

ANDRÉ BELICO DE VASCONCELOS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE INIBIDORES DE SERINO
PROTEASE E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA
EQÜINA NOS PROCESSOS DE RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal
Orientador^(a): Dr.^(a) Monique de Albuquerque Lagares

Escola de veterinária da UFMG – Campus da Pampulha, Av. Pres. Antônio Carlos, 6.627
Cep. 31270-901 Caixa Postal 567 – (031) 3499-2229 – Fax (031) 3499-2230
Belo Horizonte, Minas Gerais
Brasil
- 2008 -

V331p Vasconcelos, André Belico de, 1973-
Purificação e caracterização parcial de inibidores de serino protease e sua influência sobre a viabilidade espermática eqüina nos processos de resfriamento e congelamento / André Belico de Vasconcelos. – 2008.
106 p. : il.

Orientadora: Monique de Albuquerque Lagares
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Eqüino – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Criopreservação – Teses. 3. Sêmen Resfriamento – Teses. I. Lagares, Monique de Albuquerque. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926



Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de veterinária

Tese defendida e aprovada em 07 de março de 2008, pela comissão examinadora constituída por:

Eustáquio Resende Bittar

Marc Roger Jean Marie Henry

Marcos Xavier Silva

Monique de Albuquerque Lagares

Olindo Assis Martins Filho

Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte
-2008-

AGRADECIMENTO

- A Professora Dr (a). Monique de Albuquerque Lagares, pela orientação, pela amizade, incentivo.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro, pela confiança, pela atenção, pela amizade e pela colaboração.
- Ao Prof. Dr. Luiz Renato de França, pela atenção, pela amizade, pela disponibilidade.
- Aos meus pais, José Maria de Vasconcelos e Carmen Lúcia Belico de Vasconcelos, pelo amor, carinho, amizade, incentivo, preocupação e principalmente por serem meus pais.
- Aos meus Irmãos Milton, Ana e Evandro.
- A minha namorada, Amanda Pifano Neto Quintal (Bu) pelo apoio, carinho, amizade, compreensão principalmente, nestes momentos finais.
- Aos meus eternos amigos do Laboratório de Enzimologia Físico-Química de Proteínas, Jamil, Jacqueline, Alexandre, Marco Aurélio, Kadíma, Poliana, Denise, Felipe, Marília Gabriela, Ademair entre outros que passaram e que ingressaram no Laboratório durante este período.
- A Prof^(a) e Tia Dr. Anna Edith Bellico da Costa, pelo carinho, atenção.
- Aos Meus irmãos da Escola de Veterinária, Fabiana, Camila, Fernando.
- Aos Professores e colegas da Escola de veterinária da UFMG
- Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho por ceder o laboratório do centro de pesquisa René Rachou e pela orientação e paciência para determinação dos protocolos utilizados para avaliação do sêmen no citômetro de fluxo.
- Aos colegas do centro de pesquisa René Rachou, Marcio, Tisa, Ana Paula, Lisiane e Roberta.
- Aos Meus Avôs, Tios (as), Primo (as), pelo carinho e compreensão.
- Aos Meus Amigos, Wander, Gustav, Eduardo.
- Ao meu sobrinho Thales, Italo e afilhado Gabriel
- Aos animais, pois sem eles nada disso teria sentido.
- E a todas as pessoas que de alguma forma tiveram sua parcela de contribuição na realização do trabalho.
- A Deus

"Sempre que te perguntarem se podes fazer um trabalho, responde que sim e te ponhas em seguida a aprender como se faz." - Franklin Delano Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA	18
1 Estrutura espermática	18
2 Maturação espermática	22
3 Capacitação e Reação espermática	23
4 Plasma seminal	28
4.1 Proteínas do plasma seminal equino	28
4.2 Serino proteases: Aspectos gerais	29
4.3 Inibidores de Serino proteases: Aspectos gerais	30
5. Técnicas de purificação de proteínas	31
5.1 Fracionamento e purificação por precipitação com sulfato de amônio	31
5.2 Cromatografia	32
6 Técnicas de caracterização de proteínas	33
6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida	33
6.2 Espectrometria de massa	33
7 Criopreservação	34
7.1 Criocapacitação	35
7.2 Diferença entre ganhões e ejaculados	36
7.3 Procedimentos utilizados na criopreservação do sêmen equino	36
8 Avaliação espermática	37
8.1 Integridade e funcionalidade da membrana plasmática	38
8.2 Integridade do acrossoma	39
8.3 Indução da reação acrossômica	39
8.4 Avaliação da integridade do DNA	40
CAPÍTULO III - EXPERIMENTOS	41
EXPERIMENTO I - Estudos das proteínas do plasma seminal de animais domésticos utilizando cromatografia de exclusão molecular.	41
1 Introdução	41
2 Material e Métodos	42
2.1 Animais e Coleta do sêmen	42
2.2 Preparo das Amostras	42
2.3 Análise eletroforese (sistema SDS-PAGE)	43
2.4 Cromatografia	43

3	Resultados	43
3.1	Calibração cromatografica	43
3.2	Cromatografia de proteínas plasma seminal eqüino	44
3.3	Cromatografia de proteínas plasma seminal canino	48
3.4	Cromatografia de proteínas plasma seminal caprino	50
4	Discussão	51
5	Conclusão	52
	EXPERIMENTO II – Purificação e caracterização parcial de inibidores de serino protease no plasma seminal eqüino.	52
1	Introdução	52
2	Material e Métodos	53
2.1	Coleta de sêmen, purificação e preparo de amostras protéicas	53
2.2	Método analítico cinético e atividade enzimática	53
2.3	Análise cromatografica	53
2.4	Espectrometria de massa	54
3	Resultados	54
3.1	Atividade enzimática	54
3.2	Regressão entre concentração de proteínas e idade do garanhão	55
3.3	Cromatografia de exclusão molecular em superose 12 – Proteínas do plasma seminal tratado com sulfato de amônio	56
3.4	Cromatografia líquida de alta pressão (RP-HPLC) em C ₁₈ – inibidores de serino protease	58
3.5	Espectrometria de massa	59
4	Discussão	59
5	Conclusão	60
	EXPERIMENTO III - Efeito da adição de inibidores de serino protease ao diluidor de resfriamento e congelamento do sêmen eqüino.	60
1	Introdução	60
2	Material e Métodos	61
2.1	Coleta e avaliação do sêmen eqüino	61
2.2	Meios	61
2.3	Delineamento experimental	61
2.3.1	Procedimento 1. Resfriamento do sêmen eqüino	61
2.3.2	Procedimento 2. Congelamento do sêmen eqüino	63
2.4	Avaliação pós-descongelamento	65

3	Resultados	69
3.1	Avaliação do sêmen	69
3.1.1	Procedimento 1. Resfriamento do sêmen equino	69
3.1.2	Procedimento 2. Congelamento do sêmen equino	71
4	Discussão	76
5	Conclusão	79
	CAPÍTULO IV - Sugestões e Recomendações	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
	Anexo I – Protocolo de preparo do gel de gradiente	91
	Anexo II – Meio de diluição e Congelamento	92
	Anexo III – Protocolo para coloração espermática CFDA e PI (microscopia de fluorescência)	93
	Anexo IV – Protocolo para coloração PNA/PI (Citometria de fluxo)	94
	Anexo V – Protocolo para coloração Azul de tripan (Citometria de fluxo)	95
	Anexo VI – Protocolo para coloração DNA com acridie orange (Citometria de fluxo)	96
	Anexo VII – Protocolo de titulação do ionóforo de cálcio (Citometria de fluxo)	97
	Anexo VIII – Protocolo de reação acrossômica induzida (Citometria de fluxo)	98
	Artigo – Purification and partial characterization of proteinase inhibitors from seminal plasma	99

LISTA DE TABELAS

	EXPERIMENTO I - Estudos das proteínas do plasma seminal de animais domésticos utilizando cromatografia de exclusão molecular.	
Tabela 1	Valores dos tempos de retenção das proteínas cromatografadas por cromatografia de exclusão molecular dos seis garanhões estudados.	46
Tabela 2	Determinação relativa de proteínas do plasma seminal equino, dos quatro tempos de retenção após cromatografia de exclusão molecular.	46
Tabela 3	Concentração protéica de picos cromatográficos de onze ejaculados de um mesmo garanhão, com quatro tempos de retenção específicos, durante a estação de monta de (2004 a 2005).	47
Tabela 4	Valores da estimativa de proteína total e dos tempos de retenção das amostras de plasma seminal canino.	49
Tabela 5	Determinação relativa de proteínas do plasma seminal canino, dos três picos após cromatografia de exclusão molecular.	49

Tabela 6	Valores dos picos de Retenção das amostras de plasma seminal caprino.	50
Tabela 7	Determinação relativa de proteínas do plasma seminal caprino, dos cinco picos após cromatografia de exclusão molecular.	50
EXPERIMENTO II – Purificação e caracterização parcial de inibidores de serino protease no plasma seminal eqüino.		
Tabela 1	Concentração de proteína total e de inibidor presente no plasma seminal eqüino de diferentes idades.	56
Tabela 2	Caracterização da fração F1, obtida pela cromatografia em fase reversa HPLC, de todos os animais.	59
Tabela 3	Massa molecular dos inibidores de Serino protease da fração F1 detectadas por espectrometria de massa (ESI-MS) nos diferentes animais.	59
EXPERIMENTO III. Efeito da adição de inibidores de serino protease ao diluidor de resfriamento e congelamento do sêmen eqüino.		
Tabela 1	Característica espermática do sêmen fresco de ejaculados de seis animais.	
Tabela 2	Parâmetros de avaliação das etapas do processo de resfriamento no grupo controle (Um ejaculado de seis animais n=6).	69
Tabela 3	Avaliação das porcentagens de motilidade progressiva e total, vigor, membrana plasmática íntegra (CFDA/PI) do sêmen resfriado (5 ⁰ C).	71
Tabela 4	Avaliação da motilidade progressiva e total, vigor e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) dos espermatozóides eqüino pós-descongelamento.	72
Tabela 5	Porcentagem de espermatozóides pós-descongelamento, com membrana plasmática íntegra avaliada com Iodeto Propídio (IP) e Azul de Tripán (AT) pré (Pré-RAI) e pós indução da reação acrossômica (Pós-RAI).	73
Tabela 6	Porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra e acrossoma não íntegro após diferentes tempos e temperaturas de incubação com o ionóforo de cálcio A23187.	74
Tabela 7	Porcentagem de espermatozóides pós-descongelamento com membrana acrossômica íntegra, e acrossoma não intacto e intacto pré a indução (Pré-RAI) e pós a indução da reação acrossômica (Pós-RAI) com o ionóforo de cálcio A23187, do número total de espermatozóides.	74
Tabela 8	Taxa de reação acrossômica (RA) do total de espermatozóides pós-descongelamento com membrana plasmática íntegra pré a indução (Pré-RAI) e pós a indução da reação acrossômica (pós-RAI).	75
Tabela 9	Valores Médios (\pm SD) dos índices de fragmentação do DNA do espermatozóide eqüino pós-congelamento.	76

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Morfologia do espermatozóide eqüino.	19
Figura 2	Estrutura da cromatina do espermatozóide.	20
Figura 3	Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido”.	22
Figura 4	Seqüência dos processos pelos quais os espermatozóides são submetidos no trato genital feminino.	23
Figura 5	Adesão de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática.	24
Figura 6	Mecanismo da capacitação em espermatozóides bovinos.	25
Figura 7	Seqüência da capacitação espermática.	26
Figura 8	Seqüência da reação acrossômica.	27
Figura 9	Representação esquemática de uma separação cromatográfica.	32
Figura 10	Representação esquemática das mudanças físicas no espermatozóide eqüino durante o congelamento.	35

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III - EXPERIMENTOS

EXPERIMENTO I. Estudos das proteínas do plasma seminal de animais domésticos utilizando cromatografia de exclusão molecular.

Figura 1	Resultado da calibração da coluna de gel filtração.	44
Figura 2	Eletroforese, gel SDS-PAGE gradiente 5 a 20% de acrilamida, das amostras de plasma seminal de seis garanhões.	45
Figura 3	Perfil cromatográfico típico das amostras de proteínas do plasma seminal eqüino.	45
Figura 4	Eletroforese SDS-PAGE gradiente 5 a 20% de acrilamida das doze frações coletadas após cromatografia de exclusão molecular.	47
Figura 5	SDS-PAGE gradiente de 5 a 20% de acrilamida das amostras de proteínas do plasma seminal canino após tratamento com sulfato de amônio	48
Figura 6	Cromatograma em Gel filtração das proteínas do plasma seminal Canino.	48
Figura 7	Eletroforese SDS-PAGE gradiente de 5 a 20% de acrilamida das amostras de plasma seminal caprino sem tratamento de sulfato de amônio.	50
Figura 8	Cromatograma em gel filtração das proteínas do plasma seminal caprino.	51

EXPERIMENTO II – Purificação e caracterização parcial de inibidores de serino protease no plasma seminal eqüino.

Figura 1	Percentual de inibição da tripsina bovina pelos diferentes inibidores de serino protease.	55
Figura 2	Regressão entre concentração de proteína total do plasma seminal e a idade de garanhão.	55
Figura 3	Cromatografia líquida de baixa pressão (FPLC) das proteínas seminais do garanhão.	56
Figura 4	Porcentagem de inibição das 15 frações, de proteínas do plasma seminal dos seis garanhões	57
Figura 5	Cromatografia líquida de alta pressão- fase reversa (RP-HPLC).	58

EXPERIMENTO III. Efeito da adição de inibidores de serino protease ao diluidor de resfriamento e congelamento do sêmen eqüino.

Figura 1	Fluxograma do protocolo de resfriamento do sêmen eqüino	62
Figura 2	Fluxograma do protocolo de congelamento do sêmen eqüino.	64
Figura 3	Representação gráfica de distribuição pontual seleção do espermatozóide eqüino, pós-decongelamento.	66
Figura 4	Gráficos representativos de distribuição pontual dos espermatozoides eqüino, pós-decongelamento, com os corantes IP <i>versus</i> PNA-FITC.	67
Figura 5	Dot plots representativo das células espermáticas com variação dos níveis de fragmentação da cromatina.	68
Figura 6	Curva de resfriamento do sêmen eqüino (240 minutos).	70
Figura 7	Curva de resfriamento para o congelamento do sêmen eqüino (50 minutos).	71

LISTA DE REAGENTES

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio	Merck
CFDA	Carboxifluoresceína- diacetato	Sigma
PI	Iodeto de Propídio	Sigma
PNA-FITC	Conjugado de Lectina de <i>Arachis Hypogaea</i>	Sigma
	Cálcio ionóforo A23187	Alomone Labs
AO	Acridine Orange	Sigma
NaCl	Cloreto de cálcio	Sigma
Tris	Cloridrato de trihidroxiaminometano	Sigma
(C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n)	Triton x 100	Sigma
	EDTA Disodiun	Sigma
HCl	Acido clorídrico	Sigma
C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico	Sigma
	Azul de tripan	Merck
TFA	Ácido trifluoracético	Sigma
CH ₂ CHCONH ₂	Acrilamida	Merck
DMSO	Dimetilsulfóxido	Merck
DLBAPNA	-N-alpha-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide	Sigma
	Tripsina	Sigma
	Berenil	Sigma
	Benzamidina	Sigma
	Aprotinina	Sigma
	Álcool Desidrogenase	Sigma
	Anidrase Carbônica	Sigma
	Albumina Bovina	Sigma
	β-Amilase	Sigma

RESUMO

A criopreservação de sêmen oferece grandes vantagens para os programas de reprodução eqüina, promovendo ganho genético. No entanto, a criopreservação reduz a qualidade espermática devido principalmente a alterações das membranas espermáticas semelhante às que ocorrem durante a capacitação espermática. A utilização de proteínas do plasma seminal no processo de criopreservação poderia minimizar os efeitos deletérios sobre o espermatozóide. Principalmente, dos efeitos resultantes da ação do processo de criopreservação tornando-se de grande valia para o melhoramento da qualidade do espermatozóide eqüino resfriado e pós-congelamento. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: Identificar procedimentos preventivos para os efeitos deletérios da criopreservação, investigar a eficácia da técnica de cromatografia de exclusão molecular no estudo de proteínas do plasma seminal de mamíferos, isolar e identificar a presença de inibidores de serino proteases no plasma seminal eqüino, explorar comparativamente os inibidores naturais e sintéticos de serino protease quanto á sua atividade inibitória no mecanismo enzimático da serino protease (tripsina-bovina), introduzir inibidores naturais e sintéticos de serino proteases no meio diluidor de congelamento e resfriamento do sêmen eqüino, avaliar as qualidades morfométricas do espermatozóide eqüino através da citometria de fluxo e comparar a eficiência do Azul de Tripán e do Iodeto de Propídio na avaliação da integridade física do espermatozóide eqüino através da citometria de fluxo. Foram realizados três experimentos distintos. O primeiro destes experimentos testou a aplicação da técnica de cromatografia de exclusão molecular na identificação das proteínas do plasma seminal de três diferentes espécies animais: eqüina canina; caprina. Encontraram-se evidências de a cromatografia de exclusão molecular seja um procedimento satisfatório para identificação das proteínas do plasma seminal. O segundo experimento isolou, identificou e avaliou o inibidor de serino protease presente no plasma seminal eqüino e seu potencial de inibição. Também explorou comparativamente os inibidores naturais e sintéticos de serino protease quanto á sua atividade inibitória, avaliou a correlação entre concentração total de proteína e de inibidor de serino protease do plasma seminal com a maturidade sexual dos garanhões. Foram identificadas proteínas ativas com uma massa de molecular de 6.3-7.0 kDa usando espectrometria de massa. Os garanhões mais velhos mostraram uma redução na concentração total de proteína do plasma seminal, mas mantiveram a concentração dos inibidores de serino proteinase com diferença não significativa entre as médias. Também foram encontrados diferentes isoformas do inibidor de serino proteinase no sêmen de todos os garanhões. O terceiro experimento verificou o efeito da adição dos inibidores de serino protease ao meio de resfriamento e de congelamento do sêmen eqüino. Não houve diferença significativa

entre o controle e os grupos tratados quanto à porcentagem de espermatozóide com motilidade progressiva, membrana plasmática funcional, integridade de membrana plasmática, acrossoma intacto e fragmentação de DNA. Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados, depois da indução da reação de acrossômica com Cálcio Ionóforo A23187, sugerindo que os inibidores de serino protease não bloquearam a capacitação e reação acrossômica. Foi possível comprovar a eficácia dos dois cromóforos Azul de Tripán e Iodeto de Propídio na avaliação da integridade física do espermatozóide eqüino por meio de citometria de fluxo. A utilização de um corante com um valor mais baixo como o Azul de Tripán torna-se de grande valia aos estudos da avaliação do espermatozóide eqüino, proporcionando uma redução do custo da técnica na citometria de fluxo. A técnica de cromatografia de exclusão molecular apresentou pontos importantes para purificação de proteínas do plasma seminal de mamíferos; foi possível isolar e identificar a presença de inibidores de serino proteases no plasma seminal eqüino, além de se observar que esses apresentam isoforma; o potencial de inibição dos inibidores naturais de serino proteases é similar ao dos inibidores sintéticos. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre o controle e os grupos experimentais quanto à ação dos inibidores na melhoria da qualidade do espermatozóide eqüino criopreservado. Recomendam-se novos estudos sobre a formação das isoformas, os mecanismos de interação do peptídeo com as células espermáticas, determinação do N-terminal e a adição de doses maiores do inibidor de serino protease em meios contendo diferentes crioprotetores.

Palavra chave: Espermatozóide eqüino; Inibidores de serino protease, Congelamento; Resfriamento.

ABSTRACT

Semen cryopreservation offers great advantages to equine reproduction programs by bringing genetic gain to them. Cryopreservation, however, reduces the quality of sperms due mainly to changes in sperm membranes similar to those which occur during sperm capacitation. Using seminal plasma proteins in the cryopreservation process may minimize deleterious effects on spermatozoa resulting from the action of cryopreservation process, making it valuable to improve the quality of equine spermatozoa both frozen and post-freezing. Thus, the purposes of this work were: identifying preventive procedures of deleterious effects from cryopreservation, investigating the effectiveness of molecular exclusion chromatography in the study of seminal plasma proteins in mammals, isolating and identifying the presence of serine protease inhibitors in equine seminal plasma, exploring comparatively natural and synthetic serine protease inhibitors as for their inhibiting activity in serine protease (bovine trypsin) enzymatic mechanism, introducing natural and synthetic inhibitors of serine protease in a diluting medium to freeze and thaw equine semen, assessing equine spermatozoa morphometric qualities with flow cytometry and comparing the effectiveness of trypan blue and propidium iodide when assessing equine spermatozoa physical integrity with flow cytometry. Three distinct experiments have been performed. The first of these experiments tested the technical application of molecular exclusion chromatography to identify seminal plasma proteins from three different animal species: equine, canine and caprine. According to evidence, molecular exclusion chromatography has been found to be an effective procedure to identify seminal plasma proteins. The second experiment has isolated, identified and evaluated serine protease inhibitor which is present in equine seminal plasma and its inhibiting potential. It has also explored comparatively natural and synthetic serine protease inhibitors as for their inhibiting activity, assessed the correlation between total protein concentration and serine protease inhibitor concentration of seminal plasma with sexual maturity in stallions. Active proteins have been identified to have a molecular mass of 6.3-7.0 kDa using mass spectrometry. Older stallions have shown a reduced total protein concentration of seminal plasma, but have maintained the concentration of serine protease inhibitors with a significant difference between means. Different serine protease inhibitor isoforms have been found in the semen of all stallions. The third experiment has verified the effect of adding serine protease inhibitors to the freezing and thaw medium of equine semen. There was no significant difference between control and treated groups as for the percentage of spermatozoa with progressive motility, functional plasma membrane, plasma membrane integrity, and intact acrosome and DNA fragmentation. No significant difference has been observed between control and treated groups, after inducing acrosome reaction with ionophore calcium A23187, suggesting that serine protease inhibitors do

not block acrosome capacitation and reaction. It enabled comparing the effectiveness of two chromophores, Trypan blue and propidium iodide when assessing equine spermatozoa physical integrity by means of flow cytometry. The use of a staining with a lower value than Trypan blue has become very valuable in studies assessing equine spermatozoa, producing a cost reduction in the flow cytometry technique. The chromatography technique of molecular exclusion has presented important points to purify mammals' seminal plasma proteins; making it possible to isolate and identify the presence of serine protease inhibitors in equine seminal plasma, in addition to noting that they present isoforms. The potential to naturally inhibit serine proteases is similar to that of synthetic inhibitors. Nevertheless, no significant difference has been observed between control and experimental groups as for the action of inhibitors on improving the quality of cryopreserved equine spermatozoa. Further studies on isoform generation, peptide interactive mechanisms with sperm cells, determining N-terminal and adding larger doses of serine protease inhibitor in media containing different cryoprotectants are recommended.

