial na remodelação, reparo tecidual e interação célula-célula. As MMPs foram detectadas em tecidos reprodutivos e também no plasma seminal (MORTARINO et al., 1998). Pouco se sabe sobre sua expressão e função específica no trato reprodutivo masculino, mas acredita-se que elas estão envolvidas na migração de espermátides e espermatozóides através dos túbulos seminíferos (WOLFSBERG et al., 1995).

Verificando as proteínas de alto peso molecular nos géis obtidos e analisando os dados de avaliação espermática, as proteínas 80 (70,8 kDa; pI 5,13) e 87 (61,8 kDa; pI 5,80) estavam presentes somente nos animais 21 e 145, que apresentaram os maiores resultados para a motilidade espermática no sêmen descongelado. A proteína 87 também só foi encontrada nos animais 21 e 145, que apresentaram os maiores resultados para integridade de membrana plasmática (Tabelas 2.1 e 2.4).

Ao contrário dos resultados encontrados nesse estudo, Baas et al. (1983) observaram que as moléculas de alto peso molecular são responsáveis pelo efeito danoso aos espermatozóides, enquanto aquelas de baixo peso molecular estão relacionadas à ativação da motilidade espermática. Relataram ainda, que os polipeptídeos com menor peso molecular também apresentaram variações individuais, mas quando os perfis são comparados observa-se menor variabilidade que os citados anteriormente. Roncoletta (1999) citou que, com baixo peso molecular encontram-se as cadeias polipeptídicas em maior concentração no plasma seminal, cadeias que têm uma Mr em torno de 83,78 e PM abaixo de 14 kDa. Cardozo et al. (2006) também observaram correlação negativa entre a motilidade espermática e proteínas

com 46.9 kDa, 41.3 kDa e 40.5 kDa, e correlação positiva com proteínas abaixo desse peso molecular (12.9 kDa, 13.9 kDa, 16.36 kDa, 30.74 kDa e 34.07 kDa).

As proteínas 74 (58,0 kDa; pI 5,40) e 80 estavam ausentes apenas nos animais 05 e 79, sendo que ambos apresentaram os maiores resultados para quantidade de espermatozóides vivos reagidos e mortos reagidos; e menores porcentagens de integridade de membrana plasmática (Tabela 2.3).

A proteína 80 pode corresponder à forma germinal da enzima conversora de angiotensina I (gACE), também observada por Jobim et al. (2005) com 98-100 kDa e pI 6,1-6,2. Tal proteína é liberada da membrana espermática assim que o sêmen passa pelo epidídimo, apresenta peso molecular de 105-kDa e é recuperada no fluido da região posterior do caput, mostrando uma mudança para 94 kDa durante o trânsito epididimal e mantendo-se neste peso molecular no fluido caudal e no sêmen (GATTI et al., 1999). Tem sido sugerida que a gACE tem papel na capacitação e na reação de acrossoma (WONG et al., 1990).

As proteínas 35 (22,9 kDa; pI 5,60) , 37 (22,1 kDa; pI 5,90) e 39 (20,1 kDa; pI 6,70) não foram encontradas somente no animal 145, sendo que o mesmo apresentou os menores resultados para a quantidade de espermatozóides mortos reagidos (Tabela 2.3). Essas proteínas parecem estar relacionadas com a viabilidade espermática. Pelo peso molecular e pI encontrados, as proteínas 35, 37 e 39 podem corresponder à prostaglandina D sintetase (PGDS) tipo lipocalina de 26kDa e pI 6,2 que é uma das principais proteínas epididimais em ovinos e foi relacionada à alta fertilidade de reprodutores bovinos e à congelabilidade do sêmen (KILLIAN et al., 1993; JOBIM et al., 2005). Jobim et al. (2005) associaram uma proteína de 21-23 kDa e pI 6,5-6,7 encontrada no plasma seminal ovino à PGDS.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os encontrados por Jobim et al. (2003) onde as amostras de plasma seminal dos reprodutores bovinos de menor congelabilidade apresentaram a banda correspondente a esta proteína com densidade óptica significativamente superior ($P < 0,05$) às amostras dos reprodutores de maior congelabilidade, estando esta proteína presente em 100% das amostras dos reprodutores de menor congelabilidade e somente em 30% das amostras do plasma seminal de reprodutores considerados de maior congelabilidade do sêmen. Entretanto, os resultados deste trabalho discordam dos achados de Roncoletta et al. (2000), que através de eletroforese unidimensional, encontraram 40% a mais desta proteína em reprodutores bovinos com melhor congelabilidade, tendo atribuído este efeito à capacidade da PGDS em participar de modificações de permeabilidade da membrana celular.