Key Words: Equine sperm; Serine-protease inhibitors; Seminal plasma; Thawing; Freezing

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen oferece grandes vantagens para os programas de reprodução equina, promovendo ganho genético. No entanto, a criopreservação reduz a longevidade espermática devido principalmente a alterações das membranas espermáticas semelhante às que ocorrem durante a capacitação espermática.

Entre os mecanismos de capacitação podemos citar a ação de proteínas da família das serino proteases, como a acrosina (protease) sintetizada por uma pró-acrosina e ativada pela β -acrosina durante a reação acrossômica. Serino proteases encontradas na membrana plasmática promovem a dissolução da matriz acrossômica durante a reação acrossômica favorecendo a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do ovócito. No entanto, estas são moduladas por inibidores de serino proteases presentes no plasma seminal.

A utilização de proteínas do plasma seminal no processo de criopreservação, poderia minimizar os efeitos deletérios sobre o espermatozóide resultantes da ação do processo de criopreservação tornando-se de grande valia para o melhoramento da qualidade do espermatozóide equino resfriado e pós-congelamento.

Portanto, a utilização de inibidores de serino protease incluídos ao meio diluidor de sêmen equino seria um procedimento para minimizar os efeitos deletérios decorrente da criopreservação.

Estudos foram realizados com os inibidores sintéticos no controle do processo de fertilização. No entanto, não foi avaliada a possível ação destes no ejaculado e na criopreservação. Assim, este estudo busca esclarecer o mecanismo do inibidor de serino protease “in vitro” e dos efeitos na criopreservação do sêmen equino. Por outro lado, neste trabalho avançamos a investigação pesquisando o efeito dos inibidores naturais e comparando-os com os inibidores sintéticos sobre o mecanismo

enzimático da serino protease (tripsina-bovina). Dentre estes aspectos é relevante ressaltar que possivelmente, os inibidores sintéticos utilizados como princípio ativo no controle de doenças poderiam estar atuando sobre o processo reprodutivo. Embora não tenhamos investigado esse efeito apontamos que esta poderia ser outra linha de investigação promissora.

Este trabalho se torna inovador também como estudo biotecnológico pela agregação de inibidores de serino proteases, naturais e sintéticos, aos meios de criopreservação possibilitando a comparação entre estes. Inova ainda, por iniciar uma linha de pesquisa que lida não com melhoramento de organismos (garanhões), e sim, com melhoramento das condições de preservação do sêmen e seu poder de fertilização.

Os objetivos deste estudo foram:

- Identificar procedimentos preventivos para os efeitos deletérios da criopreservação,
- Investigar a eficácia da técnica de cromatografia de exclusão molecular no estudo de proteínas do plasma seminal de mamíferos,
- Identificar a presença de inibidores de serino proteases no plasma seminal equino,
- Isolar o inibidor de serino protease no plasma seminal equino,
- Explorar comparativamente os inibidores naturais e sintéticos de serino protease quanto á sua atividade inibitória no mecanismo enzimático da serino protease (tripsina-bovina),
- Introduzir inibidores naturais e sintéticos de serino proteases no meio diluidor de congelamento e resfriamento do sêmen equino,
- Avaliar as qualidades fenotípico e funcional do espermatozóide equino através da citometria de fluxo,
- Comparar a eficiência do Azul de Tripán e do Iodeto de Propídio na avaliação da integridade física do

espermatozóide equino através da citometria de fluxo.

A melhoria da qualidade do sêmen equino criopreservado se constitui um desafio para a biotecnologia da reprodução. As tecnologias de congelamento e resfriamento do sêmen, embora, amplamente utilizadas apresentam efeitos deletérios para o espermatozóide, tanto para a estrutura das membranas espermáticas quanto para os processos bioquímicos e fisiológicos da célula espermática.

A causa primária dos danos celulares pelo congelamento é a desestabilização da membrana plasmática devido ao estresse térmico, mecânico, químico e osmótico (Parks e Graham, 1992), favorecendo um processo de capacitação prematura. As membranas respondem a alterações de temperatura através de transição da fase lipídica (Watson, 1995; Watson, 2000; Meyers et al., 2003).

Por outro lado, cabe salientar que a integridade da cromatina espermática, importante fator na fertilização e desenvolvimento embrionário também pode ser afetada pela temperatura e pelo meio de criopreservação (Evenson et al, 1980; Morris et al 2002).

A identificação de tecnologias que venham a reduzir tais danos e melhorar as condições de criopreservação se torna relevante do ponto de vista biotecnológico.

O papel dos inibidores de serino proteases tem sido investigado, sobretudo, para o estudo dos mecanismos de reação acrossômica cruciais no processo de fertilização. Considera-se que esta relação relacionada, principalmente, à eficiência catalítica da enzima do tipo tripsina, acrosina, na bioquímica da reação acrossômica (Penha-Silva 1989; Perreault, 1982), atuando na vesiculação da membrana e/ou na dispersão da matriz na reação acrossômica (Fraser, 1982; Perreault, 1982; Arboleta e Gerton, 1988). Também é reportado que o inibidor de serino protease inativa proteinases do tipo tripsina da

membrana plasmática do espermatozóide, do epidídimo, na região do flagelo, regulando a atividade de adenilato ciclase (Okamura et al., 1990).

A despeito do efeito bloqueador identificado dos inibidores das serino proteases nos processos de fertilização, em suínos, porco da índia e ratos (Fraiser, 1982; Perreault et al, 1982; Okamura, 1990) não se tem registro de seu uso em procedimentos de criopreservação de sêmen de mamíferos. Portanto, torna-se de grande interesse a investigação do uso da adição dos inibidores de serino proteases aos meios de criopreservação avaliando-se os efeitos deste procedimento na preservação do espermatozóide equino.

Neste contexto biotecnológico as seguintes hipóteses poderiam ser formuladas:

- A utilização da adição de inibidores de serino proteases aos meios de criopreservação reduziria alguns dos efeitos deletérios decorrentes desta tecnologia. Esta adição poderia ser uma estratégia de prevenção destes efeitos.
- A utilização de inibidores sintéticos de potencial de inibição diferente resulta em níveis diferentes de redução dos efeitos deletérios da criopreservação, ligados a fatores bioquímicos.

CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

1. Estrutura espermática

Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos apresentando-se como células alongadas (Garner e Hafez 2004). São constituídos de uma cabeça, uma cauda unidos pelo colo e uma membrana plasmática que cobre toda a célula (Eddy e O'Brien, 1994; Mortimer, 1997).

A morfologia do espermatozóide é bem característica no que diz respeito às estruturas e suas funções (Figura 1). A cabeça apresenta forma oval e achatada, e acomoda o núcleo (Barth, 1989), que contém cromatina altamente condensada. A cromatina da espermatogônia até a espermatíde arredonda é semelhante a das células somáticas, a qual é constituída de histonas, proteínas complexadas ao DNA formando os nucleossomos

(Kornberg, 1974; Evenson, 1999) (Figura 2). A microscopia eletrônica da cromatina do espermatozóide de mamífero mostra uma mudança na organização da cromatina a partir das espermatídes arredondadas uma vez que os nucleossomos são substituídos por fibrilas.

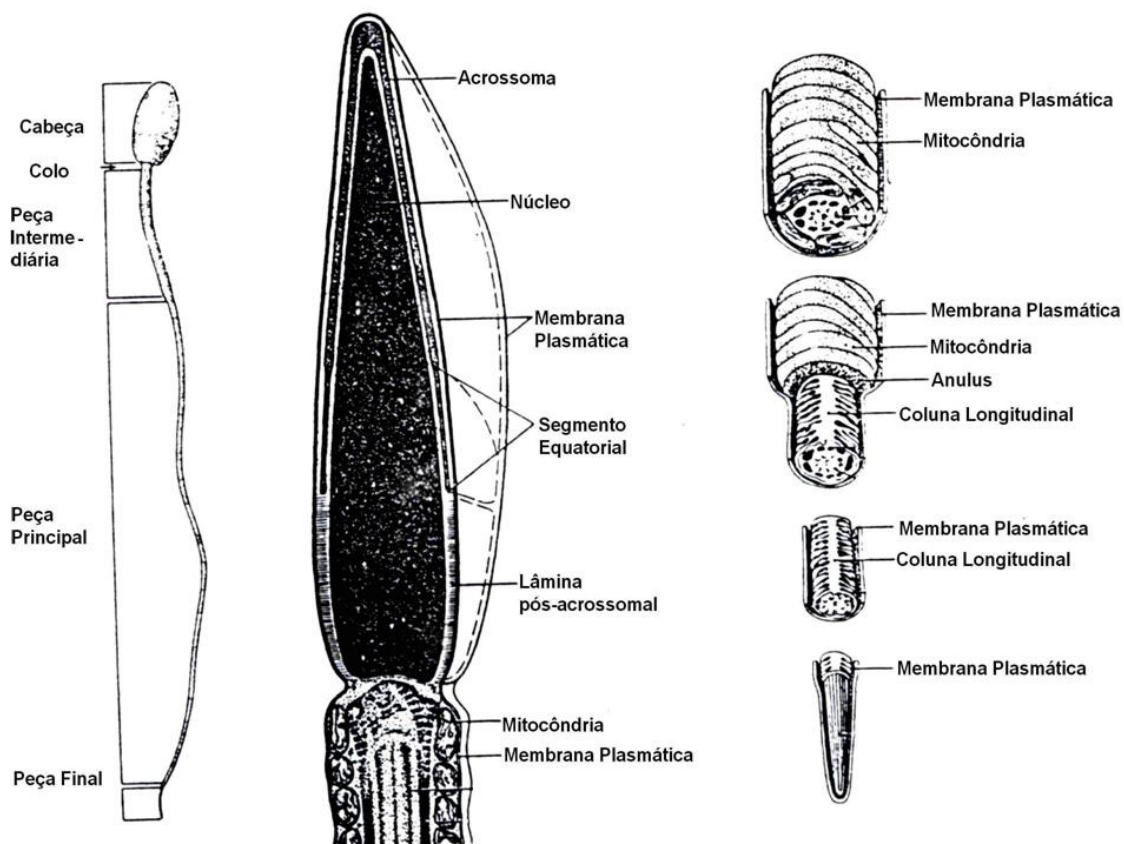


Figura 1. Morfologia do espermatozóide equino (Amann e Pickett, 1987).

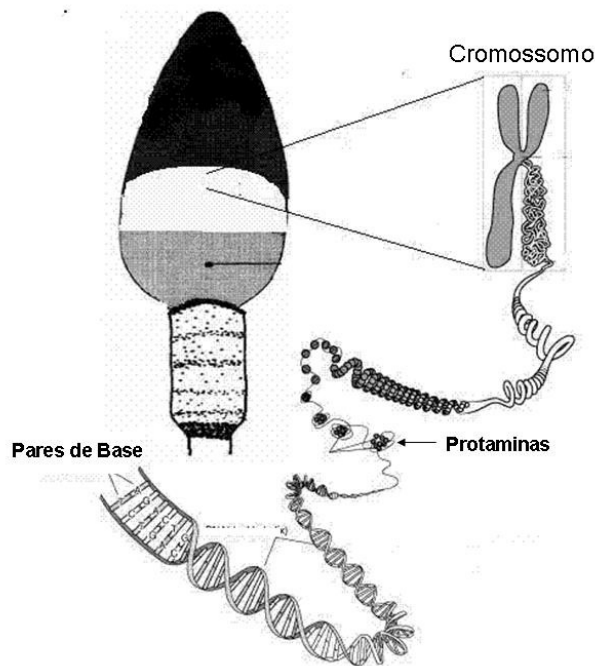


Figura 2. Estrutura da cromatina do espermatozóide (criado por Vasconcelos - Programa paint Windows xp)

A agregação destas fibrilas favorece a uma formação mais densa que é em grande parte o resultado da interação do DNA do espermatozóide com as protaminas (Loir et al., 1985). Desta forma, as mudanças visíveis na organização da cromatina do espermatozóide são a substituição das histonas por protaminas, as quais são responsáveis pela condensação final e estabilização da cromatina espermática (Steger, 1999; Kierszenbaum, 2001).

Na porção anterior do núcleo, está localizado o acrossoma que é uma estrutura derivada do Complexo de Golgi e formada durante a espermiogênese. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (Eddy e O'Brien, 1994; Hafez, 1995). O acrossoma é constituído de duas membranas interna e externa e o conteúdo acrossômico (Figura 1). Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas liberando o conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozóide com o ócito (Flesh e Gadella, 2000).

A cauda é conectada a cabeça por meio do colo e dividida em peça intermediária, principal e terminal, todas envolvidas pela membrana plasmática. O colo ou peça de conexão forma uma placa que se ajusta dentro de uma depressão na superfície do núcleo (Eddy e O'Brien, 1994). A peça intermediária, localizada entre o colo e o annulus, juntamente com o comprimento total da cauda, formam o axonema (Hafez, 1995). Na peça intermediária existe um grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, possuindo a função de produzir energia necessária para a motilidade espermática (Eddy e O'Brien, 1994). O axonema, uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (Alberts, 2004), é um dos elementos envolvidos no mecanismo de motilidade espermática. Este apresenta nove pares de microtúbulos periféricos além da presença de um par central. Para ação direta deste movimento a dineína e a tubulina utilizam adenosina trifosfato (ATP), o qual é produzido através das mitocôndrias presentes na peça intermediária (Hafez, 1995).

A membrana plasmática envolve todo o espermatozóide, define os seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (Amann e Graham, 1992; Alberts et al., 2004). A membrana plasmática é formada por duas camadas lipídicas, contendo moléculas de fosfolipídios polares, distribuídas assimetricamente, e propriedades anfipáticas, todas orientadas de maneira que a porção hidrofílica se dirige para a superfície da membrana (Flesch e Gadella, 2000).

A membrana plasmática do espermatozóide eqüino é formada por fosfolipídeos (57%), colesterol (37%) e glicolipídios (6%). Os lipídios de membrana mais abundantes são os fosfolipídios, predominantemente, fosfocolineglicerídeos (48%), fosfoetanolaminaglicerídeos (16%), esfingomiéline (13%), fosfatidilserina (15%), fosfatidilglicerol (5%) e fosfatidilinositol (3%) (Gadella et al., 2001). As diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade das moléculas de fosfolipídios em se agrupar, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (Alberts et al., 2004). O padrão definitivo de lipídeos dos espermatozoides do ejaculado só é estabelecido após sua maturação epididimária (Holt e North, 1984; Watson, 1995; Lenzi et al., 1996).

A proporção colesterol/fosfolipídio no espermatozóide eqüino é 0,36, valor intermediário quando comparado com valores de espermatozoides suíno e bovino (Amann e Graham, 1992; Parks e Graham, 1992). O colesterol atua estabilizando a membrana plasmática. Sabe-se que a proporção colesterol: fosfolipídios, bem como a natureza das cadeias de ácidos graxos saturados ou insaturados determina a fluidez da membrana plasmática. Conforme Amann e Pickett (1987) os espermatozoides da espécie eqüina são mais sensíveis ao

choque térmico durante a redução da temperatura porque possuem relativamente pouco colesterol na sua membrana plasmática. Espécies que possuem espermatozoides mais resistentes ao congelamento como os do homem, apresentam 70% de colesterol na membrana plasmática. Os glicolipídios estão localizados na superfície da membrana, enquanto que o colesterol preenche espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios, estabilizando a membrana (Squires et al., 1999; Parks e Graham, 1992).

As membranas espermáticas são compostas de proteínas (integrals e periféricas), as quais estão entremeadas aos fosfolipídios (Figura 3) (Amann e Pickett, 1987; Hafez, 1995), desempenhando a maioria das funções específicas da membrana (Alberts et al., 2004).

Segundo Amann e Graham (1992), embora uma grande parte das proteínas sejam histonas envolvidas no acondicionamento de DNA, outras estão envolvidas com enzimas do acrossoma, receptores da Membrana Plasmática, elementos relacionados à funcionalidade da membrana (transporte de íons e carboidratos) e estruturas do citoesqueleto (forma da cabeça e provendo os filamentos da cauda).

As proteínas de membrana são estruturas covalentes unidas, termodinamicamente estáveis e metabolicamente ativas. A maioria destas é componente integral, interagindo com os fosfolipídios e são freqüentemente globulares e anfipáticas. As proteínas periféricas não interagem diretamente com os fosfolipídeos da bicamada, mas estão, ao invés disso, unidas através de ligações fracas nas regiões hidrofílicas das proteínas integrais específicas da membrana e se desfazem em pH extremo em alta concentração de sal (Singer e Nicolson, 1972).

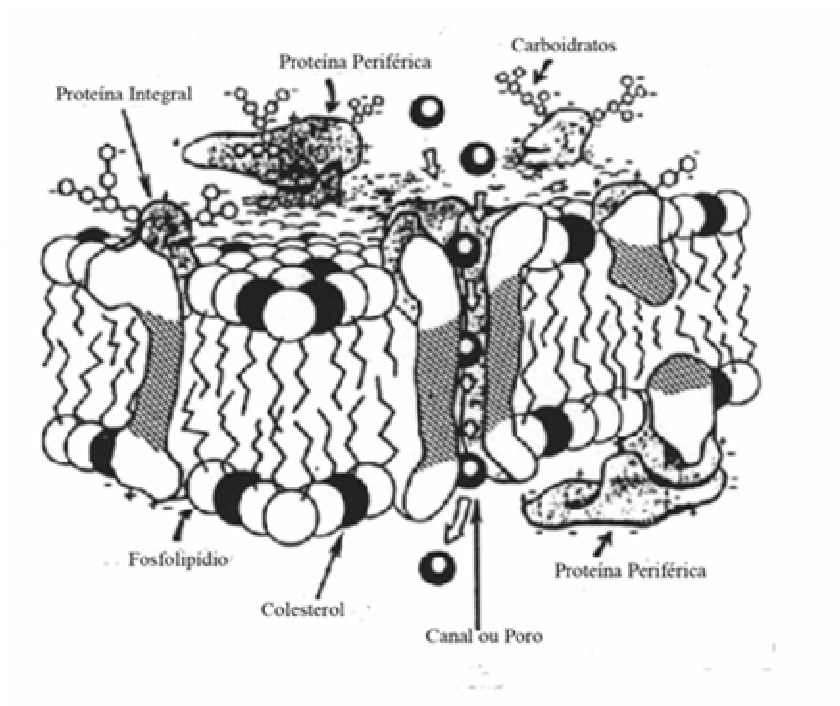


Figura 3. Organização da membrana plasmática modelo “mosaico fluido” (Zafian, 1984).

As proteínas integrais são chamadas transmembrana, por se apresentarem inseridas na bicamada de lipídios, desta forma apresentam porções expostas para os dois lados da membrana. As proteínas integrais servem como poros ou canais de membrana, receptores para íons e outras moléculas, como glicídios sendo denominadas de glicoproteínas (Squires et al., 1999; Amann e Graham, 1992). Essas proteínas podem ser liberadas por tratamentos que rompem a bicamada de fosfolipídios (Singer e Nicolson, 1972).

A manutenção do estado líquido dos lipídeos e das proteínas de membrana permite a movimentação livre dos componentes, o que garante que os mesmos se interagem (Hammersted et al., 1990). Essas interações são a base para ordenar os domínios na membrana, resultando na compartimentalização da membrana plasmática: a manutenção desses domínios é essencial para a funcionalidade espermática (Parks e Graham, 1992).

2. Maturação espermática

Para constituição funcional das membranas do espermatozóide é necessário que as células espermáticas sofram o processo denominado maturação espermática, o qual acomete os espermatozóides durante o trânsito pelo epidídimo. Durante a maturação epididimária, os lipídios de membrana sofrem alterações de carácter físico e químico (Yanagimachi, 1994). Nesta fase, as proteínas periféricas sofrem uma variabilidade protéica que pode estar relacionada ao processo de maturação sexual (Strzezek et al., 2005), favorecendo a formação de diferentes isoformas que podem ser criadas durante o processo de transdução e transcrição de proteínas, durante a maturação espermática (Hachey e Chaurand, 2004). Quando os espermatozóides têm sua maturação completa, algumas proteínas envolvem a cabeça do espermatozóide e outras são distribuídas no acrossoma. Essas proteínas estabilizam a membrana prevenindo uma capacitação e reação acrossômica prematura (Yanagimachi, 1994). Nesta fase ocorre a eliminação de grande parte do citoplasma que é deslocado

para peça intermediária formando a gota citoplasmática (Oliveira et al., 2006), finalizando assim, o processo de maturação espermática.

3. Capacitação e Reação Acrossômica

Os espermatozoides maturados no epidídimo são capazes de se mover ativamente, contudo, são incapazes de fecundar oócitos, sem que antes sofram algumas modificações no trato reprodutivo feminino (Amann e Graham, 1992; Delpech

e Thibault, 1993; Bedford et al., 2003; Gadella e Colenbrander, 2003). Esse processo é denominado capacitação espermática (Delpech e Thibault, 1993; Bazer et al., 1995; Senger, 2003). O principal local de capacitação parece ser a tuba uterina, especificamente a região do istmo (Bazer et al., 1995), não sendo um processo espécie-específico (Delpech e Thibault, 1993) (Figura 4).

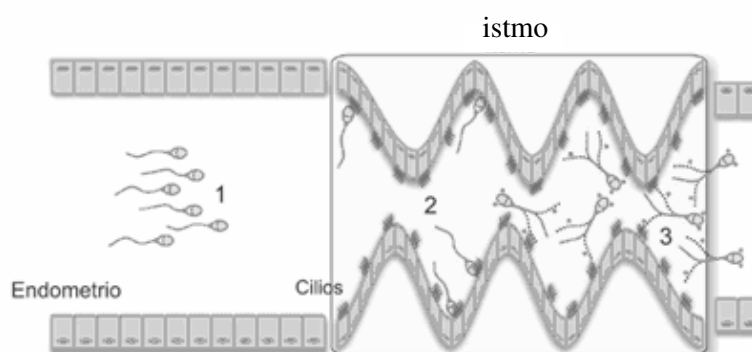


Figura 4. Seqüência dos processos pelos quais os espermatozoides são submetidos no trato genital feminino (Oliveira et al., 2006). Início da capacitação espermática (1), capacitação (2), hiperatividade (3).