O grupo de proteínas 55 (35,5 kDa; pI 5,02), 62 (43,4 kDa; pI 5,30), 63 (44,4 kDa; pI 5,33); 75, 76, 77, 78 e 83 (63-72 kDa; pI 5,0-5,5) só não foi encontrado no animal 05, que apresentou as menores médias para as avaliações de espermatozóides vivos íntegros após descongelamento do sêmen; médias altas de espermatozóides mortos reagidos após descongelamento; e as menores médias nas avaliações de integridade de membrana plasmática; conforme as Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4. Tais proteínas podem estar relacionadas com a manutenção da viabilidade espermática durante o processo de criopreservação e a ausência das mesmas pode resultar em menor congelabilidade do sêmen.

Já a proteína 31 (21,4 kDa; pI 4,75) foi encontrada somente no animal 05 e apresentou alta expressão no mesmo (Figura 2.3), e como citado anteriormente, esse animal apresentou os menores valores de integridade de membrana e espermatozóides vivos íntegros; e alto valor de espermatozóides mortos reagidos no sêmen descongelado. Bianchi et al. (2008) sugeriram que um fator polipeptídico de 26,58kDa está associado à baixa integridade da membrana plasmática do espermatozóide suíno após o congelamento/descongelamento.

Roncoletta (2003) encontrou uma tendência de maior concentração da proteína BSP-A3 (15 kDa e pI 4,8-5,2) no plasma seminal de touros de baixa fertilidade e observou diferença estatística significativa desta proteína no perfil de proteínas de membrana espermática, com maiores concentrações também no grupo de baixa fertilidade.

Avaliando as proteínas 01 (8,0 kDa; pI 4,46), 48 (28,9 kDa; pI 4,30) e 53 (35,7 kDa; pI 4,91) observa-se que o animal que apresentou os maiores valor de IMP, o animal 21, é o único que não possui tais proteínas (Tabela 2.4 e Tabela 2.7 - Anexos).

Já o grupo de proteínas 03 (7,9 kDa; pI 6,35), 23 (13,6 kDa; pI 5,01), 85, 86, 88, 89, 90, 91 e 92 (56-70 kDa; pI 5,5-6,0), foi encontrado somente no animal 21 que apresentou a maior média de IMP. As proteínas 03 e 23 se destacaram devido à alta expressão nesse animal, como pode ser observado nos géis do mesmo (Figura 2.2). Tais proteínas podem estar relacionadas com a integridade de membrana plasmática e com a viabilidade espermática. Quando o espermatozóide é submetido à diminuição de temperatura durante as etapas da criopreservação, ocorre a desestabilização e até mesmo a ruptura da membrana. Elas podem exercer um efeito protetor na integridade da membrana espermática, que é essencial para a manutenção da funcionalidade do espermatozóide e é requerida para a capacitação, reação de acrossoma e penetração no ovócito.

As proteínas 02 (8,5 kDa; pI 5,0-5,5), 17 (11,5 kDa; pI 5,81); 69, 70, 71, 72 e 79 (64-80 kDa; pI 4,5-5,5) não foram encontradas somente nos animais 05 e 271, que apresentaram os menores resultados para IMP.

É possível supor que a maior quantidade destas proteínas citadas e relacionadas com a integridade de membrana no plasma seminal, como observado nos reprodutores com maiores resultados para tal parâmetro neste estudo, poderia conferir maior preservação das propriedades da membrana espermática durante o processo de congelamento do sêmen.

De acordo com suas características de peso molecular e pI, as proteínas 02, 17 e 23 podem fazer parte da família de proteínas BSP A1/A2 ou das clusterinas. O plasma seminal bovino contém uma grande família de proteínas designadas BSP A1/A2, BSP A3 e, BSP 30 kDa (coletivamente chamadas de proteínas BSPs), que se ligam aos espermatozóides durante a ejaculação e potencializam a capacitação (MENTZ et al., 1990; DESNOYERS & MANJUNATH, 1992). Jobim et al. (2005) encontraram dois spots similares às proteínas BSP A1/A2 (16.5 kDa, pI 4.7–5.0 e 16 kDa, pI 4.9–5.2) no plasma seminal de ovinos, um com 18–19 kDa - pI 4.8–5.0 e o outro com 17–18 kDa - pI 5.0–5.2.

Do mesmo modo, de acordo com Villemure et al. (2003), o plasma seminal de bodes contém quatro proteínas, com pesos moleculares de 14 kDa, 15 kDa, 20 kDa e 22 kDa, que são estruturalmente relacionadas com as proteínas da família BSP; e juntamente constituem cerca de 50% do total de proteínas do plasma seminal caprino. De acordo com Majunath et al. (1993), essas proteínas se ligam à membrana espermática promovendo o seqüestro de colesterol, assim tornam a membrana permeável para entrada de cálcio e ativação da fosfolipase A2, promovendo a capacitação dos espermatozóides.

Nauc & Manjunath (2000) observaram uma diminuição significativa (70-80%) na concentração das proteínas BSP ligadas à membrana espermática depois da criopreservação do sêmen, o que indica a ocorrência de modificações na membrana do espermatozóide, durante a congelação, as quais podem alterar as propriedades da membrana, levando à capacitação prematura do espermatozóide após o descongelamento.

A clusterina é uma glicoproteína do plasma seminal que pode prevenir contra o dano oxidativo do espermatozóide, se ligar e aglutinar espermatozóides defeituosos e proteger os gametas masculinos dos efeitos tóxicos da precipitação de proteínas. Está presente no plasma seminal, bem como na superfície da membrana da célula espermática do bovino e do homem (HOWES et al., 1998). Mortarino et al. (1998) seqüenciaram a clusterina do plasma seminal bovino, apresentando peso molecular de 25,35 kDa e pI de 5,54. Em ovinos, já foi relacionada à uma proteína com 21-23 kDa e pI 6,5-6,7 (JOBIM et al., 2005). Tal proteína está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo adesão e agregação celular e maturação espermática (BLASCHUK et al., 1983; SYLVESTER et al., 1991). Tendo em vista sua localização na membrana espermática e seu papel no transporte e redistribuição de lipídeos,

esta proteína poderia apresentar funções biológicas semelhantes às mencionadas para as BSP na proteção da função da membrana espermática no processo da criopreservação do sêmen (JOBIM et al., 2003).

Avaliando os perfis protéicos, também é possível observar uma grande quantidade de proteínas de alto peso molecular que apresentaram relação com a integridade de membrana. Dentre elas, algumas foram encontradas somente no animal 21 e outras só não foram encontradas nos animais com os piores resultados de integridade de membrana (Tabela 2.7 - Anexos).

Observando o dendograma baseado no perfil protéico dos animais (Figura 2.4), nota-se que os animais 145 e 271 foram os mais próximos entre eles. Esses animais também possuem uma mesma origem genealógica, uma vez que são filhos do mesmo reprodutor. O carneiro 79 foi o mais próximo do 145 e do 271 dentre todos os animais estudados e sabe-se que ele é da mesma linhagem dos mesmos. Já os animais 05 e 21 foram os mais distantes entre eles e sabe-se que eles não apresentam nenhuma relação genealógica ente si e entre os demais animais. Tais resultados sugerem uma relação entre o perfil protéico do plasma seminal dos animais e a sua origem genética.

Assim como o observado por Cardozo et al (2006), os resultados sugerem que diversas proteínas no plasma seminal atuam de maneira complementar e que essas proteínas possuem um papel importante na estabilidade da membrana e conseqüentemente, na viabilidade e motilidade espermática.

2.5 CONCLUSÕES

As observações realizadas neste estudo evidenciam a existência de diferenças no perfil protéico de reprodutores com diferentes resultados de criopreservação do sêmen.

Os resultados encontrados indicam que o plasma seminal ovino contém proteínas que estão envolvidas em características fundamentais para a adequada função do espermatozóide e para incrementar sua capacidade de criopreservação. Portanto, podem ser utilizados como subsídio para aumentar a viabilidade da utilização do sêmen ovino congelado para uso na inseminação artificial transcervical nessa espécie.

Sugere-se que as proteínas 31 (21,4 kDa); 03 (7,9 kDa) e 23 (13,6 kDa) podem ser possíveis marcadores da congelabilidade do sêmen. A proteína 31 como indicador protéico da menor congelabilidade do sêmen e as proteínas 03 e 23 como marcadores da maior congelabilidade do sêmen. É importante caracterizar a identidade de tais proteínas por meio de técnicas como seqüenciamento ou uso de antígenos específicos.