As maiores modificações envolvem alterações nos componentes da membrana espermática, que podem ser modificados ou removidos por secreções do trato genital feminino, provocando a desestabilização da bicamada lipídica. Conseqüentemente, ocorre a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, iniciando-se a reação acrossômica (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993; Bazer et al., 1995). Finalmente, ocorrem alterações na motilidade, resultando em hiperativação do espermatozóide (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993). Embora o trato genital feminino forneça substratos energéticos para o espermatozóide, o útero

não é um ambiente ótimo, para manter a integridade da membrana durante o transporte pelo trato genital feminino. Proteínas do plasma seminal se aderem à membrana espermática, formando uma capa de glicoproteínas. Esse artifício é denominado de decapacitação espermática. Este processo acontece semelhantemente “*In vivo*”, quando o espermatozóide está nos fluidos do trato feminino (Figura 5) (Delpech e Thibault, 1993; Senger, 2003).

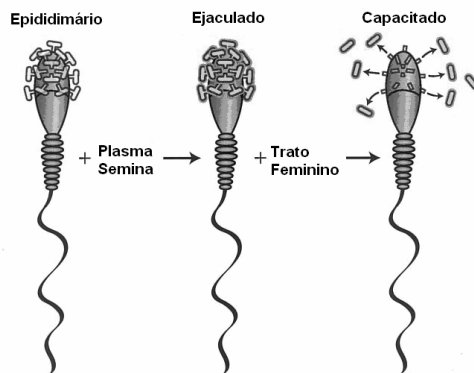


Figura 5. Adesão de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática (decapacitação espermática); Espermatozóiado capacitado nos fluidos do trato feminino (Senger, 2003).

Neste momento, essa capa glicoprotéica é removida ou modificada (Gadella et al., 2001) para alterar o fluxo iônico transmembrana, expor sítios de receptores da membrana espermática e remover componentes que estejam cobrindo a cauda que restringem a hiperativação do espermatozóiado.

As proteínas da família das serino-proteases presentes na membrana da célula espermática, a tripsina e a acrosina, fazem parte de outro mecanismo bioquímico da fertilização. A tripsina regula a entrada de Ca^{+2} pela membrana do espermatozóiado, acionando indiretamente a ação da acrosina sobre a membrana acrossomal externa (Winnica et al., 2000). Essas proteínas são controladas por um grupo de proteínas, inibidores de serino-proteases, presentes no plasma seminal de mamíferos adultos (Bhattacharyya, et al. 1986; Lai, et al 1991). Esses inibidores poderiam regular o processo de capacitação espermática e fertilização do oócito (Meizel, et al. 1976; Llanos, et al. 1993).

Estudos realizados por Manjunath et al., (2002) reforçam a ação de proteínas do plasma seminal no processo de capacitação, como as BSP proteínas do plasma seminal bovino, com afinidade a fosfolipídios-colina, com ação direta na retirada de colesterol da membrana. Todavia, foram também encontradas estas proteínas na espécie eqüina, as HSP-1 e HSP2 que apresentam uma grande homologia as BSP (Töpfer-Petersen et al., 2005). Esta saída de colesterol favorece retirada de fosfolipídios

no início da capacitação em espermatozóiados bovinos, o que é reforçado por ação conjunta de lipoproteínas de alta densidade (HDL), presentes na tuba uterina (Manjunath e Thérien, 2002) (Figura 6). A ação desta família de proteína sugere que, pode ser reversível. "In vitro", a remoção do plasma seminal por centrifugação ou migração espontânea é uma condição para o processo de capacitação. Contudo, a capacitação pode ser revertida, ressuspendendo o espermatozóiado capacitado no plasma seminal ou nos diluidores de sêmen. Dessa maneira, este se torna decapitado e requer tempo adicional para capacitação antes de reaver sua fertilidade (Delpech e Thibault, 1993; Senger, 2003). Seguem-se mudanças nos componentes da membrana espermática progressivamente: perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, redução da proporção de colesterol: fosfolipídio, aumento da mobilidade lateral de lipídios e proteínas (Delpech e Thibault, 1993; Gadella et al., 2001). A desestabilização da membrana provocada pela remoção do colesterol promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (Amann e Graham, 1992; Gadella et al., 2001; Gadella e Colenbrander, 2003). Bem como, afeta a porção lipídica da membrana, alterando a permeabilidade iônica, particularmente do cálcio, e as propriedades da capacidade de fusão da membrana, as quais são importantes para a reação acrossômica (Amann e Graham, 1992).

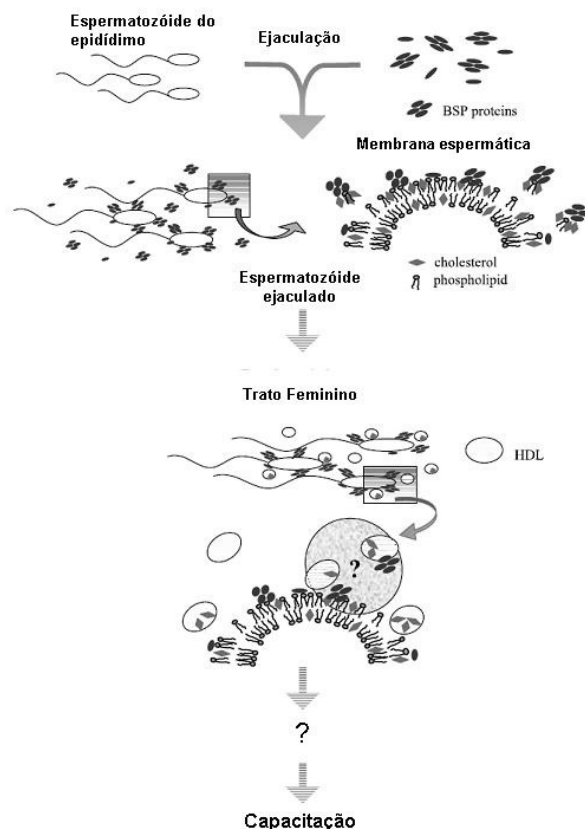


Figura 6. Mecanismo da capacitação em espermatozoides bovinos. Induzidos por uma proteína presente no plasma seminal BSP em ação conjunta com lipoproteínas de alta densidade (HDL) presentes na tuba uterina (Manjunath e Thérien, 2002).

Como todas as células sob condições aeróbicas, os espermatozoides são capazes de gerar radicais livres (Ball et al., 2002; Baumber et al., 2003), em sua maioria originados de atividade metabólica normal (Lamirande et al., 1997). Radicais livres, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO_3), induzem hiperativação, capacitação e reação acrossômica “*in vitro*” (Lamirande et al., 1997).

Os processos de hiperativação e capacitação espermática envolvem mecanismos distintos (Amann e Graham, 1992; Delpech e Thibault, 1993). A liberação de colesterol e a redistribuição de proteínas da membrana plasmática permitem a abertura dos canais de cálcio e, conseqüentemente, o aumento do cálcio intracelular. Contudo, há evidências de que a hiperativação esteja mais diretamente relacionada aos níveis de AMPc do que com, a entrada de Ca^{+2} intracelular. Um aumento progressivo nos níveis de AMPc, o

qual é cálcio dependente, precede o início da hiperativação espermática (Delpech e Thibault, 1993).

Segundo Gadella e Colenbrander (2003), o bicarbonato atua na cauda espermática levando a fosforilação da tirosina, induzindo a hiperativação. Esta ação se caracteriza por aumento da amplitude do batimento flagelar, devido à maior flexibilidade, principalmente, na peça intermediária, e mudança do movimento progressivo que se torna circular, devido a não rotação da cabeça do espermatozóide (Delpech e Thibault, 1993). O bicarbonato facilita a desorganização da membrana (Colenbrander et al., 2002; Gadella et al., 2001), na região apical da cabeça do espermatozóide (Gadella e Colenbrander, 2003). Conseqüentemente, foi sugerido que a capacitação (Figura 7) das células espermáticas dos mamíferos “*in vivo*” também fosse dependente de bicarbonato, supostamente presente em níveis maiores na tuba uterina (20 mM) do que no fluido

espermático (<1 mM) (Flesch e Gadella, 2000; Colenbrander et al., 2002; Gadella e Colenbrander, 2003). As respostas induzidas pelo bicarbonato podem diferir de acordo com as regiões da célula espermática, como cabeça e cauda (Visconti e Kopf, 1999; Gadella e Colenbrander, 2003). O bicarbonato estimula uma forma solúvel de adenilciclase (AC), abundante nos espermatozoides, resultando no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que ativa uma proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina de vários substratos (Visconti e Kopf, 1999; Flesch e Gadella, 2000; Gadella e Colenbrander, 2003). Em consequência, as proteínas da membrana plasmática,

relacionadas com a ligação na zona pelúcida se tornam ativadas. Além disso, a fosfolipase C (PLC) do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática (Flesch e Gadella, 2000; Gadella et al., 2001). Esta fosforilação faz a mediação de várias funções celulares, como regulação do crescimento, controle de ciclos celulares, regulação de íons, formação do citoesqueleto, além de ser um componente essencial à capacitação espermática (Visconti e Kopf, 1999; Meyers et al., 2003). As enzimas responsáveis pela fosforilação-desfosforilação da tirosina de proteínas espermáticas são possíveis alvos para os radicais livres (Lamirande et al., 1997).

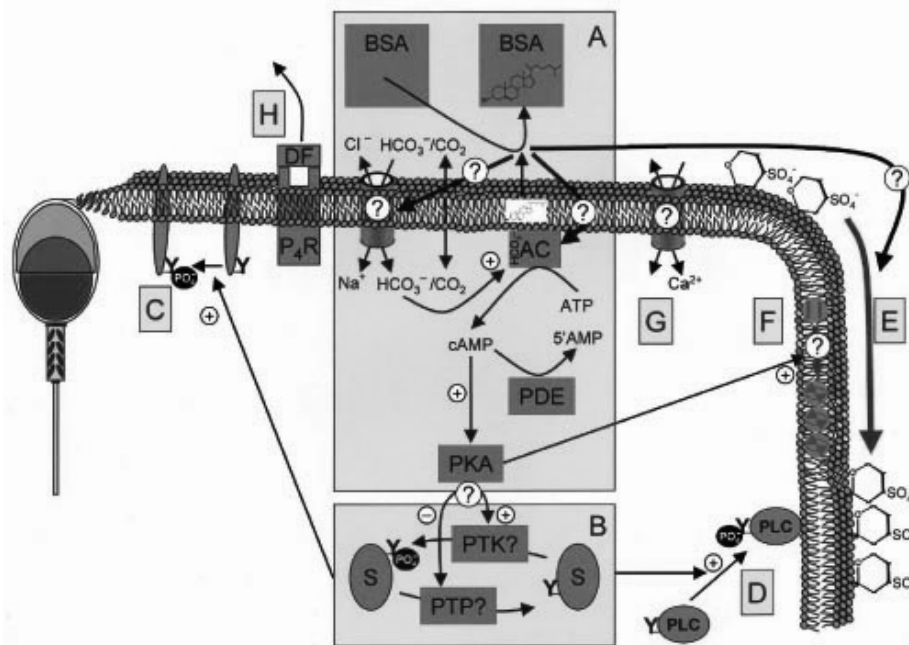


Figura 7. Sequência da capacitação espermática. Bicarbonato pode entrar na célula espermática através dos canais iônicos. O bicarbonato intracelular estimula a adenilciclase (AC) e a simultânea produção de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA). O efluxo de colesterol pode aumentar a entrada de bicarbonato e afetar a adenilciclase. A PKA induz a fosforilação da tirosina (Y) em vários substratos (S). As proteínas espermáticas de ligação à zona pelúcida (ZP) se tornam fosforiladas. fosfolipase C (PLC) do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática. Ativação da PKA promove redistribuição e translocação de fosfolípidios. A entrada de pequenas quantidades de cálcio nas células espermáticas tem uma função importante na capacitação (Flesh e Gadella, 2000).

Embora a duração do processo de capacitação “*in vitro*” tenha sido determinada para várias espécies, o tempo requerido para a capacitação “*in vivo*” não é conhecido para todas as espécies (Amann e Graham, 1992). Acredita-se que seja dependente do balanço de

estrógeno/progesterona (Delpech e Thibault, 1993).

Estudo realizado por Andersen (1991) observou que a progesterona secretada pelas células do cúmulo ou liberadas com o fluido folicular poderia atuar no espermatozóide antes que ele se ligue a zona pelúcida. Neste caso, a

progesterona atua diretamente na reação acrossômica como demonstrado em humanos (Osman et al., 1989), eqüinos (Meyers et al., 1995; Cheng et al., 1998), canino (Brewis et al., 2001) e caprinos (Somanath et al., 2000). A ação da progesterona conduz ao aumento da concentração intracelular de cálcio e saída de íons cloreto, estimulando a atividade de fosfolipases e fosforilação de tirosina das proteínas espermáticas (Baldi et al., 2002).

A capacitação acarreta modificações no acrossoma necessárias à reação acrossômica (Amann e Graham, 1992; Bazer et al., 1995; Colenbrander et al., 2002; Gadella et al., 2001 e Gadella e Colenbrander, 2003) (Figura 7). Portanto, as etapas da capacitação antecedem a reação acrossômica até que o espermatozóide atinja o local de fecundação do oócito, na ampola da tuba uterina (Bazer et al., 1995).

Com os receptores ZP espermáticos expostos para zona pelúcida se ligam promovendo a agregação e a fosforilação da

tirosina. O ambiente da ZP contém alta concentração de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, ZP e a progesterona têm efeito sobre a superfície espermática. O pH intracelular aumenta por meio da proteína G e o potencial de membrana despolariza. Esse aumento do pH, juntamente com a despolarização da membrana, promovem maiores concentrações de cálcio intracelular, que por sua vez ativa a translocação da fosfolipase C (PLC) para a membrana plasmática durante a capacitação. O aumento do cálcio intracelular ativa a fosfolipase A que degrada os fosfolípidios em ácidos graxos livres conseqüentemente, estimulam uma proteína kinase C (PKC). Essas alterações são necessárias para a fusão da membrana plasmática a membrana acrossômica externa (reação acrossômica), que promove a subseqüente secreção de enzimas acrossômicas (Figura 8) (Flesh e Gadella, 2000).

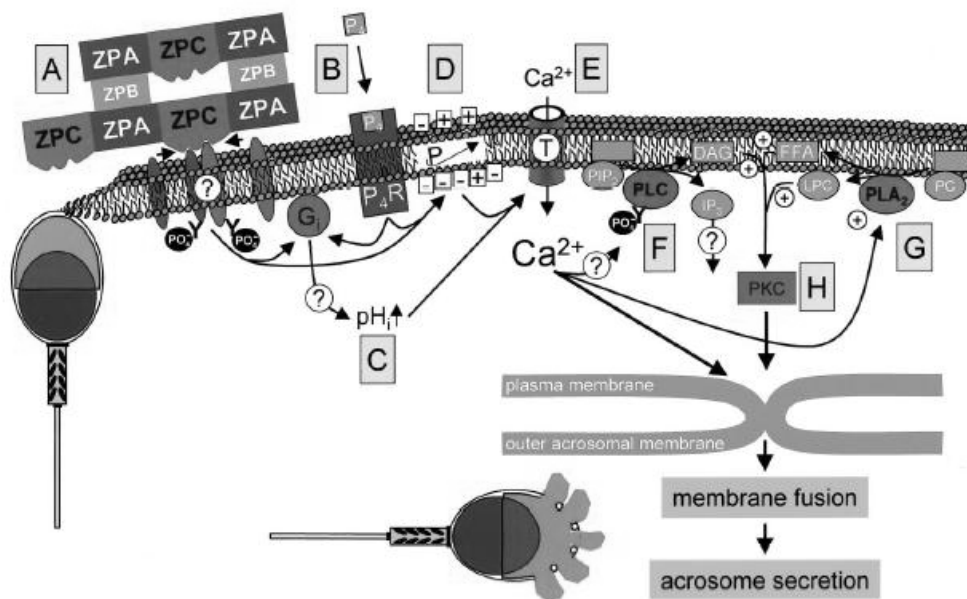


Figura 8. Seqüência da reação acrossômica. (A) as proteínas da zona pelúcida (ZP) se ligam aos receptores espermáticos, promovendo a agregação e a fosforilação da tirosina. (B) O ambiente das ZP contém alta concentração de progesterona, que pode se ligar a um receptor na superfície espermática. Ambos, ZP e a progesterona têm efeito sobre a superfície espermática. (C) pH intracelular aumenta por meio da proteína G e (D) o potencial de membrana despolariza. (E) Esse aumento do pH, juntamente com a despolarização da membrana, promovem maiores concentrações de cálcio intracelular, que por sua vez (F) ativa a translocação da fosfolipase C para a membrana plasmática durante a capacitação. (G) O aumento do cálcio intracelular ativa a fosfolipase A que degrada os fosfolípidios em ácidos graxos livres e, conseqüentemente, (H) estimulam uma proteína kinase C (PKC) (Flesh e Gadella, 2000).

4. Plasma Seminal

O plasma seminal equino é formado por secreções providas do epidídimo, ampola dos ductos deferentes, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais. Estas secreções podem ser divididas em diferentes frações apresentando funções diversificadas na cópula, na preservação do sêmen, no metabolismo e transporte espermático para o trato genital feminino, além de proteções imunológicas (Tischner et al., 1974; Rodger, 1975; Mann, 1975; Varner et al., 1987;).

Nestas diferentes frações a pré-secreção assume a função de limpeza da uretra, apresentando alta concentração de cloreto de sódio secretado pelas glândulas bulbo-uretrais (Mann, 1975; Aurich et al, 1997). A fração do sêmen na qual apresenta-se uma grande concentração de espermatozóides, contém ergotionina e glicerilfosforilcolina (GPC), além de traços de ácido cítrico. Estes componentes do sêmen têm como função proteger os espermatozóides contra agentes peroxidantes, e desempenham importante papel no metabolismo (Marden e Werthessen, 1956). A última fração contém alta concentração de ácido cítrico e pequena concentração de espermatozóides (Mann, 1975).

A remoção total do plasma seminal reduz a motilidade espermática, sendo necessário que taxas de aproximadamente 10 % sejam mantidas para a manutenção da motilidade do espermatozóide equino durante a preservação do sêmen. (Lamirande et al., 1988; Jasko et al, 1992; Rigby et al., 2001, Mattos et al., 2003). Contudo, efeitos negativos foram demonstrados por Lamirande et al. (1988) sugerindo que fatores do plasma seminal inibiriam a dineína ATPase, enzima responsável por ações metabólicas no axonema, bloqueando a motilidade. Além disso, foi determinado que altas concentrações de ergotionina em condições aeróbicas produziriam níveis altos de peróxido de

hidrogênio, o qual inibiria grupos sulfidrila e conseqüentemente bloquearia parte da via aeróbica nas vias metabólicas (Freud, 1973; Rodger e White, 1974; Mann, 1975; Lamirande et al., 1988). Entretanto, em concentrações fisiológicas a ergotionina protege os espermatozóides contra efeitos deletérios sobre o metabolismo.

Entre os vários constituintes do plasma seminal estão as proteínas secretadas pelas glândulas sexuais (Mann e Lutwak-Mann, 1981). A função destas ainda não está clara (Manjunath et al., 2002). As proteínas interagem diretamente com a superfície dos espermatozóides atuando como fatores decapacitantes e promotores da fertilidade (Gadella e Colenbrander, 2003; Jelínková et al., 2003).

4.1 . Proteínas do plasma seminal equino

O plasma seminal é composto de uma grande quantidade de proteínas, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, fatores antifertilidade ou imunossupressivos, ligadores de andrógenos e imunoglobulinas (Yanagimachi, 1994). A maioria destas substâncias são secretadas pelo epidídimo e glândulas sexuais (Lewin et al., 1974). As proteínas do plasma seminal equino têm sido isoladas, caracterizadas e avaliadas visando à compreensão dos possíveis efeitos ou interações inerentes à fertilidade do macho, bem como a congelabilidade do sêmen (Fellenberg et al., 1985; Jobim et al., 2003; Inagaki et al., 2002; Töpfer-Petersen et al., 2005).

No entanto, o espermatozóide não possui a capacidade de síntese protéica. O conteúdo protéico na superfície da membrana plasmática é alterado pela inserção de novas proteínas durante o trânsito epididimário e ejaculação (Killian et al., 1993).

A maioria das proteínas isoladas do plasma seminal equino possui três classes: 1) Fn-2 e HSP que modulam a capacitação espermática, interagindo diretamente com os fosfolipídios como a heparina; 2) as CRISP que favorecem a interação espermatozóide/ócito sendo a espécie equina a que apresenta a maior concentração desta proteína; 3) e as da família das "spermadhesins" que são proteínas

multifuncionais, as quais possuem habilidade em se ligar a heparina, inibidores de protease, fosfolípidios e a carboidratos. A expressão destas proteínas segue cada órgão específico dentro do trato reprodutor masculino (Töpfer-Petersen et al., 2005).

Brando e colaboradores (1999) estudaram pela técnica de eletroforese (2D) 14 tipos de proteínas com massa molecular diferentes que estariam relacionadas a fertilidade. Com exceção das proteínas da família das HSP, que apresentaram massa molecular de 14 a 30kDa, todas as proteínas são isoladas do ejaculado exceto as HSP-4 que são obtidas diretamente das vesículas seminais. Algumas HSP mostram afinidade pela heparina e estão associadas à superfície do espermatozóide. Proteínas com afinidade a heparina têm um papel de fertilização, pois há indícios que a heparina atua na reação acrossômica (Varner et al., 1988; Manjunath e Therien, 2002).

As HSP-1 e HSP-2 constituem 70 a 80 % das proteínas totais do plasma seminal eqüino com grande homologia a BSP-Bovino. A HSP-3 é rica em cisteína, contribuindo diretamente para fusão ovócito-espermatozóide (Ellerman et al., 2002). As HSP-4 previnem a capacitação espermática espontânea regulando a via da adenilato-ciclase (cAMP) (Fraser e Stzezak 2005). As HSP-5 e HSP-8 apresentam diferentes isoformas e estão presentes na família das calicreínas com alto grau de homologia com o antígeno PSA (marcador para câncer de próstata). As HSP-7 são homólogas a espermadesina AWN, com função de controle da capacitação prematura (Reinert et al., 1996).