A realização de novos estudos e investigações envolvendo as proteínas do plasma seminal é relevante para a caracterização das mesmas no plasma, para a identificação de marcadores da congelabilidade do sêmen e para que as conclusões encontradas neste trabalho sejam confirmadas.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN E.G.; ALVAREZ, LA H.L.; VENTURINO, A; GARDE, J.J. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of Ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, p.1053-1061, 2000.
- AISEN, E.G., QUINTANA, M., MEDINA, V., MORELLO, H., VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, n.3 , p.239-249, 2005.
- AL SOMAI, N.; VISHWANATH, N.; SHANNON, P.E. et al. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.41, p.165-171, 1994a.
- AL-SOMAI, N., VISHWANATH, R., .MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Anionic and Cationic components from protein aggregates in Bovine Seminal Plasma and their effects on sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**, v.39, p. 328-336, 1994b.
- ARAÚJO, P.G. Inseminação intrauterina em ovinos de corte com sêmen congelado. Emprego da via transperitonial por laparoscopia. **Biol. Insem. Art.**, v.7, p.5-10, 1955.
- BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 275-280, 1983.
- BARRIOS, B., PEREZ-PE, R., GALLEGO, M., TATO, A., OSADA, J., MUINO BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**; v. 63: p. 1531-1537. 2000.
- BIANCHI, T.; COLLARES, V.F.; CAMPOS, P.V.; CAVALCANTI, C.; KAEFER, E.K.; CORREA, O.A.; DELLAGOSTIN, T.; LUCIA, J.C.; DESCHAMPS, M.N. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.384-388, 2008.
- BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 15, 2003. Porto Seguro – BA. Anais...Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.
- BLASCHUK, O.; BURDZY, K. e FRITZ, I.B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **Journal Biological Chemical**, v.258, p. 7714-7720, 1983.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.
- CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, p. 841-850, 2006.

- CARNEIRO, G.F.; MEDEIROS, L.R.D.; GOMES NETO, O.C.; PROCÓPIO, O.C.S.; OLIVEIRA, C.K. de. Inseminação artificial e transferência de embriões. **In: Congresso Brasileiro do Santa Inês**, 1, 2005, Maceió - AL. Anais... Maceió: Associação Brasileira do Santa Inês. 2005.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal Biological Chemical**, v. 267, p.10149–55, 1992.
- DIDION, B.A., DOBRINSKY, J.R., GILES, J.R., GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22 (1): p. 51-57, 1989.
- GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 446-454, 1987.
- GATTI, J.L.; DRUART, X.; GUÉRIN, Y.; DACHEUR, F.; DACHEUX, J.L. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE): evidence that sperm are the source of this ACE. **Biology Reproduction**, v. 60, p.937–45, 1999.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HOWES, E.A.; HURTS, S.; LASLOP, A. e JONES, R.. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.673-681, 1998.
- JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R, SALBEGO, C.G, SOUZA, D.O., WALD, V.B., MATTOS, R. C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 31 p. 21-30, 2003.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P.; MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.63, p. 2053–62, 2005.
- KILLIAN, G. J., CHAPMAN, D. A., ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**, v.49, p. 1202-1207, 1993.
- LAUSMANN, C. V., NEVES, J.P., GONÇALVES, P.B.D. Plasma seminal na capacitação espermática em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.3. p.150-157, 2004.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology Reproduction**, v.49, p.27–37, 1993.
- MAXWELL, W. M. C., EVANS, G., MORTIMER, S. T. et al. Normal fertility in ewes after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p.123-126, 1999.
- MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p. 55-65, 1996.
- MENTZ, K.W.; BERGER, T.; CLEGG, E.D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.34, p.691–700, 1990.