Estudos das enzimas presentes no plasma seminal foram iniciados por Mann (1975), especificamente as da espécie eqüina por Fellenberg et al., (1985), neste último estudo foi identificado um complexo protéico de 800 kDa, o qual era inibidor de serino protease e que representava em torno de 70% das enzimas totais do plasma seminal. Esse inibidor de serino protease também foi encontrado no plasma seminal de porco da índia (Perreault et al., 1982; Winnica et al., 2000), rato (Lai et al., 1991; Winnica et al., 2000) bovino (Lewis et al., 1985) e suínos (Jelínková et al., 2003) como um peptídeo.

Além desta enzima também foi identificada uma angiotensina (Ball et al., 2002); lipases (Carver e Ball., 2002); lactoferrina (Inagaki et al., 2002) e acrosina, que é uma protease tipo tripsina, que está presente dentro do acrossoma e está diretamente ligada ao processo de fecundação espermatozóide ovócito, regulando a entrada de Ca^{+2} e a reação acrossômica pelo mecanismo mediado pelo progesterona em espermatozóides humanos (Mendoza e Tesarik, 1993).

Quanto à concentração das proteínas normalmente encontrada no plasma seminal pode haver uma variação devido à individualidade do animal e o tempo de coleta entre os ejaculados (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

4.2. *Serino proteases: Aspectos gerais*

Serino proteases são enzimas proteolíticas que catalizam a clivagem de ligações peptídicas de proteínas. Assim nomeadas pela presença de resíduo nucleofílico de serina (**Ser**) no sítio ativo. A explicação mais aceita para a clivagem é a da dupla transferência: ocorrendo a formação de um tetraedro intermediário durante a transferência de prótons do resíduo **Ser**₁₉₅ para o resíduo **His**₅₇ e em seguida para o resíduo **Asp**₁₀₂. O resultado dessa transferência é a formação de uma carga negativa parcial responsável pela catálise enzimática (Warshel et al., 1989). Os dois passos básicos de catálise por este grupo de enzimas incluem: (a) formação de um éster entre o átomo de oxigênio e o grupo acil do substrato e (b) o ataque da água ao intermediário acil-enzima, que promove a quebra e a liberação do produto ácido, retomando a forma normal da enzima (Antão e Malcata 2005).

Essas proteases adquirem um alto grau de especialização durante a evolução biológica (White et al., 1986). Muitos processos biológicos são regulados pela ação de serino proteases, por exemplo: coagulação do sangue, liberação de proteínas hormonais, controle do tamanho de proteínas, translocação de proteínas através da membrana e fertilização (Wenzel e Tschesche, 1985; Powers, 2002; Trancoso et al., 2003; Chou, 2006).

As serino proteases são indispensáveis para os processos fisiológicos em animais. Contudo, quando não são controladas, podem representar um risco em potencial, destruindo componentes protéicos celulares e teciduais (Metayer et al., 2002). Devido a isso o equilíbrio entre as enzimas e seus inibidores é um fator essencial para manutenção de um estado fisiológico normal (Neurath, 1993; Metayer et al., 2002). Esse equilíbrio é exemplificado na fisiologia da reprodução no desenvolvimento dos gametas, espermatogênese, e no controle da barreira hemato-testicular (Metayer et al., 2002).

A acrosina é uma serino protease específica dos espermatozoides de mamíferos e tem relevante papel na fertilização. É reportada sua presença no acrossoma e o seu envolvimento na capacitação e indução da reação acrossômica, dissolução da zona pelúcida e digestão das protaminas durante a formação do pro-núcleo no citoplasma (Bhattacharyya et al., 1986).

Há dois possíveis mecanismos básicos de regulação para este sistema enzimático. Um envolve a ativação de precursores de proteinase inativos (zimogênios na forma inativa pro-acrosina (Ball et al., 1997), que se transforma em acrosina e, um outro mecanismo que envolve a inativação de proteases pela

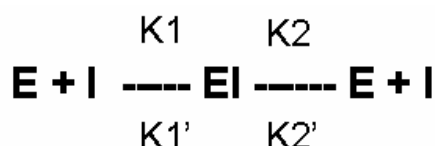
formação de complexos com inibidores protéicos específicos (Neurath 1993; Trancoso et al., 2003).

4.3. Inibidores de serino protease : Aspectos gerais

Há muitos anos, os processos moleculares que envolvem as enzimas proteolíticas vêm sendo investigados. Um dos modelos para elucidar os mecanismos enzimáticos ou de interação proteína-proteína é o estudo dos inibidores de serino proteases (Kaslik et al., 1995; Trancoso et al., 2003).

Os inibidores naturais ou protéicos são encontrados em todos os seres vivos, distribuindo-se em microorganismos, plantas e animais (Felleberg et al., 1985; Lawrence e Keudal, 2000; Zhao et al., 2005).

Essa classe de inibidores apresenta uma inibição estritamente competitiva e de estequiometria 1:1 na formação do complexo enzima-inibidor (Hedstrom, 2002). A inibição da serino protease por inibidores naturais e sintéticos (berenil e benzamidina) ocorre através de uma ligação muito forte e altamente específica que está restrita a uma pequena porção da molécula do inibidor, denominada de sítio ativo. O mecanismo de reação da maioria dos inibidores de serino protease é representado por:



Na reação do tipo enzima-inibidor, as duas constantes cinéticas envolvidas são K_1 que é a constante de formação do complexo EI e K_2 , que é a constante de dissociação do complexo EI. A formação desse complexo é muito estável e ocorre rapidamente K_1 e a sua dissociação ocorre de forma muito lenta K_1' . Uma inibição eficiente apresenta altos valores de K_1 , ou seja, há rapidez na formação do complexo EI e baixos valores de K_2 o que significa lentidão na dissociação do complexo EI (Cornish-Bowden, 1979)

A presença de inibidores de serino protease em muitos processos biológicos é

bem documentada, principalmente pelas Kunitz, inibidor que está envolvido na coagulação sanguínea, no controle da inflamação (Oliva et al., 2000; Trancoso et al., 2003) e como controlador do câncer em diversos sistemas (Kennedy, 1998).

Na biologia da reprodução a função fisiológica e bioquímica dos inibidores de serino protease é muito ampla, mas ao mesmo tempo não muito clara. Foi reportada a existência de inibidores de proteases nas glândulas sexuais acessórias como um protetor do tecido (Lai et al., 1991), em fluído epididimário, inibindo a ação de proteases extracelulares (Kirchhoff et al.,

1991), na proteção da barreira hemato-testicular, no controle de enzimas proteolíticas (Métayer et al., 2002), nos mecanismos envolvidos no processo de fertilização: capacitação espermática, controlando ação sobre os receptores de Ca^{+2} (Battacharyya et al., 1986; Clark et al., 1993), na reação acrossômica, atuando na vesiculação da membrana e/ou na dispersão da matriz acrossomal (Fraser, 1982; Perreault, 1982; Arboleta e Gerdon 1988) e na motilidade, regulando a atividade da adenil-ciclase (Okamura, 1990).

Está bem estabelecido que inibidores naturais, embora possam inibir a acrosina, ligam-se reversivelmente a ela, visto que são removidos durante sua permanência no trato genital feminino (Bhattacharyya et al., 1986). Inibidores sintéticos, por outro lado não apresentam esta função de dissociação, de forma que foram utilizados para prevenir a fertilização “in vitro”, bem como, “in vivo” em espécies animais incluindo primatas (Fraser, 1982; Ball et al., 1997). Desta forma, os inibidores se apresentam como fatores decapacitantes, visto que espermatozoides incubados na presença destes inibidores apresentam redução na sua capacidade fecundante.

Foram reportados estudos da ação destes inibidores nos diferentes momentos do processo de fertilização em varias espécies de mamíferos. Em espermatozoides do ejaculado de porco da índia, foi verificado que a presença do inibidor sintético p-Aminobenzamidina e benzamidina promoviam a dispersão da matriz acrossomal sem alterar a vesiculação, quando a reação acrossômica era induzida por ionóforo de cálcio (Gree, 1970); o mesmo foi verificado em espermatozoides do epidídimo de camundongo (Fraser, 1982). Em espermatozoides do epidídimo de hamster, ocorre o efeito inverso, com a inibição da vesiculação da membrana, quando os espermatozoides já se apresentavam capacitados (Lui e Meizel, 1979). Essa diferença pode ser atribuída ao modelo de ação dos inibidores sintéticos de serino protease, visto que as espécies são diferentes, além da própria diferença de metodologia empregada na pesquisa (Perreault, 1982).

Sobre o mecanismo da motilidade, os inibidores mostram uma sinergia entre as

espécies (porco da índia, camundongo, hamster), visto que o inibidor não tem ação sobre este mecanismo (Gree, 1970; Fraser, 1982; Lui e Meizel, 1979). Contudo, isto não acontece em espermatozoides do epidídimo de suíno, uma vez que o inibidor controla a motilidade, via protease do tipo tripsina presente no flagelo e, possivelmente, regulado pela atividade da adenil-ciclase via bicarbonato (Okamura 1990; Winnica 2000).

Na espécie eqüina pelo menos dois grupos de inibidores de serino proteases foram estudados. Um com a enzima apresentando atividade específica pela tripsina, acrosina, provavelmente correspondendo a HUSI-II (Inibidor de protease plasma seminal humano), com uma massa molecular de 6,5 kDa, somente encontrado no fluído seminal. E um segundo, um complexo com massa molecular de 800 kDa, correspondente a HUSI-I, formado por diversos polipeptídios com massa molecular de 11kDa a 30 kDa (Felleberg et al., 1985). A concentração destes inibidores apresenta variação nos fluídos seminais, decorrente da época do ano, visto que esta espécie apresenta características sazonais. A resposta à atividade testicular favorece a ação de enzimas proteolíticas que controlam a produção destes inibidores (Metarye et al., 2002), além de processos fisiológicos, ainda não elucidados que estariam controlando a formação dos mesmos (Filleberg et al., 1985).

5. Técnicas de purificação de proteínas

5.1. Fracionamento e purificação por precipitação com sulfato de amônio

A separação dos componentes do plasma por técnicas de precipitação está envolvida somente com a manipulação das propriedades de solubilidade das proteínas com os precipitantes, geralmente sais. Um dos precipitantes mais usados é o sulfato de amônio, pois apresenta baixa força iônica quando comparado ao sulfato de sódio e potássio (Dixon e Webb, 1961).

Hofmeister (1890), citado por Curlig (1980), foi quem relacionou solubilidade entre proteínas e a concentração de sal; ele distinguiu globulinas de albuminas usando sulfato de amônio como precipitante.

A relação proteínas e ligantes está diretamente ligado aos grupos mais ou menos ionizáveis das proteínas com a

contração de sal. O íon sulfato apresenta ligação mais satisfatória aos íons catiônicos, especialmente, quando a proteína tem uma carga positiva líquida (ZH^+)³. Assim, o favorecimento desta interação leva ao grau de precipitação (separação) das proteínas.

O uso de sulfato de amônio é o passo inicial para separar uma mistura de proteínas, posteriormente o material é dialisado e submetido à análise em eletroforese e cromatografia.

5.2. Cromatografia

Os primeiros trabalhos envolvendo a cromatografia como ciência foram publicados em 1906 por Michael Tswett, botânico russo que separou algumas substâncias de extratos de plantas. Desde então, esta técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com elevada sofisticação, inicialmente com a cromatografia gasosa e posteriormente, com a cromatografia líquida. A cromatografia opera com o princípio da extração, porém uma fase é fixada no local enquanto a outra se move por ela (Figura 9).

A cromatografia é dividida em categorias com base no mecanismo de interação da substância dissolvida com a fase estacionária:

Cromatografia de adsorção – Utiliza uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida. O soluto é adsorvido na superfície da partícula sólida. O equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel justifica a separação dos diferentes solutos.

Cromatografia de troca iônica – Ânions como $-SO_3^-$ ou cátions como $-N(CH_3)_3^+$ estão ligados covalentemente à fase estacionária sólida, geralmente uma resina, neste tipo de cromatografia. Os íons de carga oposta do soluto são atraídos para a fase estacionária pela força eletrostática.

Cromatografia de afinidade – Este tipo mais seletivo de cromatografia emprega interações específicas entre um tipo de molécula do soluto e uma segunda molécula que está ligada covalentemente (imobilizada) à fase estacionária.

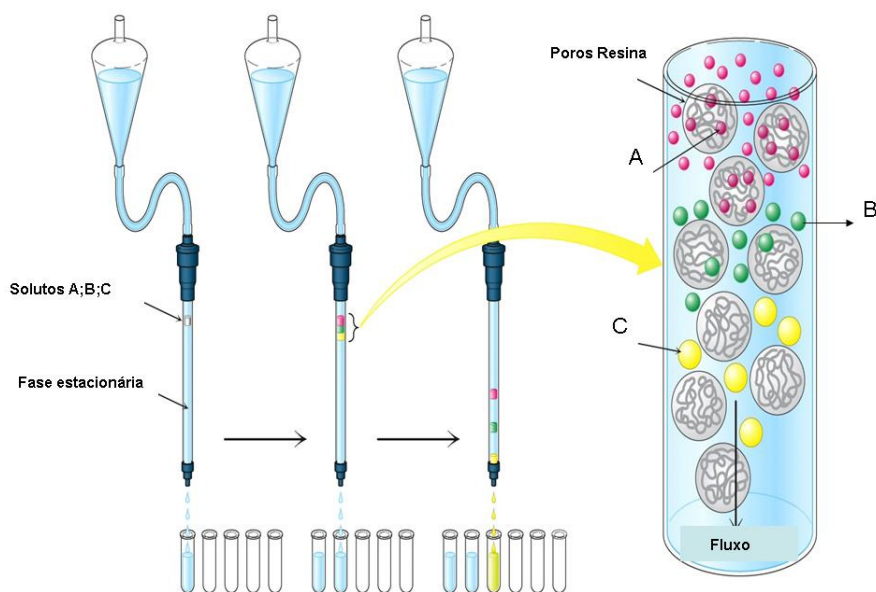


Figura 9. Representação esquemática de separação cromatográfica. O soluto A, com maior afinidade pela fase estacionária do que os solutos B e C, permanecem no início da coluna (Stryer, 2005).

Cromatografia de exclusão molecular – está técnica separa as moléculas pelo tamanho, com os maiores solutos passando por ela com maior velocidade. Ao contrário de outros tipos de cromatografia, não há interações atrativas entre a “fase

estacionária” e o soluto no caso real da exclusão molecular.

Cromatografia de fase reversa – a fase estacionária é formada por partículas de sílica as quais se prendem um significativo número de grupamentos apolares do tipo fenil, butil, octanoil e octadecil. A idéia aqui

é adsorver com forças diferenciadas uma população de peptídeos ou proteínas que possam ser desorvidos, seletivamente, quando da eluição, em uma coluna de fase reversa por um gradiente crescente de concentração de um solvente orgânico do tipo acetronitrila. Com grande vantagem, esta técnica de separação substitui a cromatografia de troca iônica. As colunas de fase reversa octanoil (C-8) e octadecil (C-18) mostram melhores resoluções e/ou maiores rendimentos de recuperação dos peptídeos.

Todo ensaio cromatográfico gera um cromatograma que é um gráfico que mostra a resposta do detector (UV), em função do tempo de eluição. O cromatograma apresenta o tempo de retenção que é o tempo necessário após a injeção da mistura na coluna até aquele componente alcance o detector, está relacionado ao gráfico (altura máxima e largura). E o volume de retenção medido é referente à largura da altura máxima medida na metade da altura do gráfico.

Nos dias atuais podemos distinguir três maneiras de se trabalhar na cromatografia líquida de proteínas. Esta distinção diz respeito à velocidade do eluente e ao tamanho da partícula: primeiro a cromatografia clássica – velocidade do eluente é lenta (10 a 40 cm/h) e o tamanho da partícula da ordem de dezenas de micrômetros; segunda o processo é acelerado em função da maior resistência da partícula, seu tamanho é 5-15 micrômetros. A velocidade é da ordem de 50 a 300cm/h são utilizados sistema FPLC (cromatografia de baixa pressão) e sistema HPLC (cromatografia de alta pressão) a terceira refere-se à cromatografia superacelerada com velocidade da ordem de 300cm/h a 4000cm/h (Harris, 1999; Silva Júnior, 2004).

6. Técnicas de caracterização de proteínas

6.1. Eletroforese em gel de poli(acrilamida)

O termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob a influência de um campo elétrico contínuo. Seu princípio é simples: moléculas com carga negativa

migram para o pólo positivo, e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo. Sendo substâncias anfólicas, as proteínas adquirem carga positiva ou negativa em função do pH. É, portanto, conveniente manter o pH do meio estável durante a eletroforese, mediante soluções-tampão.

Géis de poli(acrilamida) são formados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônia e tetrametiletilenodiamina (TEMED). O diâmetro dos poros do gel é função das concentrações de acrilamida e Bis.

Na eletroforese por sistema de SDS-PAGE é aplicado o estudo de proteínas desnaturadas por aquecimento na presença de SDS e β -mercaptoetanol, visando à determinação do peso molecular de proteínas, empregam-se, comumente, géis com gradiente de concentração, na faixa de 5% a 20% de acrilamida. O gradiente é preparado mediante o uso de misturador próprio. Nesse caso as separações se dão segundo o peso molecular e a migração é consequência tão somente das cargas negativas do SDS, causando efeito de peneiramento molecular. Quanto maior a molécula, menor a sua mobilidade.

As revelações das bandas de proteínas podem ser realizadas por vários métodos como: Azul-brilhante-de-coomassie (Chrambach e Rodbard, 1971), por ouro ou prata coloidais (Gershoni e Palade, 1983), que são os mais comumente utilizados.

Contudo a revelação das bandas protéicas com nitrato de prata apresenta uma alta sensibilidade e pode oferecer vantagens em baixas concentrações de proteínas (Andrews, 1988). Esse método baseia-se no potencial de oxidação mais elevado do íon prata, complexado ou livre, que da função dissulfídrica, tal como ocorre em proteínas. Deve-se salientar, no entanto, que o “mecanismo preciso da revelação por prata” não está esclarecido.

6.2. Espectrometria de massa

Um espectrômetro de massa é um detector potente para as análises qualitativas e quantitativas de constituintes em cromatografia líquida. Na espectrometria de massa, as moléculas gasosas são ionizadas (para formarem cátions), aceleradas por um campo elétrico, e então separadas de acordo

com a sua relação massa/carga. Desta forma, considere a massa de um dado íon como m e sua carga como $+Ze$ onde e é a magnitude da carga de um elétron. Quando o íon é acelerado por uma diferença de potencial V nas placas aceleradoras de íons, ele adquire uma energia cinética proporcional à diferença de potencial elétrico. O processo de ionização geralmente confere energia suficiente que permite quebrar a molécula numa variedade de fragmentos, resultando em um espectro que é um gráfico que mostra a abundância relativa de cada fragmento que atinge o detector do espectrômetro de massa (Harris, 1999).

7. Criopreservação

O desafio da célula espermática durante o processo de congelamento não é sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento de -196°C , mas sim sua capacidade de suportar mudanças que ocorrem durante a zona intermediária de temperatura (-15°C a -60°C), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (Mazur, 1984).

No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado da temperatura corpórea ($+37^{\circ}\text{C}$) à temperatura ambiente ($+20^{\circ}\text{C}$). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozoides, desde que estes estejam diluídos em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, entre 19°C e 8°C , em que o espermatozoide pode ser severamente lesado (Moran, 1992). Se esse resfriamento for realizado de maneira inadequada, ocorre um fenômeno chamado choque térmico (Watson, 1995; Watson, 2000), o qual induz prejuízos irreversíveis como rápida perda de motilidade, movimento circular, redução do metabolismo espermático, danos à membrana plasmática decorrente de aumento de permeabilidade, com conseqüente perda de íons e moléculas intracelulares e danos acrossômicos (Amann e Pickett, 1987; Pickett e Amann, 1992),

como edemaciamento e irregularidades do acrossoma (Watson, 1995). O resfriamento nesta faixa de temperatura ($19-8^{\circ}\text{C}$), faz com que os lipídios da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (Graham, 1996). Quando o sêmen é resfriado abaixo de $+5^{\circ}\text{C}$, inicialmente o meio que circunda o espermatozoide e as próprias células permanecem descongeladas, porque seu ponto de congelamento é abaixo de 0°C , apenas ocorre um super-resfriamento (Amann e Pickett, 1987). De -6°C a -15°C , a água no meio começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, enquanto a membrana plasmática impede a formação de cristais de gelo intracelular. A água dentro da célula espermática permanece descongelada e a célula começa a perder água para o meio externo, visto que o meio externo apresenta uma maior concentração de soluto (Hafez, 1995; Graham, 1996). Uma vez que as células alcançam a temperatura crítica (-60°C), os espermatozoides tornam-se relativamente inerte e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento (Parks e Graham, 1992; Hafez, 1995; Graham, 1996).

A curva de descongelamento depende da curva de congelamento. Espermatozoides congelados numa curva lenta requerem uma curva de descongelamento lenta, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento desses cristais provoca a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células (Amann e Pickett, 1987 e Holt, 2000). As células congeladas numa curva rápida necessitam de curva rápida de descongelamento, de modo que o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não tenha tempo para recrystalizar-se (Figura 10) (Amann e Pickett, 1987; Pickett e Amann, 1992; Graham, 1996).

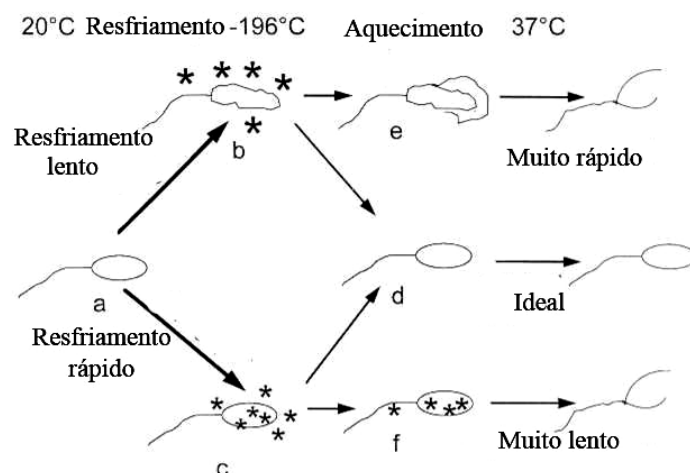


Figura 10. Representação esquemática das mudanças físicas no espermatozóide equino durante o congelamento (Amann e Pickett, 1987).

Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta e condutividade de calor, e a temperatura (Amann e Pickett, 1987). Temperatura alta, como 75 °C por 7 segundos (Cochran et al., 1984), seguida de imersão imediata em banho-maria a 37°C por, no mínimo, mais 5 segundos promove maior viabilidade e motilidade espermáticas pós-descongelamento, comparada a temperatura e tempo utilizados rotineiramente (37°C, 30 segundos) (Holt, 2000).

7.1. Criocapacitação

Os compartimentos membranosos do espermatozóide são os que apresentam maior sensibilidade à redução brusca de temperatura. As membranas espermáticas afetadas pela criopreservação incluem a membrana plasmática, acrossômica externa e a interna e mitocondrial (Watson, 1995). A causa primária dos danos celulares decorrentes do congelamento é a desestabilização da membrana plasmática devido ao estresse térmico, mecânico, químico e osmótico (Parks e Graham, 1992). As membranas respondem a alterações de temperatura através de transição da fase lipídica (Watson, 1995; Watson, 2000; Meyers et al., 2003). Com a redução de temperatura, os movimentos laterais dos fosfolipídios se tornam mais restritos, devido à mudança da fase fluida para gel, resultando em agrupamento de proteínas

para as áreas fluidas remanescentes. Dessa forma, há uma tendência de certos fosfolipídios em formarem uma micela invertida, denominada de estrutura hexagonal II que pode ser, ou não, reversível (Amann e Pickett, 1987; Parks e Graham, 1992; Watson, 1995). Modificações semelhantes na composição lipídica da membrana plasmática do espermatozóide são induzidas pelo bicarbonato de sódio presente no trato genital feminino, as quais foram observadas durante o processo de criopreservação (Ashworth et al., 1994). Yanagimachi (1994) e Watson (2000) sugeriram que a desorganização da membrana decorrente do congelamento/descongelamento provoca aumento da permeabilidade, e os íons cálcio presentes no meio extracelular penetrarão na célula, podendo estimular os eventos dependentes de cálcio, como a capacitação espermática. Para Watson (1995), o espermatozóide criopreservado pode ser considerado parcialmente capacitado, pois apresenta mudanças na fluidez da membrana.

O aumento da concentração de cálcio intracelular e o desencadeamento da cascata de fosforilação podem ser induzidos por radicais livres e estresse osmótico, devido à maior fragilidade da membrana (Pommer et al., 2003). Bailey et al. (2000) verificaram que o aumento da fosforilação de tirosina no sêmen congelado de bovinos

ocorreu imediatamente após descongelamento. No entanto, no sêmen eqüino, tal aumento só foi observado após uma hora de incubação com ou sem ativadores da capacitação, sugerindo que os espermatozóides criopreservados podem ser mais sensíveis aos indutores da capacitação, o que poderia explicar seu tempo de vida limitado quando comparado ao do sêmen fresco (Pommer et al., 2003).

7.2. Diferença entre gananhões e ejaculados

Diferentes ejaculados do mesmo gananhão e diferentes gananhões apresentam diferenças quanto à sobrevivência espermática ao processo de criopreservação. Pickett e Amann (1992) estimaram que 25% a 30% dos gananhões possuem sêmen de boa congelabilidade, 30% a 50% apresentam moderada congelabilidade e 25% a 40%, reduzida congelabilidade. Portanto, tem sido recomendado diluidores e protocolos específicos para cada indivíduo (Graham, 1996).

7.3. Procedimentos utilizados na criopreservação do sêmen eqüino

O sêmen eqüino é coletado com vagina artificial (Amann e Pickett, 1987; Hafez, 1995) e mantido aquecido para proteger os espermatozóides do choque térmico. Após a coleta, o sêmen é avaliado (Hafez, 1995) quanto às características físicas (motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, cor, aspecto). Para a criopreservação, é necessário que as características seminais estejam dentro dos parâmetros mínimos requeridos para a espécie eqüina, isto é, motilidade espermática progressiva maior que 50% e concentração maior que 60 milhões de espermatozóides/mL (Jasko, 1994). Após a adição de diluidor ao sêmen, geralmente na proporção de 1:1, é preconizada a centrifugação para reduzir o percentual de plasma seminal e aumentar a concentração espermática/mL.

A remoção do plasma seminal antes do congelamento melhora a motilidade dos espermatozóides pós-descongelamento, pois a alta concentração de cloreto de sódio presente no líquido seminal pode causar danos aos espermatozóides preservados *in vitro*. Contudo, o plasma seminal pode conter componentes que protegem as membranas durante a criopreservação, cuja

composição pode variar entre gananhões. Tal fato pode explicar a habilidade diferente dos espermatozóides de gananhões, em sobreviver ao processo da criopreservação (Moore et al., 2005). Por outro lado, a permanência de 10% de plasma seminal pós-centrifugação exerce efeito benéfico sobre a motilidade espermática eqüina pós-descongelamento (Amann e Pickett, 1987; Jasko et al., 1992; Pickett e Amann, 1992; Brinsko et al., 2000). No entanto, o processo de centrifugação não é inócua aos espermatozóides, podendo reduzir sua viabilidade. Contudo, os efeitos deletérios desse procedimento podem ser minimizados com a utilização de força centrífuga reduzida, 300-400g e tempo adequado, 10 a 15 minutos (Amann e Pickett, 1987; Graham, 1996 e Heitland et al., 1996).

Para o sêmen ser armazenado a baixas temperaturas é necessário que os espermatozóides sejam acondicionados em diluidores apropriados (Amann e Pickett, 1987; Holt, 2000). Os diluidores de sêmen possuem uma série de componentes básicos. Dentre esses, a água que atua como solvente de outros componentes do meio; tampões e substâncias não iônicas que atuam na manutenção da osmolaridade e pH do meio; macromoléculas da gema do ovo e o leite que atuam na prevenção do choque térmico; carboidratos que servem como fonte de energia e outras substâncias como antibióticos, que controlam o crescimento microbiano; detergentes que emulsificam os lipídios presentes na gema de ovo, permitindo melhor interação entre esses componentes e a membrana plasmática; quelantes que se ligam ao cálcio e ao magnésio, limitando o movimento de íons bivalentes por meio da membrana, impedindo que os íons penetrem nas células espermáticas e as danifiquem durante o choque térmico (Amann e Pickett, 1987).

A sobrevivência dos espermatozóides durante a criopreservação requer a presença de agentes crioprotetores nas etapas de resfriamento, congelamento e descongelamento. O efeito protetor dessas substâncias foi associado à redução da concentração de soluto e ao aumento das porções de água descongelada e, portanto, do tamanho dos canais de água (Watson, 1995). Os crioprotetores são classificados como penetrantes (intracelulares)

constituídos de moléculas pequenas requerendo maior concentração, e não penetrantes (extracelulares) constituídos de moléculas maiores requerendo menor concentração para que protejam as células contra as crioinjúrias (Pickett e Amann, 1992; Jasko, 1994; Graham, 1996).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado nos protocolos de congelamento (Holt, 2000), embora não apresente efeito crioprotetor igualmente eficiente na criopreservação do sêmen de todas as espécies. Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores a relatar o efeito crioprotetor do glicerol. A adição de glicerol ao meio de congelamento de sêmen induz ao aumento do volume de canais de solvente não congelados e menor concentração de sais nestes canais (Mazur, 1984).

O efeito do glicerol na membrana plasmática pode ocorrer por meio de ligação direta aos fosfolipídios da membrana, reduzindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade celular (Parks e Graham, 1992). Contudo em alta concentração os efeitos deletérios do glicerol incluem estresse osmótico, mudanças na organização, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (Watson, 1995).

O glicerol foi inicialmente utilizado na concentração de 7-10% (Smith e Polge, 1950). Segundo Amann e Pickett (1987), a concentração ideal do glicerol varia de 3 a 4%. Essas concentrações foram eficientes para preservar a motilidade do sêmen equino pós-descongelamento. No entanto, para minimizar os danos ao acrossoma, foram necessárias concentrações menores que 2% (Watson, 1995). Embora a taxa de fertilidade similar com sêmen equino congelado utilizando-se concentrações de glicerol de 7% a 2% tenha sido reportada (Graham et al., 1978), foi demonstrado uma superioridade nos parâmetros de motilidade espermática, motilidade progressiva, vigor e integridade da membrana plasmática após o descongelamento com o uso do glicerol na concentração de 2,5% (Vidament et al., 2002; Vidament et al., 2005).

Os agentes crioprotetores extracelulares são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no

leite e na gema do ovo, açúcares como a lactose, frutose, manose, rafinose e trealose, polímeros sintéticos como o polivinilpirrolidone e a metilcelulose (Jasko, 1994). Os agentes crioprotetores não penetrantes atuam por meio de efeito osmótico, facilitando a desidratação celular, pois tornam o meio do diluidor seminal hipertônico (Amann e Pickett, 1987).

A gema de ovo, o mais eficiente dos agentes não penetrantes na proteção de espermatozoides contra o choque térmico, é comumente incluída em diluentes para criopreservação, mas não apresenta a mesma eficiência para o sêmen de todas as espécies. Quando presente em meios diluidores, a gema de ovo permite a redução da concentração de glicerol (Watson, 1995). Atualmente, foi identificado o fator protetor ativo na gema de ovo, que é a fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) e alto peso molecular (Mayer e Lasley, 1945; Parks e Graham, 1992; Weitze e Petzoldt, 1992 e Watson, 1995). Essa fração lipoprotéica de baixa densidade é constituída de fosfolipídios e agiria somente na superfície celular, como um filme protetor. Além disso, foi relatado por Manjunath et al., (2002) que as lipoproteínas de baixa densidade oferecem proteção ao espermatozoide, reduzindo os efeitos deletérios das proteínas do plasma seminal sobre a membrana plasmática.

Leite ou diluidores a base de leite são usados na rotina para a diluição, centrifugação, resfriamento e armazenamento do sêmen equino. Os fosfolipídios que também estão abundantes no leite produzem modificações estruturais nas membranas das células, permitindo, desse modo, a adaptação do espermatozoide a baixas temperaturas (Watson, 1985; Varner et al., 1988). No leite, os agentes crioprotetores são as micelas de caseínas que interagiriam com as proteínas do plasma seminal, impedindo a saída de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática do espermatozoide (Bergeron e Manjunath, 2006).

8. Avaliação Espermática

Para o sucesso da concepção o espermatozoide deverá possuir membranas completamente funcionais, as organelas e o genoma haplóide intacto (Silva et al., 2006). Estudos laboratoriais de análise de sêmen

são fundamentais para a predição do desempenho reprodutivo do garanhão (Celeghini et al., 2007). Entre todos os exames a técnica de sondas fluorescentes em conjunto com a citometria de fluxo permite avaliar vários parâmetros espermáticos simultaneamente de milhares de espermatozoides em um curto período de tempo (Zeginiadou et al., 2000; Rathi et al., 2001). Estas avaliações favorecem a predição da fertilidade potencial de um determinado animal e avaliam com mais acurácia a congelabilidade do sêmen de um garanhão (Magistrini, 2000).

Estudos estabeleceram uma correlação entre ensaios padrões de laboratório com citometria de fluxo para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, funcionalidade mitocondrial e índice de fragmentação do DNA de espermatozoides (Graham et al., 1990; Love e Kenney, 1998; Neild et al., 2005; Silva et al., 2006).

8.1. Integridade e funcionalidade da membrana plasmática

A membrana plasmática do espermatozoide envolve toda a célula. Por suas características semi-permeáveis mantém o gradiente químico dos íons e outros componentes solúveis importantes para a viabilidade celular (Silva et al., 2006).

Se a membrana plasmática do espermatozoide não estiver funcionalmente intacta esta será considerada inviável. Normalmente, a integridade física da membrana é avaliada depois de marcar as células com corantes fluorescentes não penetrantes.

Quando as células têm a capacidade de impedir a entrada de corantes na membrana plasmática a mesma está íntegra. A maioria destes corantes tem uma grande afinidade ao DNA, mas eles só se ligam se houver lesão na membrana. Corantes tais como: Hoechst 33258 (comprimento de onda ex/em 358/488nm)(Hong et al., 1988); YoPro-1 (comprimento de onda ex/em de 488/515nm) (Harrison et al., 1996); iodeto de Propídio (Pintado et al., 2000) ou ethidium homodimer-132 (Cheng et al., 1996) (ambos têm comprimento de onda ex/em de 488 e 568 / <620 nm); ToPro-3 e TOTO (comprimento de onda ex/em de 647/670 nm)(Haugland et al., 2004), são comumente utilizados com este propósito

(Garner et al., 1986; Harrison e Vickers, 1990; Smith e Murray, 1997). O grande benefício da utilização de sondas fluorescentes é o maior contraste e a menor variabilidade quando comparadas às colorações clássicas (Neild, 2005). Todavia, o iodeto de Propídio vem se destacando em pesquisa pela facilidade da preparação e simplicidade da técnica (Graham, 1990). Garner et al. (1986) utilizaram a combinação de duas substâncias fluorescentes, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o IP, para verificar a integridade da membrana de espermatozoides bovinos e de outras espécies por citometria de fluxo.

O iodeto de Propídio é um corante não penetrante a membrana plasmática, passando apenas através de membranas danificadas, se ligando especificamente ao DNA. Dessa forma, o IP em solução salina quantifica as células mortas, promovendo fluorescência vermelho-brilhante (Jones e Senft, 1985; Harrison e Vickers, 1990).

O diacetato de carboxifluoresceína é um composto hidrofóbico capaz de penetrar pela membrana celular sem interferência fisiológica. No interior da célula, o diacetato de carboxifluoresceína é hidrolisado por uma interação enzimática e é convertido num composto hidrofílico fluorescente – carboxifluoresceína não penetrante na membrana plasmática, acumulando-se no interior da célula e tornando os compartimentos com membrana íntegra verde fluorescente quando excitados com luz azul (Jones e Senft, 1985; Harrison e Vickers, 1990; Garner et al., 1986). A associação de colorações em combinação com a citometria de fluxo viabiliza o estudo da qualidade espermática uma vez que as avaliações são rápidas e precisas (Rathi et al., 2001; Neil et al., 2005; Silva e Gadela, 2006).

A avaliação da funcionalidade da membrana é realizada pelo teste hiposmótico (HOST). Quando os espermatozoides são submetidos às soluções hiposmóticas, aqueles com membrana funcional sofrem abalamento na região da cauda, visto que aí a membrana plasmática está mais frouxamente aderida. Enquanto o espermatozoide conseguir equilibrar a entrada e saída de fluídos intracelular é sinal de que a membrana plasmática está funcionalmente intacta. Quando o

espermatozóide não suportar mais o stress osmótico a membrana plasmática se rompe e ocorre desespiralização da cauda (Jeyendran et al., 1984).

O teste hiposmótico foi desenvolvido para a avaliação do sêmen de humanos, utilizando-se uma solução a 150mOsm/L contendo citrato de sódio e lactose (Jeyendran et al., 1984). A avaliação da funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide pode ser realizada com o teste hiposmótico utilizando como solução hiposmótica a água destilada (Lomeo e Giambersio, 1991) Este teste foi modificado por Lagares et al., (1998) para avaliação do sêmen equino. Nesta avaliação, uma alíquota de 100 µL de sêmen é adicionada a 200 µL (diluição 1:2) de água destilada, ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por cinco minutos. Após este período, as amostras são analisadas em microscopia de contraste de fase (400x) e 200 células avaliadas. O percentual de espermatozóides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico é calculado por meio de observação da porcentagem de espermatozóides com cauda enrolada, subtraído o existente anteriormente quando da exposição do espermatozóide ao meio hiposmótico.

8.2. Integridade do acrossoma

O acrossoma tem que permanecer intacto antes e durante o trânsito do espermatozóide para o istmo até se ligar a zona pelúcida do oócito. A reação acrossômica prematura incapacita o espermatozóide de se unir a zona pelúcida impedindo a fecundação diminuindo sua viabilidade. Desta forma, é importante avaliar a integridade do acrossoma depois de procedimentos de criopreservação e de fertilização “in vitro”. Esta integridade tem sido avaliada ultimamente com o uso de lectinas e conjugado fluorescente.

A lectina conjugada se liga a carboidratos específicos de glicoproteínas que estão localizados exclusivamente no acrossoma. As lectinas mais comumente usada são a *Pisum sativum agglutinin* (PSA) ou *Arachis hypogaea* (PNA) (Holden et al., 1990). O PNA é mais específico para a membrana acrossomal externa (Cheng et al., 1998; Szasz et al., 2000). Entretanto, o PSA se liga mais especificamente a matriz

acrossomal (Flesch e Gadella 2000). O monitoramento do status acrossomal utilizando PSA foi confirmado por microscopia eletrônica (Casey et al., 1993 e Meyers et al., 1995), no entanto, a mesma possui a desvantagem de se ligar a resíduos de açúcar da zona pelúcida (Skutelsy et al., 1994).

A aglutinina do amendoim (PNA), isolada de sementes de *Arachis hypogaea*, é uma lectina vegetal não glicosilada composta de quatro subunidades idênticas de 27 kDa . As lectinas de leguminosas, uma das famílias de proteínas vegetais mais estudadas, mostram ampla abrangência em suas especificidades por carboidratos, principalmente por carboidratos que têm a terminação β -gal(1-3)galINAc.

O isoticianato de fluoresceína (FITC) é a sonda fluorescente que tem sido conjugada frequentemente a lectinas para avaliar o status acrossomal de espermatozóides de várias espécies (Cross e Meizel, 1989; Kirk, 2001). Por exemplo, pode-se usar o conjugado de PNA-FITC (comprimento de onda ex/em 488/515 nm) (Szasz et al., 2000).

A coloração com FITC-PNA pode ser utilizada sem a permeabilização da membrana plasmática, tornando fluorescente a região acrossômica das células que estão com a membrana acrossomal lesionada. Uma vez que esta sonda conjugada não é penetrante na membrana plasmática, esta somente será capaz de se ligar à membrana acrossomal externa naquelas células em que houve a formação de poros ou danos na membrana plasmática (Kirk, 2001; Rathi et al., 2001).

Diversos padrões de fluorescência representam a fusão parcial da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, característica de células que estão sofrendo a reação acrossômica. A completa fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa indica o fim do processo de reação acrossômica e resulta na perda da membrana acrossômica e, conseqüentemente, não haverá fluorescência do espermatozóide (Cheng, 1996; Blottner, 1998).

8.3. Indução da reação acrossômica

A avaliação induzida da capacitação espermática é um fenômeno que não está totalmente esclarecido. A técnica mais

comumente utilizada para acessar a capacitação espermática é a indução da reação acrossômica (Landim-Alvarenga et al., 2004). No entanto, os métodos utilizados para este fim, são considerados não fisiológicos, já que eles ultrapassam os mecanismos normais de regulação intracelular, promovendo entrada excessiva de cálcio ou induzindo aumento da capacidade de fusão da membrana (Gadella et al., 1995).

As características ultra-estruturais das células espermáticas que sofreram reação acrossômica espontânea são semelhantes às das que foram induzidas quimicamente (Varner et al., 1987). A indução da reação acrossômica é calculada através da subtração da porcentagem total dos espermatozoides reagidos após a indução, da porcentagem de espermatozoides reagidos espontaneamente, sendo um indicador da função acrossomal (Zeginiadou et al., 2000).

A indução da reação acrossômica pode ser realizada utilizando-se vários agentes como: ionóforo de cálcio A23187; heparina; dilaurilphosphatidylcholine (PC12); e lysophosphatidylcholine (LPC) (Varner et al., 1987; Landim-Alvarenga et al., 2004). O espermatozoide equino, nos estudos de fertilização *in vitro*, tem apresentado maior taxa de reação acrossômica à indução com ionóforo de cálcio quando comparado a outros indutores da capacitação espermática (Magistrini et al., 1997). Visconti et al. (1999), estudando a indução da reação acrossômica com o ionóforo de cálcio A23187 em sêmen de camundongos, observaram que este agente pode induzir a exocitose do acrossoma de maneira não regulada, independente de prévia capacitação. O cálcio ionóforo é um íon móvel carreador que forma um complexo lipofílico com o cálcio e facilita seu transporte através da membrana plasmática do espermatozoide (Talbot et al., 1976). Assim, o ionóforo de cálcio A23187 induz a exocitose do acrossoma em meio contendo cálcio como consequência do aumento da concentração de cálcio intracelular, requisito para que ocorra a fusão das membranas associada com a reação acrossômica. Como os ionóforos não são acompanhados de uma fonte de energia, o Ca^{+2} passa do meio extracelular para o

citoplasma seguindo o gradiente eletroquímico quando as células são expostas ao agente. Apesar de não ser um processo fisiológico, sugere-se que o desafio com ionóforo tenha valor na previsão da fertilidade (Januskauskas et al., 2000).

Para avaliação da taxa de espermatozoides reagidos após a indução da RA, é utilizado o conjugado de PNA-FITC

8.4. Avaliação da integridade do DNA

A cromatina do espermatozoide é constituída de histonas, proteínas complexadas ao DNA formando os nucleossomos (Kornberg, 1974; Evenson, 1999). A partir das espermátides arredondadas os nucleossomos sofrem modificações, devido a proteínas de transição que trocam as histonas por protaminas (Green et al., 1994). As protaminas, pequenas proteínas básicas ricas em resíduos de cisteína, estão inicialmente presentes como grupo “thiol”. Estes grupos “thiol” são oxidados em disulfetos durante o processo de maturação espermática no epidídimo, favorecendo a empacotamento mais rígido da cromatina (Bedford e Calvin et al., 1974; Ward e Coffey et al., 1991). Como consequência deste processo, o núcleo do espermatozoide se torna mais resistente ao choque mecânico e a agentes químicos (Ward e Coffey et al., 1991).

A estabilidade estrutural do DNA é avaliada pelo ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA). Esta mensuração é realizada pela susceptibilidade do DNA do espermatozoide a desnaturação ácida (Evenson et al., 1980). Utilizando-se um corante específico o Alaranjado de acridina (AA), o qual se liga a fita dupla do DNA como um monômero e a fita simples como um agregado, é possível avaliar os defeitos presente na fita de DNA. Este resultado característico pode ser facilmente detectado por citometria de fluxo (Love e Kenney, 1998). Na ligação monomérica com excitação de 470 a 490nm o Alaranjado de acridina cora a fita dupla do DNA de verde, com emissão máxima de 530nm. Quando ligado ao agregado (fita simples) resulta numa coloração avermelhada com emissão de 640nm (Ichimura et al., 1971).