- MORAES, J.C.F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.613-619, 2003.
- MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A.; CECILIANI, F.; GOTTARDI, L.; MAFFEO, G. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, v.19, p.797-801, 1998.
- NAUC, V. e 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. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.
- OLLERO, M., GARCIA-LOPEZ, N., PEREZ-PE. Surface changes of ram spermatozoa by absorption of homologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase system. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 381-390, 1997.
- PAGANINI FILHO, P. **Estudo da viabilidade do sêmen ovino frente a três diluentes em temperatura de 37°C e sob refrigeração**. Botucatu, 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p.425-34, 2001.
- RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionadas com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 104f. 2003.
- RONCOLETTA, M., FRANCESCHINI, P.H., LIMA, V. F., 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 doadores da raça gir. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 36, n. 2, 1999 .
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C; FRANCESCHINI, P.H. e RAMOS, P.R.R. Caracterização da proteína 26kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. 28 (Supl): 323. 2000.
- SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.
- SILVA, T.A.S.N., NEVES, J.P., NETO, A.G.G., GUIMARÃES, A.P., RUMPF, R., SARTORI, R. Viabilidade e estado acrossomal do sêmen ovino descongelado e incubado com plasma seminal. **Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – XVI CBRA** Goiânia, 2005.
- SOUZA, C. E.; MOURA, A.; OLIVEIRA, J. T.; RADIS-BAPTISTA, G.; ARAUJO, A.; LIMA, A. Seminal plasma proteins, testis development and sêmen criteria in the ram. **In: 29th Annual Meeting ASA**. 2004. p. 91.
- STRYER, L. Introduction to biological membranes. **Biochemistry**. 3 ed., New York, p. 83-310. 1988.
- SYLVESTER, C.; MORALES, R.; OKO R. e GRISWOLD, M.D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**., v.45, p.195-207, 1991.

- VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH. P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.39–50, 2003.
- WOLFSBERG, T.G.; STRAIGHT, P.D.; GERENA, R.L.; HUOVILA, A.P.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. A widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. **Developmental Biology**, v.169, p.378–83, 1995.
- WONG PYD, UCHENDU CN. The role of angiotensin-converting enzyme in the rat epididymis. **Journal of Endocrinology**, v. 125: p. 457–65, 1990.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Tese de doutorado apresentada em Botucatu, SP, 1998.

2.7 ANEXOS

Tabela 2.6 – Peso Molecular, Ponto Isoelétrico (pI) e Animais que possuem a proteína no plasma seminal.

Proteína	Peso Molecular (kDa)	pI	Animais
01	8,0	4,46	05, 79, 145, 271
02	8,5	5,05	21, 79, 145
03	7,9	6,35	21
17	11,5	5,81	21, 79, 145
21	15,5	4,68	05, 79
23	13,6	5,01	21
31	21,4	4,75	05
35	22,9	5,60	05, 21, 79, 271
37	22,1	5,90	05, 21, 79, 271
39	20,1	6,70	05, 21, 79, 271
48	28,9	4,30	05, 79, 145, 271
49	35,7	4,57	05, 79
53	35,7	4,91	05, 79, 145, 271
55	35,5	5,02	21, 79, 145, 271
62	43,4	5,30	21, 79, 145, 271
63	44,4	5,33	21, 79, 145, 271
69	66,9	4,64	21, 79, 145
70	66,1	4,69	21, 79, 145
71	65,1	4,75	21, 79, 145
72	64,4	4,81	21, 79, 145
74	58,0	5,4	21, 145, 271
75	71,0	5,45	21, 79, 145, 271
76	71,8	5,36	21, 79, 145, 271
77	68,8	5,31	21, 79, 145, 271
78	68,4	5,26	21, 79, 145, 271
79	78,5	5,20	21, 79, 145
80	70,8	5,13	21, 145, 271
83	63,2	5,0	21, 79, 145, 271
85	60,9	5,90	21
86	69,7	5,86	21
87	61,8	5,80	21, 145
88	69,4	5,79	21
89	69,4	5,71	21
90	66,6	5,65	21
91	56,17	5,62	21
92	70,0	5,49	21

Tabela 2.7 - Quantidade de *spots* totais identificados por animal e as diferenças de expressão entre eles.

<i>Animal</i>	<i>Spots</i>																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
05	•			•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	•		•	•	•	•	•			•	•	•	•	•	•	•
21		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
79	•	•				•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•			•	•	•	•	•	•	•
145	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•				•			•	•	•	•	•	•	•
271	•			•	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	•		•			•			•	•	•	•	•	•	•

<i>Animal</i>	<i>Spots</i>																															
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	
05	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
21		•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
79			•	•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
145		•	•								•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
271	•	•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

<i>Animal</i>	<i>Spots</i>																															
	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	
05			•	•	•							•								•	•		•									
21	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
79	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
145	•	•	•	•	•			•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
271	•	•	•	•	•						•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

Spots amarelos – Presentes ou ausentes em apenas um animal.