Por meio da utilização da citometria de fluxo, a população principal é caracterizada pela porcentagem de espermatozoides maduros (população com

alta densidade, localizada entre os canais 330 e 550 no eixo y). A população secundária é determinada como células espermáticas imaturas ($\text{DNA}^{\text{alto teor}}$), em particular espermátides, as quais tem baixo índice de cromatina condensada.

A quantificação da desnaturação do DNA é determinada pelo índice de fragmentação do DNA ($\text{IDF}^{\text{Indetectável}}$), médio índices de fragmentação ($\text{IDF}^{\text{Médio}}$) e alto índices de fragmentação (IDF^{Alto}) (Love e Kenney, 1998).

CAPÍTULO III

EXPERIMENTOS

O modelo de estudo neste trabalho foi o experimental, o delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com parcela sub-dividida, considerando-se o ganhão como bloco. Os cálculos de média, desvio padrão, análise de variância, teste de Kruskal-Wallis foram realizados conforme Sampaio (2002).

Após avaliação de normalidade e homocedasticidade dos dados foi selecionado o teste Kruskal-Wallis para comparação das médias dos tratamentos para os parâmetros (motilidade total e progressiva, vigor, integridade funcional da membrana, integridade física da membrana plasmática e do acrossoma dos espermatozoides e índice de fragmentação do DNA).

Para comparação dentro de um mesmo tratamento foi utilizado o teste Mann-Whitney na comparação de duas médias. Os valores de distinção estatística para $p < 0,05$ em todos os testes. Utilizou-se o pacote estatístico SAEG[®] como ferramenta.

EXPERIMENTO I. Estudo das proteínas do plasma seminal de animais domésticos utilizando cromatografia de exclusão molecular.

1. Introdução

O plasma seminal fornece substâncias essenciais para a manutenção e preservação da viabilidade espermática. Este difere quimicamente de outros fluidos corporais, pois apresentam excepcionalmente amino ácidos livres, ácido glutâmico e pequenas moléculas (Mann e

Lutwak-Mann, 1981). A função dos constituintes do plasma seminal ainda não é bem entendida, principalmente as proteínas. Há evidências que esses componentes do plasma seminal estão ligados diretamente ao metabolismo espermático (Mann, 1975), a processos de fertilização como a capacitação (Manjunath et al., 2002) e a preservação do sêmen contra processos oxidativos e fagocitários (Mann e Lutwak-Mann, 1981; Katila 1997).

Os estudos dos constituintes protéicos do plasma seminal tem se tornado de grande interesse na biotecnologia animal, enfatizado por investigações de biomarcadores (Martinez-Heredia et al., 2006), bem como de proteínas com função relacionadas aos mecanismos de fertilização (Perreault et al., 1982; Gadella et al., 2001; Moura et al., 2006).

Contudo, há varias técnicas empregadas que favorecem a identificação das proteínas (Pilch e Mann, 2006). Entretanto, variações nas estruturas, bem como, na função das proteínas são causadas por solventes orgânicos entre outros reagentes que podem favorecer a desnaturação protéica. A utilização da cromatografia de exclusão molecular apresenta características que possibilitam a utilização da mesma fração protéica para mais de uma análise, em condições específicas (Laurent and Killander, 1964). A técnica enfoca além da separação por volume hidrodinâmico (massa molecular), a utilização de tampões de baixa força iônica (até 200mM) que minimizam a interação proteína com íons da solução tampão. Além disso, a separação molecular ocorre simplesmente pela relação da fase estacionária com a fase móvel (Harris , 1999).

No estudo das proteínas durante mais de trinta anos tem sido usado a cromatografia de exclusão molecular também chamada de filtração em gel como ferramenta de purificação de enzimas, polissacarídeos e proteínas (Porath et al., 1959; Determann e Michel 1966; Silva Junior, 2004). Seu valor depende em parte da natureza especial das macromoléculas estudadas pelos bioquímicos e em parte na confiança deles na simplicidade da técnica de filtração de gel como uma técnica de

separação (Andrews, 1965; Silva Junior, 2004).

O objetivo deste trabalho foi usar a aplicação da técnica de cromatografia de exclusão molecular na identificação das proteínas do plasma seminal de três diferentes espécies animais: *equina*, por ser uma espécie sazonal com aumento da atividade sexual durante o período de dias longos, o que acarreta mudanças na fisiologia das glândulas sexuais e aumento na função endócrina testicular; *canina*, por apresentar apenas a próstata como glândula sexual acessória; e *caprina*, por ser um ruminante com características reprodutivas sazonais, com aumento da atividade sexual durante o período de dias curtos, além do seu alto valor zootécnico, sinalizando uma interessante e promissora linha de pesquisa. Além de possibilitar a obtenção de amostras protéicas para posteriores estudo de caracterização e funcionalidade.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e Coleta do sêmen

▪ *Sêmen Equino* - Foi coletado um ejaculado de seis garanhões (5-20 anos) e dez ejaculados de apenas um garanhão (14 anos), usando uma vagina artificial ("modelo" Hannover). Apenas ejaculados contendo um mínimo de 50% de espermatozoides com motilidade progressiva foram usados no estudo. Todas as amostras foram resfriadas até 5°C com uma taxa de resfriamento - 1°C/min (Pruit et al 1993).

▪ *Sêmen Canino* - Dois ejaculados de cinco cães (3 a 8 anos) (n=10) foram coletados através de manipulação manual (Linde-Forsberg, 1991). A amostra do ejaculado foi avaliada quanto à motilidade progressiva e somente amostras com valor acima de 70% foram utilizadas. Todas as amostras foram resfriadas até 5°C para preservar proteínas do plasma seminal, com uma taxa de resfriamento de -0,5 °C/min (Zindl et al, 2006).

▪ *Sêmen Caprino* - Um ejaculado de dois bodes (5 e 7 anos) foi coletado usando vagina artificial e uma fêmea em estro induzido. Os ejaculados contendo um mínimo de 50% de espermatozoides com motilidade progressiva foram usados no estudo. Os ejaculados foram colhidos em um funil e tubo graduado. As amostras foram resfriadas a 5 °C com taxa de resfriamento 1,07°C/min.

2.2 Preparo das amostras protéicas

▪ *Sêmen Equino* - Para se obter as proteínas do plasma seminal equino o sêmen foi centrifugado (600 x g) por 10 min a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e a solução foi fracionada com sulfato de amônio 36% (Peso/Volume), mantido em agitação por 30 min a temperatura de 0°C, posteriormente em repouso por mais 30 min a 0°C. Novamente as amostras foram centrifugadas (600 x g a 4°C por 30 min), o sobrenadante foi dializado (8000x) por 24 horas, com membrana de exclusão de 1000 Da, em solução 0,5% de ácido acético (HAc), as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. A amostra liofilizada foi ressuspensa em 500 µL de Cloridrato de trihidroxiaminometano (TRIS-HCl) 25 mM pH 7,4. A concentração de proteína foi espectrofotometricamente avaliada (espectrofômetro gravador UV-visível Shimadzu-160A) a 215 nm (Harris e Bashford, 1987). Uma alíquota (10µL) das amostras das espécies em estudo foi aplicada em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE gradiente 5% a 20%; o restante da amostra foi cromatografada em sistema FPLC (Cromatografia líquida de baixa pressão) em coluna de exclusão molecular Superose 12.

▪ *Sêmen Canino* - O sêmen foi centrifugado (600xg) por 10 min à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi retirado e dividido em cinco alíquotas, sendo adicionado (5, 10, 15, 30 e 36% w/v) de sulfato de amônio respectivamente, mantido em agitação por 30 min a temperatura de 0 °C e em repouso por mais 30 min a 0 °C. Novamente foram centrifugadas (600 g a 4 °C por 30 min), o sobrenadante foi dializado (fator de diluição de 8000x) por 24 horas com membrana de exclusão de 1000 Da, em solução aquosa de 0,5% (v/v) de ácido acético (HAc), liofilizado e armazenado a -20°C. A amostra liofilizada foi ressuspensa em 1000 µL de Cloridrato de trihidroxiaminometano (TRIS-HCl) 25 mM pH 7,4. A concentração de proteína foi espectrofotometricamente avaliada (espectrofômetro gravador UV-visível Shimadzu-160A) a 215 nm (Harris e Bashford, 1987). Uma alíquota (20 µL) das amostras das espécies em estudo foi aplicada em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE gradiente 5% a 20%; o restante da amostra

foi cromatografada em sistema FPLC (Cromatografia líquida de baixa pressão) em coluna de exclusão molecular Superose 12.

▪ *Sêmen Caprino* – Para se obter as proteínas do plasma seminal caprino. Diferentemente, às outras duas espécies o plasma seminal não sofreu nenhum tipo de tratamento com sulfato de amônio, com o intuito de avaliar a interação do sal sobre o processo de purificação. O sêmen foi centrifugado (2000 x g) por 10 min a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado uma alíquota de 20 µL da amostra e foi adicionado a essa alíquota 180 µL Cloridrato de trihidroxiaminometano (TRIS-HCl) 25 mM pH 7,4. A estimativa da concentração de proteína foi espectrofotometricamente avaliada (espectrofômetro gravador UV-visível Shimadzu-160A) a 215 nm (Harris e Bashford, 1987). Uma alíquota (20µL) das amostras das espécies em estudo foi aplicada em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE gradiente 5% a 20%; o restante da amostra foi cromatografada em sistema FPLC (Cromatografia líquida de baixa pressão) em coluna de exclusão molecular Superose 12.

2.3 Análises eletroforese (Sistema SDS-PAGE)

Um sistema de eletroforese contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado para separar cadeias polipeptídicas das frações de amostras. Utilizou-se o procedimento de Laemmli et al, (1970) para eletroforese. Foram usadas placas de dimensões 16 x 15 cm, espaçadores de 1,5 mm e pente de 15 canaletas (13x1,5 mm). Foram confeccionado géis com gradiente, na faixa de 5% a 20 % de acrilamida (Anexo 1), permitindo o fracionamento mais nítido da mistura de proteínas em virtude do efeito do peneiramento molecular. Utilizaram-se proteínas marcadoras com peso molecular conhecido para se determinar o tamanho das moléculas de proteínas da amostra. Após a introdução das amostras de proteínas nas cavidades do gel, aplicou-se corrente elétrica de 120V durante um período de aproximadamente 5 horas. O Gel foi corado pelo método da prata coloidal (Gershomi e Palade, 1983).

2.4 Cromatografia

Primeiro foi realizado estudo de validação analítica da coluna de gel-filtração Superose 12 HR 10/30 (Amersham Pharmacia), volume total (Vt) 24 mL com limite de separação de 300kDa a 1kDa, de modo que a variação da faixa de concentração fosse adequada ao tipo de amostra a ser estudada. A definição dos diferentes solutos entre as duas fases cromatográficas foi estabelecida pelo parâmetro Kav. O valor foi dado pela equação $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ onde; V_e = Volume de eluição de um soluto qualquer; V_t = volume de retenção máxima do gel; V_o = volume de eluição de uma substância de alto peso molecular que não penetra no interior das partículas do gel (Azul dextran).

Como os valores de Kav são uma função inversa do logaritmo de seus pesos moleculares é possível estimar o peso molecular de uma proteína desde que se determinem os valores de Kav.

Essa relação matemática pode ser expressa por uma reta chamada de *curva analítica*, descrita pela equação $y = ax + b$.

Foram utilizados vários calibrantes de peso moleculares (Sigma): β-Amilase (200kDa); Alcool Desidrogenase (150 kDa); Albumina Bovina (66 kDa); Anidrase Carbonica (29 kDa); Citocromo C (12,4 kDa); Aprotinina (6,5 kDa). As amostras de proteína do plasma seminal de cada um dos animais foram dissolvidas em um volume de 200 a 500µL de (Tris-HCl), 25 mM, pH 7,4 de acordo com a espécie e aplicadas em um aparelho de Cromatografia líquida de baixa pressão (sistema- FPLC) em uma coluna Superose 12 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) equilibrada com o mesmo tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,4.

3. Resultados

3.1. Calibração Cromatográfica

A coluna Superose 12 para exclusão molecular além de fornecer uma separação das proteínas através do volume hidrodinâmico (massa molecular), quando calibrada apresenta-se como uma ferramenta adequada para estimativa das massas moleculares das amostras de proteínas. Com a equação descrita, $y = ax + b$, a relação linear simples será válida para um determinado intervalo de massa molecular (Figura 1).

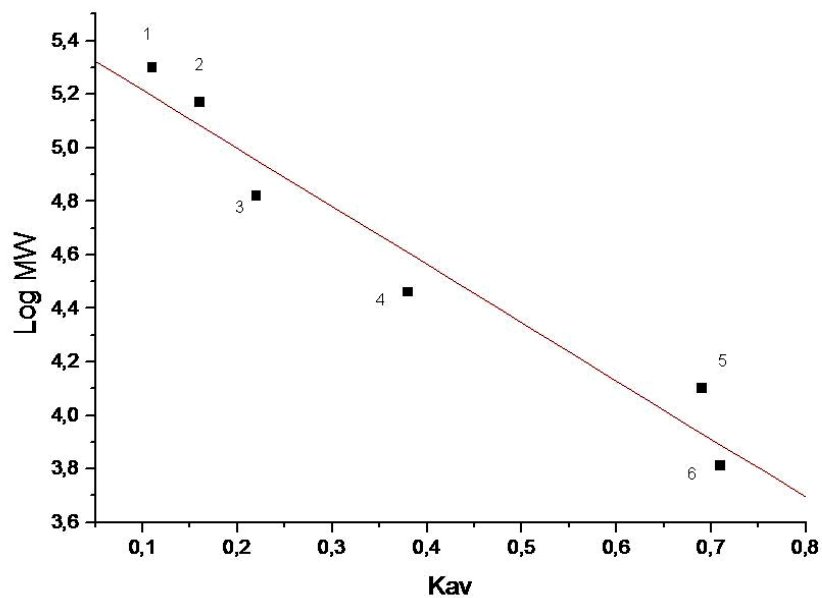


Figura 1. Resultado da calibração da coluna de gel filtração $y = a + bx$; parâmetros (valor, erro): $a = 5,43, 0,115$; $b = - 2,175, 0,256$; $R^2 = 0,973$; $p < 0,001$. Tampão Tris-HCl, 25mM, pH 7.4. Razão de fluxo 0,5 mL/min; volume de fração 1,5 mL. Calibradores: (1) β -Amilase (200kDa); (2) Alcool Desidrogenase (150 kDa); (3) Albumina Bovina (66 kDa); (4) Anidrase Carbônica (29 kDa); (5) Citocromo C (12,4 kDa); (6) Aprotinina (6,5 kDa). Volume de Exclusão (V_0) = 7,64 mL. Volume Total (V_t) 24 mL.

3.2. Cromatografia de proteínas plasma seminal eqüino

A eletroforese, gel SDS-PAGE gradiente 5 a 20%, do plasma seminal dos seis garanhões estudados enfatiza a homogeneidade das amostras após o tratamento com precipitado de sulfato de

amônio 36% (Peso/Volume) como mostrado na Figura 2.

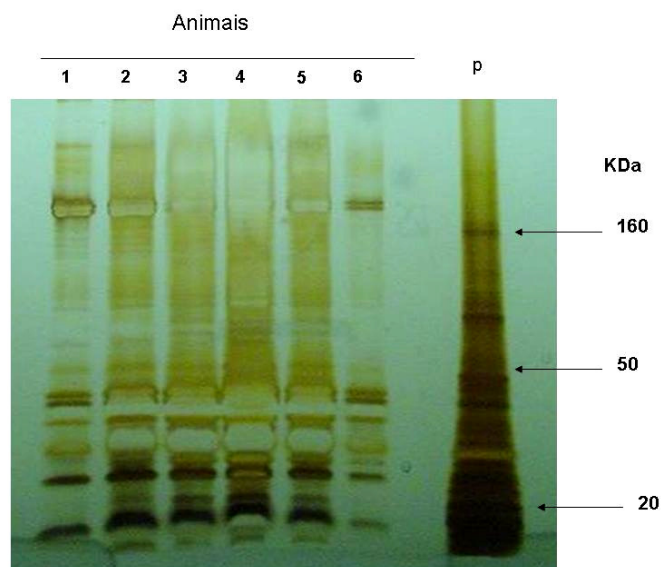


Figura 2. Eletroforese, gel SDS-PAGE gradiente 5 a 20% de acrilamida, das amostras de plasma seminal de seis garanhões após tratamento com 36% de sulfato de amônio e diálise (8000 x) com membrana de exclusão 1000Da. Voltagem 110V. Coloração prata coloidal.

As amostras de plasma seminal eqüino após o tratamento com sulfato de amônio foram aplicadas no sistema de FPLC em uma coluna de exclusão molecular Superose 12. O perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal eqüino é representado por 15 frações, com quatro

picos de retenção distintos (Figura 3). Com o cálculo da relação altura-largura do pico foi possível obter o tempo de retenção. Observa-se uma similaridade dos tempos de retenção dos quatro picos enumerados entre as amostras de proteínas do plasma seminal dos seis animais estudados (Tabela1).

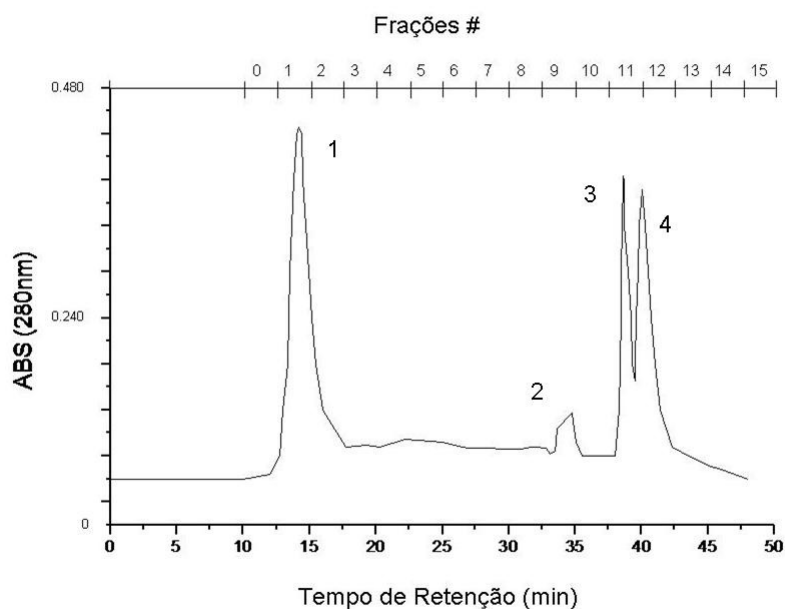


Figura 3. Perfil cromatográfico típico das amostras de proteínas do plasma seminal eqüino (n=6). Cromatografia em coluna de exclusão molecular Superose 12 HR 10/30 em FPLC. Volume da amostra: 200µl. Fase móvel: Tris-HCl, 25mM, pH 7,4. Absorbância em 280 nm dos diferentes picos, representados por quatro tempos de retenção e quinze frações coletadas. Fluxo de 0,5mL/min, volume da fração 1,5 mL.

Tabela 1. Valores dos tempos de retenção das proteínas cromatografadas por cromatografia de exclusão molecular dos seis garanhões estudados.

Tempo de Retenção (min) - (Superose 12-Filtração)				
Animal	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
1	14,7	34,8	38,7	40,7
2	15,1	34,5	38,9	40,9
3	15,2	35,0	39,0	40,0
4	14,9	35,7	39,7	40,7
5	14,6	35,1	39,6	40,6
6	14,9	34,9	39,1	40,1

A Tabela 2, abaixo, enfoca os dados da determinação relativa de proteínas do plasma seminal eqüino, em observação nos quatro tempos de retenção no cromatograma (Figura 3), os dados corroboram aos

apresentados na Tabela 1, quanto aos tempos de retenção, enfatizando a similaridade dos resultados apresentados na cromatografia de exclusão molecular.

Tabela 2. Determinação relativa de proteínas do plasma seminal eqüino, dos quatro tempos de retenção após cromatografia de exclusão molecular.

Determinação relativa de proteínas – (Da)				
Animal	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
1	295120,9	13803,8	7585,8	5495,4
2	275422,9	14454,4	7244,4	5370,3
3	275422,9	13182,6	7244,4	6165,9
4	288403,2	12022,6	6456,5	5495,4
5	301995,2	13182,6	6606,9	5623,4
6	288403,2	13489,6	7079,5	6025,6

O cálculo da determinação relativa de proteínas foi realizado utilizando os dados da calibração da coluna de gel filtração $y = 5,43 + (-2,175) K_{av} - (K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o)$; Volume de eluição (V_e) = TR x (Fluxo); TR = Tempo de retenção; Volume de Exclusão (V_o) = 7,64 mL; Volume Total (VT) = 7,64 mL.

A eletroforese das 12 frações observadas após cromatografia de exclusão molecular mostrou a separação da mistura de proteínas de acordo com a sua massa molecular. Correlacionando o perfil cromatográfico (Figura 3) com SDS-PAGE

(Figura 4) abaixo, é possível concluir que a técnica de exclusão molecular é caracterizada pela separação de proteínas de alto peso molecular seguido pelas de baixo peso molecular.

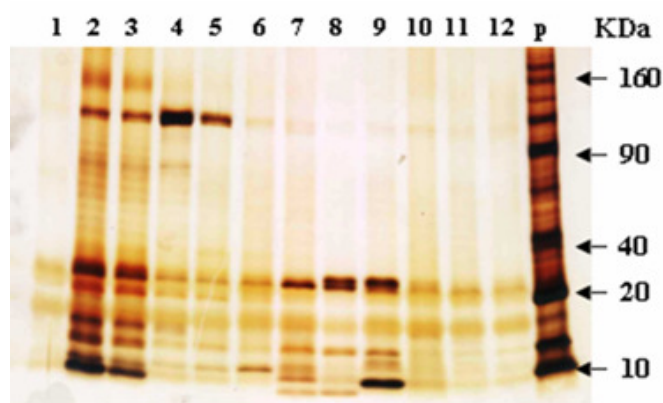


Figura 4. Eletroforese, SDS-PAGE gradiente 5 a 20% de acrilamida, das doze frações coletadas após cromatografia de exclusão molecular. Coradas com prata coloidal.

As proteínas do plasma seminal foram também avaliadas quanto à diferença da concentração protéica de onze ejaculados do mesmo garanhão. As amostras de plasma seminal foram coletadas durante o período de estação de monta (setembro-fevereiro) (2004-2005). A concentração média de proteína total dos ejaculados é de 3,39 $\mu\text{g/mL}$. A média e o desvio padrão dos onze tempos de retenção (TR) foram apresentados na Tabela 3. Observou-se uma variação da concentração protéica entre os ejaculados, principalmente, entre os tempos de retenção $14,76 \pm 0,21$ e $40,81 \pm 1,15$ min, sugerindo uma relação inversa entre a concentração de proteína entre estes dois tempos de retenção (Tabela 3).

Exemplificando o que foi observado na Tabela 3, os ejaculados B, D e K apresentam maior heterogeneidade nos tempos de retenção maior (40,81) e menor (14,76), demonstrada pela concentração protéica B (0,40 $\mu\text{g/mL}$), D (0,60 $\mu\text{g/mL}$) K (2,58 $\mu\text{g/mL}$) e B (0,40 $\mu\text{g/mL}$), D (2,36 $\mu\text{g/mL}$); K (0,49 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Interessante observar que parece haver compensação na variabilidade da concentração protéica nos tempos de retenção maior e menor, ou seja, a concentração menor no tempo menor é compensada com concentração maior no tempo maior e vice-versa.

Tabela 3. Concentração protéica de picos cromatográficos de onze ejaculados de um mesmo garanhão, com quatro tempos de retenção específicos, durante a estação de monta de (2004 a 2005).

Ejaculados (Concentração de proteína - $\mu\text{g/mL}$)											TR- (min)
A	B	C	D	E	F	G	H	E	J	K	
1,40	0,40	0,80	2,36	2,12	1,80	0,99	1,70	2,83	1,74	0,49	$14,76 \pm 0,21$
0,18	0,08	0,16	0,21	0,17	0,11	0,14	0,11	0,12	0,16	0,11	$35,32 \pm 1,22$
0,15	0,24	0,53	0,30	0,26	0,28	0,36	0,22	0,07	0,35	0,20	$39,43 \pm 0,87$
1,70	2,92	1,40	0,60	1,13	1,51	1,90	1,40	0,59	0,46	2,58	$40,81 \pm 1,15$

OBS. Onze ejaculados de um garanhão avaliados por cromatografia de exclusão molecular com respectivos tempos de retenção (média \pm SD). Identificada a concentração protéica de cada tempo de retenção. TR (Tempo de retenção).

3.3. Cromatografia de proteínas plasma seminal canino

Eletroforese das proteínas do plasma seminal de cinco cães, após tratamento com 5 % de sulfato de amônio (Peso/Volume).

Todas as amostras apresentaram proteínas de massa molecular de 90kDa a 10kDa, semelhante ao relatado por Stubbs e Resnick (1978), demonstrando a homogeneidade das amostras (Figura 5).

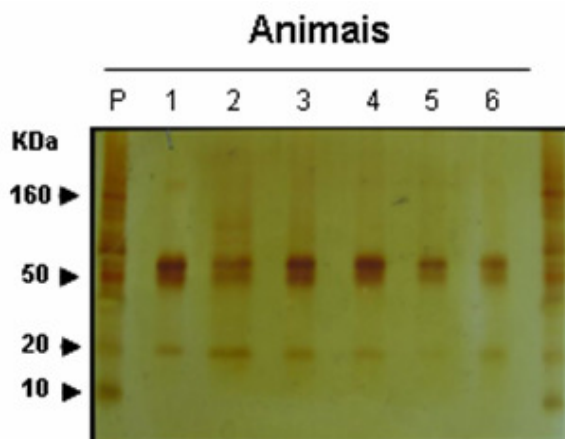


Figura 5. SDS-PAGE gradiente de 5 a 20% de acrilamida das amostras de proteínas do plasma seminal canino após tratamento com sulfato de amônio. Corada por prata coloidal.

Após avaliação da homogeneidade das amostras, elas foram aplicadas em uma coluna de superose 12 em um sistema FPLC. O cromatograma da exclusão molecular das

proteínas totais do plasma seminal está representado por 13 frações distintas (Figura 6).

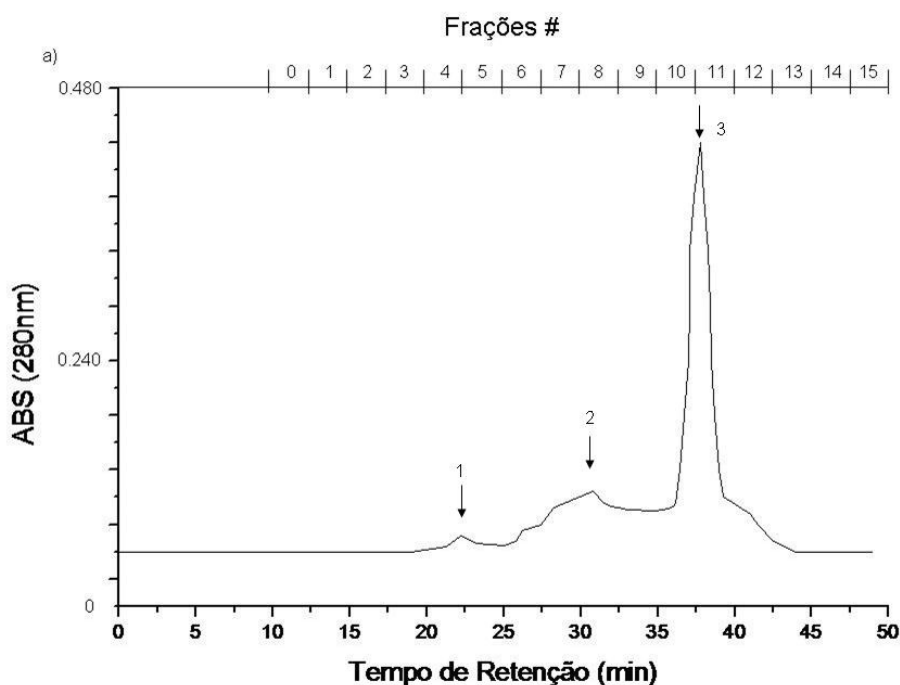


Figura 6. Cromatograma em Gel filtração das proteínas do plasma seminal Canino (ejaculados n= 10) utilizando uma coluna Superose 12 HR 10/30 em sistema cromatografia líquida de baixa pressão (FPLC). Volume da amostra: 500µl. Tampão: Tris-HCl, 25mM , pH 7,4. Absorbância em 280 nm dos diferentes picos, representados por três tempos de retenção e quinze frações coletadas. Razão de fluxo 0,5mL/min, volume da fração 1,5 mL.

A eletroforese das amostras (Figura 6) ressalta uma pequena separação das proteínas totais. Contudo, pela cromatografia de exclusão molecular, é possível enfatizar essa separação uma vez que a amostra total foi separada em 13 frações distintas.

A análise dos picos de retenção do plasma seminal é apresentada na Tabela 4. Todos os dois ejaculados de cada um dos cinco animais apresentaram picos de retenção similares. Foi calculada a média de

cada amostra, relacionada a cada ejaculado do animal estudado, comprovando a repetibilidade da técnica representada pela concordância entre os resultados das medições. A concentração de proteína presente nos ejaculados após o tratamento com sulfato de amônio foi calculada através da leitura em 215nm em espectrofotômetro (espectrofotômetro gravador UV-visível Shimadzu-160A) de acordo com (Harris e Bashford, 1987).

Tabela 4. Valores da estimativa de proteína total e dos tempos de retenção das amostras de plasma seminal canino.

Animal	Proteína Total (mg/mL)	Tempo de Retenção (min) (Superose 12- Filtração)		
		Pico 1	Pico 2	Pico 3
1	4,3	23,20	30,58	37,61
2	3,9	23,19	30,59	37,72
3	4,2	23,11	30,78	37,52
4	4,3	23,15	30,70	37,80
5	3,6	23,17	30,97	37,30

Os valores dos tempos de retenção equivalente a cada animal é dado pela média de dois ejaculados (n=10).

Não se observa uma variação da estimativa da concentração de proteína do plasma seminal canino e nem uma variação entre os tempos de retenção dos animais estudados. A confirmação destes dados é

dada também pelo cálculo da determinação relativa de proteínas (Tabela 5) enfatizando a repetibilidade da técnica de cromatografia de exclusão molecular, baseada na calibração da coluna de superose 12.

Tabela 5. Determinação relativa de proteínas do plasma seminal canino, dos três picos após cromatografia de exclusão molecular.

Animal	Determinação relativa da massa molecular (Da)		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3
1	81283,1	26302,7	8912,5
2	81283,1	26302,7	8709,6
3	81283,1	25118,9	8912,5
4	81283,1	25703,9	8709,6
5	81283,1	24547,1	9332,5

O cálculo da determinação relativa de proteínas foi realizado utilizando os dados da calibração da coluna de gel filtração $y = 5,43 + (-2,175) K_{av}$.

3.4. Cromatografia proteínas plasma seminal caprino

O gel de eletroforese gradiente 5 a 20% de acrilamida das amostras de plasma

seminal caprino de dois animais, apresenta bandas protéicas com massa de 90kDa a 10kDa como indicado na (Figura 7).

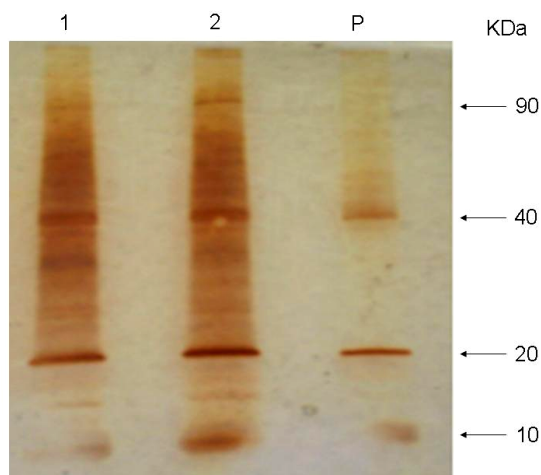


Figura 7. Eletroforese SDS-PAGE gradiente de 5 a 20% de acrilamida das amostras de plasma seminal caprino sem tratamento de sulfato de amônio.

Análise cromatográfica das amostras do plasma seminal caprino tem como característica no cromatograma cinco picos

de retenção (Tabela 6) com 15 frações coletadas (Figura 8).

Tabela 6. Valores dos picos de Retenção das amostras de plasma seminal caprino.

Animal	Tempo de Retenção (min) - (Superose 12- Filtração)				
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5
1	15,6	24,5	27,9	34,9	43,9
2	15,9	24,7	28,2	35,1	43,7

Os resultados são também expressivos quanto à repetibilidade da técnica, visto que

pela determinação relativa de proteínas não há diferença entre os resultados (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação relativa de proteínas do plasma seminal caprino, dos cinco picos após cromatografia de exclusão molecular.

Animal	Determinação relativa da massa molecular - (Da)				
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5
1	251188,6	63095,7	39810,7	12589,3	3162,3
2	251188,6	63095,7	39810,7	12589,3	3162,3

O cálculo da determinação relativa de proteínas foi realizado utilizando os dados da calibração da coluna de gel filtração $y = 5,43 + (-2,175) \text{ Kav}$.

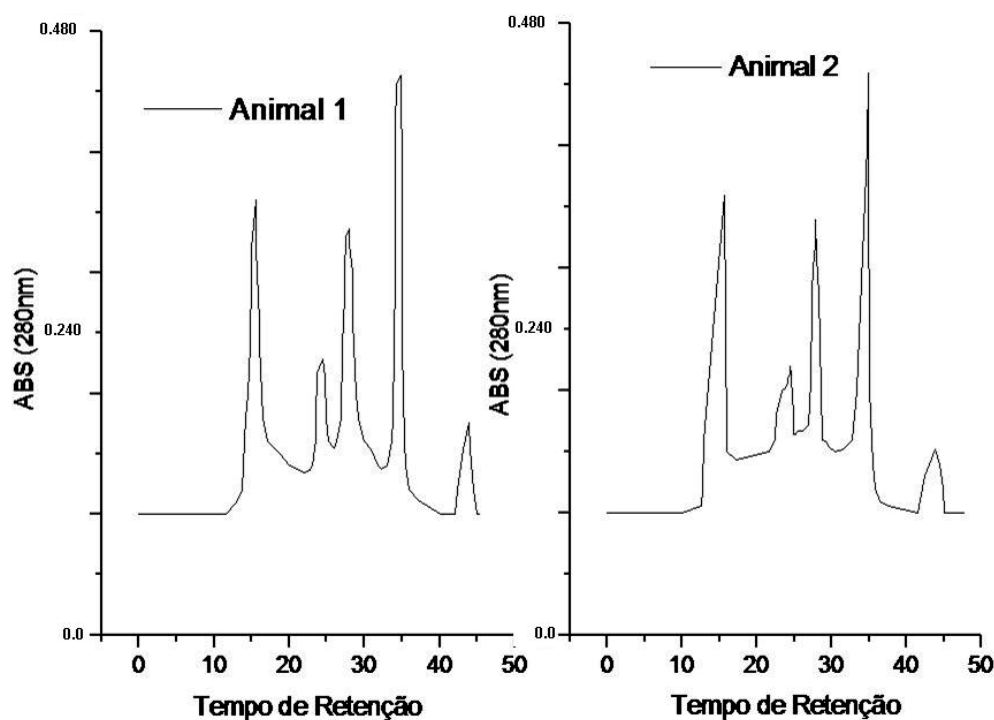


Figura 8. Cromatograma em gel filtração das proteínas do plasma seminal caprino (n= 2) utilizando coluna Superose 12 HR 10/30 em sistema de cromatografia líquida de baixa pressão (FPLC). Volume da amostra: 200 μ l. Tampão: Tris-HCl, 25mM; pH 7,4. Absorbância em 280 nm dos diferentes picos, representados por cinco tempos de retenção. Razão de fluxo 0,5mL/min, volume da fração 1,5 mL.

A similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos para os diferentes animais foi avaliada através da comparação dos picos de retenção dos sinais cromatográficos observados (Figura 18) e quantificados na Tabela 6 (acima apresentados)

4. Discussão

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram a aplicabilidade da técnica de cromatografia de exclusão molecular para o estudo dos constituintes protéicos do plasma seminal de mamíferos. Em todos os experimentos que foram realizados, após a obtenção do perfil cromatográfico verificou-se que ocorreu uma separação molecular de proteínas de pesos moleculares significativamente diferentes, quantificada pela relação logarítmica entre o peso molecular e o volume de eluição (Harris , 1999). Isso é reforçado pela relação entre o perfil cromatográfico e eletroforético, no estudo

comparativo entre os ejaculados e o pico de retenção obtido dos mesmos animais.

A utilização de sulfato de amônio torna-se uma poderosa ferramenta auxiliar no processo de purificação de proteínas, visto que pelas suas propriedades iônicas é possível separar as moléculas de interesse do plasma seminal das células espermáticas presentes no meio. Todavia, cuidados devem ser tomados para a própria separação das moléculas de interesse, principalmente, quanto à temperatura, o pH, à densidade do meio, à concentração de proteínas totais e à própria concentração do sal (Dixon e Webb 1961), pois sem os cuidados desejados a separação será ineficiente e poderá ocorrer contaminação nas amostras de estudo.

Os resultados obtidos em conjunto pela cromatografia de exclusão molecular e precipitação com sulfato de amônio apresentam-se como técnicas satisfatórias para estudos de proteínas do plasma seminal de mamíferos, a qual é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia em que são avaliadas todas as

características de desempenho da metodologia de estudo, (tempo de retenção, determinação relativa da massa molecular, perfil cromatográfico) (Ribani et al., 2004).

Os equinos são animais sazonais que apresentam aumento da atividade sexual durante o período de dias mais longos (setembro a fevereiro), acarretando mudanças na fisiologia das glândulas sexuais com um grande aumento na função endócrina testicular. Esta sazonalidade leva a mudanças nos componentes do plasma seminal (Mann e Lutwak-Mann, 1981; Yanagimachi, 1994). O fluido da porção do sêmen consiste de um conjunto de substâncias originadas do epidídimo e das glândulas sexuais (Amam et al., 1985). Desta forma, o ejaculado que é constituído de espermatozoides e plasma seminal, apresenta características estruturais e bioquímicas diferenciadas, respectivamente (Janett et al., 2003a; Janett et al 2003b; Töppfer-Petersen et al 2005).

A constituição das características bioquímicas do plasma seminal é bem dependente de fatores externos, que podem favorecer a mudanças de componentes essenciais, no líquido seminal. Desta forma, o modo de coleta, a nutrição do animal, o estado clínico e a qualidade de vida dos animais, podem favorecer mudanças bioquímicas no conteúdo seminal, podendo ocasionar alterações na produção de proteínas essenciais para a manutenção, armazenamento e qualidade das células espermáticas (Mann, 1975; Mann e Lutwak-Mann, 1981; Yanagimachi, 1994).

No presente trabalho foi observado que ejaculados do mesmo animal não apresentaram variação na concentração protéica após o tratamento com sulfato de amônio e sim, uma variação na constituição da fração protéica. Já é conhecido que coletas diárias apresentam variação na qualidade espermática e mudança na constituição do plasma seminal (Mann, 1975). Este resultado vem corroborar a hipótese de que ejaculados do mesmo animal tem características bioquímicas diferentes, como relatadas por Mann e colaboradores (1967).

5. Conclusão

A técnica de cromatografia de exclusão molecular vem contribuir para estudo do perfil protéico do plasma seminal de mamíferos. A mesma é uma ferramenta precisa na separação das proteínas totais do plasma seminal. Através da análise dos cromatogramas é possível observar a diferença do perfil protéico das diferentes espécies, referentes à constituição protéica do plasma seminal. Contudo, há uma repetibilidade dos cromatogramas entre indivíduos da mesma espécie, demonstrando a acurácia da técnica na análise de proteínas do plasma seminal.

EXPERIMENTO II. Purificação e caracterização parcial de inibidores de serino protease no plasma seminal equino.

1. Introdução

Espermatozoides adquirem a habilidade para fertilizar o óvulo durante o processo conhecido como maturação pós-testicular mediado por diferentes proteínas (Yanagimachi, 1988). Algumas dessas proteínas estão presentes nos fluidos seminais podendo atuar como inibidores ou ativadores de processos relacionados à fertilização (Mann, 1975).

Os inibidores de serino proteinase são ferramentas naturais importantes por regular a atividade proteolítica das proteinases como também sinalizar interações com receptores (Bode e Huber, 1992; Perreault et al., 1982). Inibidores de serino proteinases foram descobertos e caracterizados (Bode e Huber, 1992) no plasma seminal de touros (Lewis et al., 1985), ratos (Lai et al., 1991) e porco-da-india (Winnica et al., 2000). O estudo de inibidores de proteinase do plasma seminal pode ajudar na compreensão das mudanças que acometem as funções protéicas bem como nas interações de proteína-proteína. Os fenômenos posteriores podem modular funções no espermatozoide como capacitação, hiperativação e reação acrossômica (Perreault et al., 1982; Bedford, 1970). Inibidores de serino proteinase atuam como fator decapacitante (Boettger-Tong et al., 1992) podendo prevenir a penetração do espermatozoide "in vitro" na zona pellucida de ovócitos de mamíferos (Fraser, 1982; Jansen et al., 1998). Considerando que este

inibidor se liga à região acrosomal do espermatozóide, é sugerido que ele possa atuar no processo de fertilização (Lai et al., 1991).

O presente experimento objetivou: a) isolar e identificar os inibidores de serino protease presente no plasma seminal eqüino; b) avaliar o potencial de inibição da enzima; c) explorar comparativamente os inibidores naturais e sintéticos de serino protease quanto á sua atividade inibitória no mecanismo enzimático da serino protease (tripsina-bovina); e d) avaliar a correlação entre a concentração de total proteína e de inibidor de serino protease do plasma seminal com a maturidade sexual dos garanhões.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta de sêmen, purificação e preparo de amostras protéicas

A coleta do sêmen e a metodologia empregada neste experimento foram realizados tal como descritos no experimento I.

2.2. Método analítico cinético e atividade enzimática

O estudo de inibição enzimática foi realizado através do bloqueio da atividade amidásica da tripsina bovina sobre o substrato 3-N-alpha-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide ($DLBAPNA$) (Ascenzi et al., 1981) em presença dos inibidores Benzamidina (BZ), Berenil (BN) e Inibidor Purificado eqüino (ip).

Inicialmente, foi preparado um soluto-estoque de tripsina bovina, contendo 1mg/mL em solução HCl 1mM pH 3,0. O soluto-trabalho era pipetado para uma concentração final (3 μ g/mL). A solução $DLBAPNA$ de uso (55 μ M) foi preparada diluindo-se o soluto-estoque (900 μ M) no tampão do ensaio (Tris-HCl 25mM, pH 7,4).

Os solutos-estoque dos inibidores: Benzamidina (BZ) (1,28mM), Berenil (0,38mM), (ip) inibidor purificado (0,4 μ M) foram preparados em solução tampão do ensaio. A solução de uso Benzamidina (5,0 μ M ; 7,5 μ M; 9,0 μ M), BN (1,0 μ M; 2,5 μ M; 5,0 μ M), ip (0,4 μ M), nas diversas concentrações foi preparadas para um volume final de 1mL. A diluição dos inibidores do soluto-estoque era feita no tampão do ensaio (Tris-HCl 25mM, pH 7,4).

Em seguida, foram misturados 3,6 μ L do soluto-estoque da enzima tripsina

a (3,9 μ L; 5,9 μ L e 7,0 μ L) de Benzamidina; (2,6 μ L; 6,5 μ L; 13,2 μ L) de Berenil e 100 μ L (ip), nas devidas concentrações dos inibidores, em tubos separados. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37^oC. A seguir foi adicionado 61 μ L do substrato $DLBAPNA$ (900 μ M) completando-se, com tampão de ensaio, um volume final de 1mL . As misturas foram incubadas a 37^oC e monitoradas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160A), com controlador de temperatura, em comprimento de onda 410 nm, durante 10 minutos.

O controle, para acertar o zero de absorvância, continha 61 μ L de $DLBAPNA$ mais 939 μ L de tampão do ensaio.

Atividade enzimática

A identificação da atividade enzimática das frações protéicas, separadas por cromatografia em (FPLC) superose 12 e (RP-HPLC) C_{18} , foi avaliada quanto ao bloqueio da atividade amidásica com 3-N-alpha-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilida ($DLBAPNA$), na presença de Tripsina Bovina, de acordo com o método de Ascenzi et al (1981).

Alíquotas de 100 μ L das frações protéicas foram retiradas, acrescentando-se (3 μ g/mL) de Tripsina Bovina, (55 μ M) $DLBAPNA$ e completadas com tampão Tris-HCl 25mM pH 7,4 até um volume final de 1mL. A seguir as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37^o C. Ao fim da incubação foram acrescentados 100 μ L de acido acético 60% (v/v) e detectadas em absorvância em 410 nm em espectrofotômetro (UV-visible - Shimadzu UV-160A).

O controle, para acertar o zero de absorvância, também continha 61 μ L de $DLBAPNA$ mais 939 μ L de tampão do ensaio.

2.3. Análise Cromatográfica

A amostra liofilizada foi ressuspendida em Tris-HCl, 25mM, pH 7,4 (500 μ l) e aplicada em uma coluna de gel Filtração (Superose12 HR 10/30) (Amersham-Pharmacia), previamente equilibrada com o mesmo tampão, em aparelho de Cromatografia líquida de baixa pressão (sistema FPLC), (Amersham-Pharmacia). Foi utilizado fluxo 0,5 mL/min coletado um volume 1,5 mL por tempo de 3min.

Após a coleta das frações protéicas as amostras foram levadas para o concentrador a vácuo “speed Vac” para redução do volume da amostra. A proteína de estudo foi detectada através da atividade enzimática inibitória, explicada anteriormente (Ver 2.2). Uma vez identificada à fração que apresentava o inibidor de serino protease essa amostra foi aplicada em uma coluna de fase reversa C₁₈ (column Shim-pack CLC-ODS M) (Amersham-Pharmacia), acoplada em aparelho de cromatografia líquida de alta pressão (RP-HPLC) (Shimadzu). As proteínas foram detectadas por absorvância (280nm) e eluidas em gradiente de 0 a 80% de acetronitrila com tempo de corrida de 50 min. Com os seguintes eluentes: (A) 0,1% (V/V) ácido trifluoracético (TFA) e o (B) 0,1% (V/V) TFA em acetoneitrila 80%. Novamente foi utilizado o ensaio de atividade enzimática para identificar em qual tempo de retenção se encontrava a proteína de estudo.

2.4. Espectrometria de Massa

A amostra identificada no sistema de cromatografia em RP-HPLC foi aplicada em Espectrômetro de massas como uma fonte do tipo “electrospray” (Q-Tof Micromass), operando no modo positivo. Um volume de

20µl da amostra foi diluída em uma solução de água / acetoneitrila 50/50 (V/V) e 0,1% (V/V) ácido fórmico. O aparelho foi calibrado com solução alcoólica NaI na faixa de detecção de 100 a 2500 m/z. As amostras foram injetadas diretamente via “loop” de injeção a um fluxo 10,0 mL/min. A voltagem do capilar foi 2000V e voltagem do cone de amostra 15,0 V. Os dados foram processados no programa Masslink 4.0 da Micromass.

3.Resultados

3.1. Atividade enzimática

O ensaio enzimático foi utilizado como ensaio padrão comparativo entre as concentrações dos diferentes inibidores (Figura 1).

O padrão de inibição foi baseado na medida do decréscimo da atividade enzimática induzida pela adição de quantidades crescentes de inibidor, juntamente com uma solução padrão de enzima em presença de seu substrato específico. A maior taxa de inibição enzimática foi observada na concentração de 5 µM de berenil e a menor taxa de inibição enzimática foi observada na concentração de 5 µM de benzamidina.

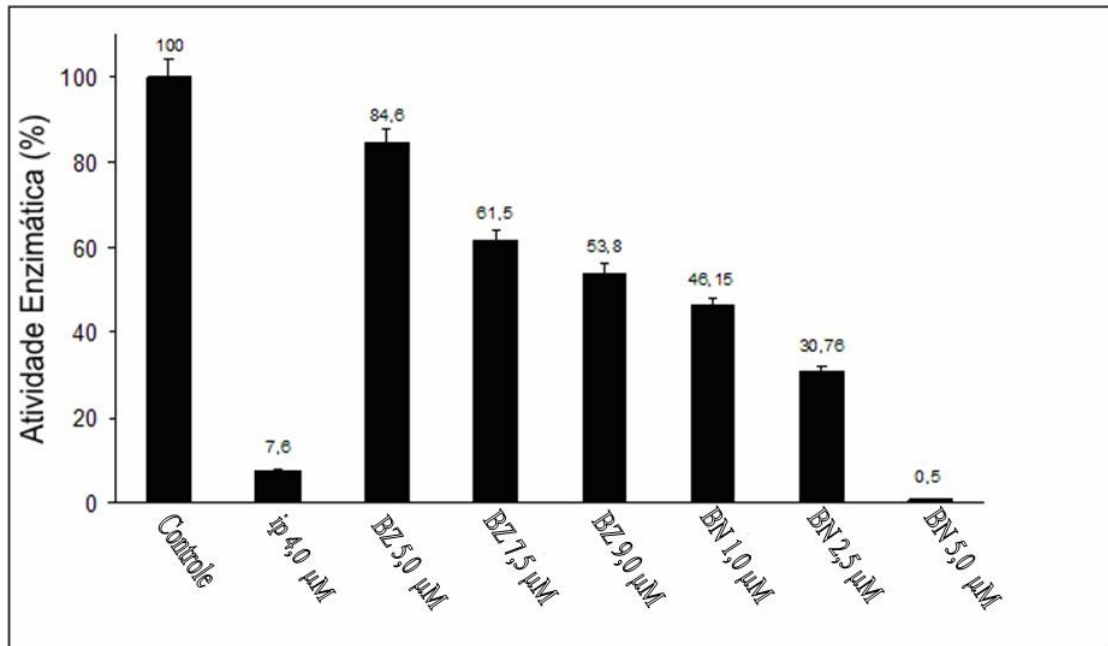


Figura 1. Percentual de inibição da tripsina bovina pelos diferentes inibidores de serino protease. A enzima foi incubada durante 5 minutos, com diferentes concentrações dos inibidores Benzamidina (BZ) (5,0 μM; 7,5μM; 9,0 μM); Berenil (BN) (1,0 μM; 2,5 μM; 5,0 μM) e uma concentração para inibidor purificado do plasma seminal equino ip (4,0 μM). O substrato usado foi BApNA.

3.2. Regressão entre concentração de proteína e idade do garanhão.

Após a centrifugação da amostra de plasma seminal foi realizado o ensaio de Bradford (Bradford, 1976) para determinar a

concentração de proteína total no plasma seminal equino (Tabela 1). Uma regressão negativa foi encontrada entre idade dos garanhões e as concentrações de proteína do plasma seminal (Figura 2).

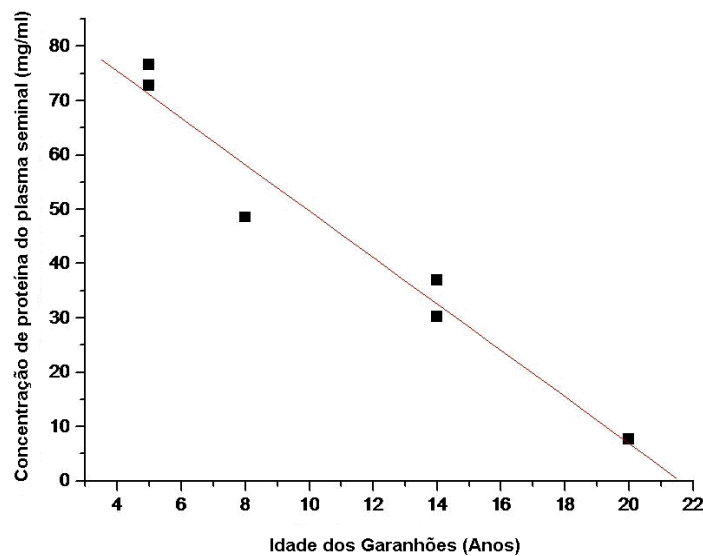


Figura 2. Regressão entre concentração de proteína total do plasma seminal e a idade de garanhão; equação de regressão: $Y=a+Bx$; parâmetros (valor, erro): $a=92,52; 5,64$; $B=- 4,283; 0,459$; $R^2=0,978$; ($p < 0,001$).

A concentração de proteína total do plasma seminal equino apresenta diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

Contudo as amostras não apresentam diferença estatística entre animais da mesma idade.

Tabela 1. Concentração de proteína total e de inibidor presente no plasma seminal equino de diferentes idades.

Animal	Idade	[Prot] (mg.mL ⁻¹)	[Inibidor] (mg.mL ⁻¹)
2	5	76,5 ± 0,21 ^b	0,25 ± 0,01 ^a
4	5	80,0 ± 0,79 ^b	0,20 ± 0,06 ^a
6	8	29,3 ± 0,26 ^c	0,26 ± 0,02 ^a
1	14	30,2 ± 0,15 ^a	0,27 ± 0,01 ^a
5	14	36,5 ± 0,05 ^a	0,30 ± 0,03 ^a
3	20	7,6 ± 0,38 ^d	0,40 ± 0,05 ^a

[Prot] = Concentração de proteína total; [inibidor]= Concentração de Inibidor de serino protease presente nas amostras número 7,8 e 9. colhidas após a cromatografia de exclusão molecular.

3.3. Cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 – Proteínas do plasma seminal tratado com sulfato de amônio.

As proteínas do plasma seminal equino, após tratamento com 36% de sulfato de amônio, foram dializadas, liofilizadas e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC coluna Superose12 (como

relatado material e métodos). Foram coletadas doze frações com volume de 1,5 mL. Após a cromatografia foi feito um teste enzimático para detectar a presença do inibidor, em todas as doze frações. O resultado foi obtido pela porcentagem de inibição da atividade da tripsina sobre o substrato _{DL}BAPNA (Figura 3).

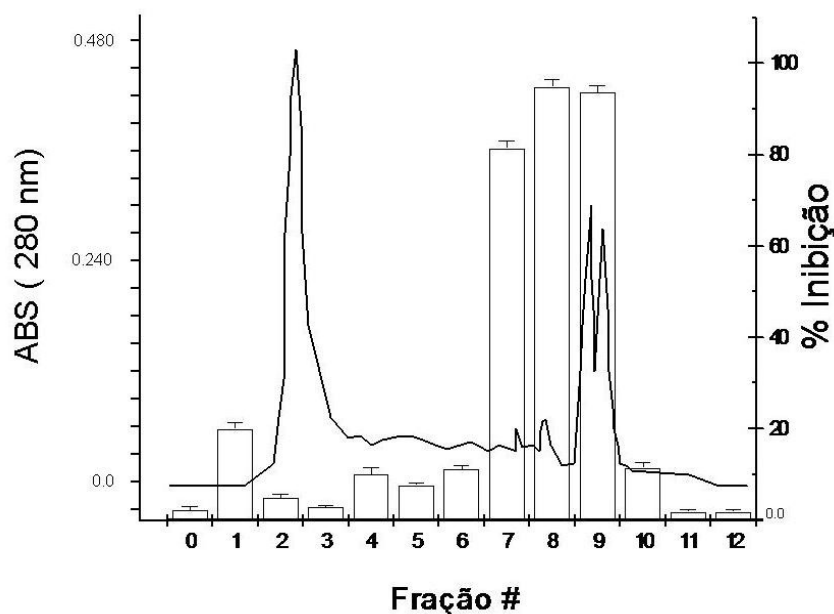


Figura 3. Cromatografia líquida de baixa pressão (FPLC) das proteínas seminais do garanhão, utilizando coluna de exclusão molecular Superose 12. Absorvância 280nm com doze frações diferentes. Fluxo 0,5mL/min. Potencial de ação do inibidor de serino protease nas frações coletadas após cromatografia de exclusão molecular. Leitura em 410nm utilizando tripsina bovina e _{DL}BAPNA como substrato (mean ± SD) (n=6).

A porcentagem de inibição, do inibidor de serino proteinase, foi constatada nas frações 7, 8 e 9 obtidas após cromatografia de exclusão molecular, com uma porcentagem

de inibição de aproximadamente 97% resultado encontrado na maioria dos animais estudados (Figura 4).

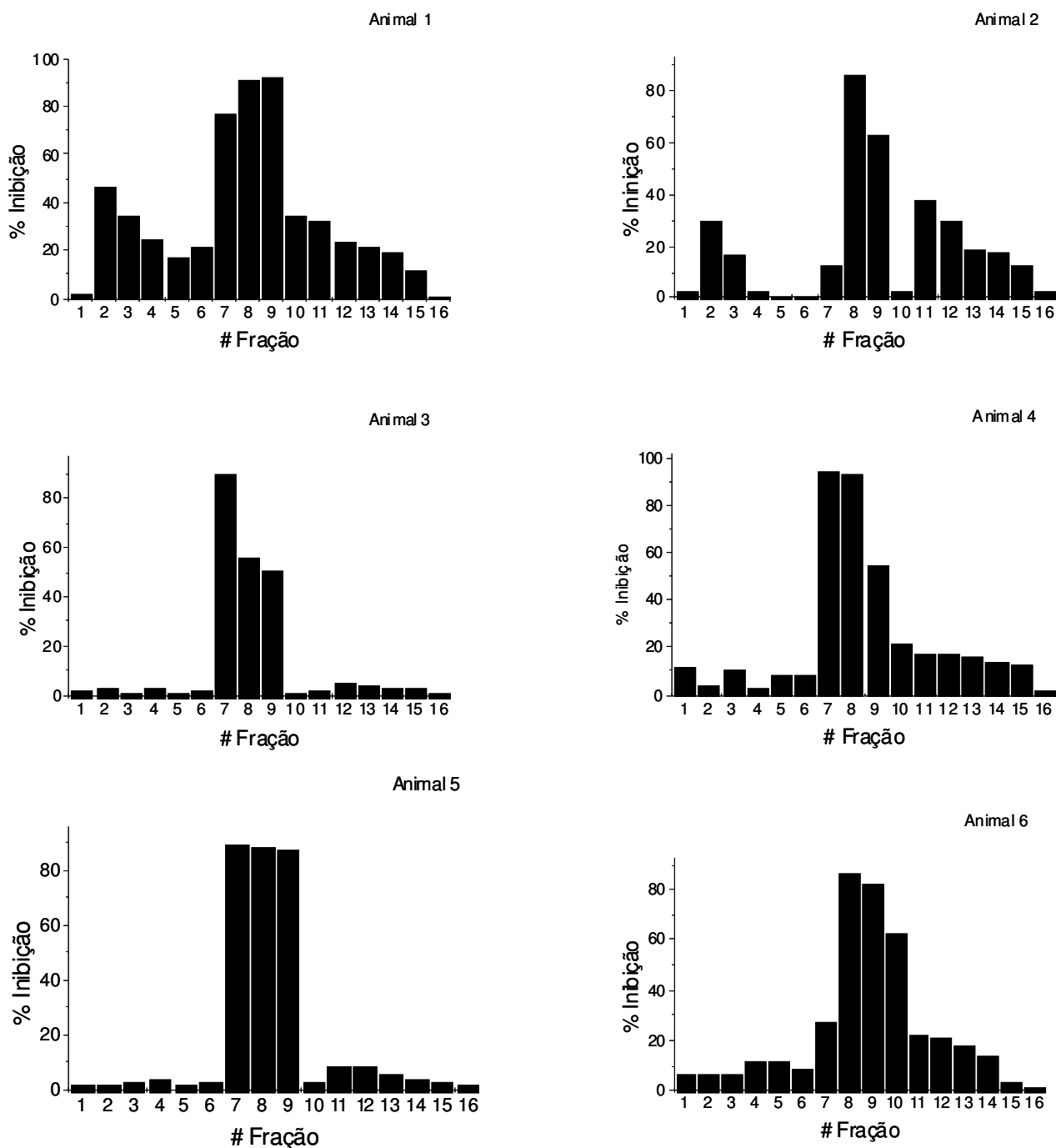


Figura 4. Porcentagem de inibição das 15 frações, de proteínas do plasma seminal dos seis animais, após cromatografia de exclusão molecular. O potencial de inibição foi encontrado na fração 7,8 e 9. A coluna 16 representa a grupo controle sem a presença de inibidor.

As frações que apresentaram potencial de inibição foram submetidas o ensaio de Bradford para determinação da concentração de inibidor serino protease (Bradford, 1976) (Tabela 1). A concentração do inibidor de serino protease não apresentou relação com a idade do animal e também nenhuma diferença estatística foi registrada entre os animais ($p>0,05$).

3.4. Cromatografia líquida de alta pressão (RP- HPLC) em C₁₈ - inibidores de serino proteinase.

Uma vez constatada a atividade inibitória, foi realizada a segunda etapa da purificação do inibidor. As frações que contêm os inibidores de serino protease (frações 8 e 9) foram aplicadas em uma coluna de fase reversa C₁₈ para obter uma amostra com maior pureza. Foram obtidas quatro frações de proteína em tempos de retenção diferentes (Figura 4).

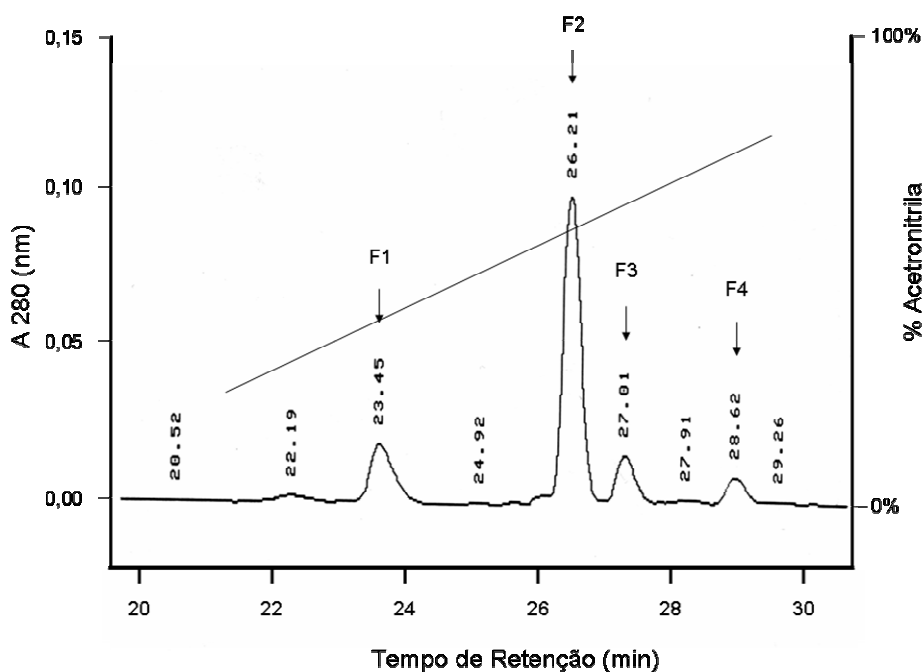


Figura 5. Cromatografia líquida de alta pressão- fase reversa (RP-HPLC) das frações combinadas 8 e 9, após cromatografia de exclusão molecular (ver Figura. 3). Eluição com um gradiente linear de 0-80% acetonitrile/0,1%TFA durante 50 minutos.

O percentual de inibição, através do ensaio enzimático, de todas as quatro frações foi avaliado: F1= 97%; F2=50%; F3=34% e F4=20%; somente as frações que apresentaram potencial de inibição acima de

50% foram mantidas no estudo. A porcentagem da área dos picos e a atividade do inibidor da fração F1, de todos os animais, estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização da fração F1, obtida pela cromatografia em fase reversa HPLC, de todos os animais.

Animal	Tempo de Retenção (min)	Inibição (%)	Área do pico (%)	Inibição/Área do pico
1	24,12	97	25,3	3,83
2	23,45	97	17,5	5,54
3	24,08	96	24,4	3,93
4	24,09	95	25,6	3,71
5	24,06	98	24,2	4,04
6	24,07	98	23,9	4,10

OBS. A inibição/área do pico corresponde à especificidade da inibição.

3.5. Espectrometria de massa.

Os espectros de ESI-MS mostraram dois padrões de distribuição distintos de picos de íon. A presença de um ou dois inibidores de serino protease na fração F1 do

plasma seminal é mostrado na Tabela 3 (a seguir). Cada garanhão obteve inibidores de massas moleculares diferentes no plasma seminal.

Tabela 3. Massa molecular dos inibidores de Serino protease da fração F1 detectadas por espectrometria de massa (ESI-MS) nos diferentes animais.

Animal	Massa molecular (Da)
1	6925,14 ± 0,02
2	6772,65 ± 0,14
3	6732,42 ± 0,01
4	6372,75 ± 0,03
5	6372,71 ± 0,05
6	6372,26 ± 0,55

Fração F1 foi obtida após cromatografia RP-HPLC.

4. Discussão

As amostras dos inibidores de serino protease, sintéticos (bezamidina e berenil) nas suas devidas concentrações e do inibidor natural purificado do plasma seminal equino, mostram-se capazes de inibir a ação da tripsina *in vitro* sobre o seu substrato BApNA. Este resultado sugere dois pontos: Primeiro, o inibidor natural tem homologia funcional com a benzamidina e berenil, inibidores específicos para a tripsina. Segundo, através do caráter qualitativo do ensaio enzimático mostra a preservação da estrutura espacial do inibidor natural, durante o processo de purificação permanecendo

capaz de reconhecer e se ligar ao sítio catalítico da enzima.

Quanto aos inibidores sintéticos a benzamidina é uma substância modelo para os estudos de associações enzima-ligante, interações estéricas e principalmente eficiência catalítica. Derivados da benzamidina são amplamente aplicados em estudos de afinidade. Um destes derivados da benzamidina, o berenil, uma bisbenzamidina, que apresenta uma constante do equilíbrio da associação cerca de 12 vezes maior que a associação enzima-benzamidina (Talhout e Engberts, 2001; Penha-Silva, 2001). Pelos resultados apresentados no presente experimento o

inibidor natural purificado do plasma seminal equino sugere uma constante de associação semelhante ao apresentado pelo berenil. Todavia, a determinação da constante de inibição (Ki) do inibidor natural torna-se necessária para que estes achados deste experimento se tornem conclusivos.

No presente estudo, foi encontrada uma regressão negativa entre idade do garanhão e a concentração de proteína total, após centrifugação do sêmen. De acordo com Strzezek et al. (2005), há mudanças qualitativas e quantitativas em perfis de proteína no plasma seminal de javali, principalmente relacionadas a idade do animal e a processos fisiológicos, respectivamente. Em garanhões com idade de 4,5 anos, os componentes bioquímicos do plasma seminal como glicerilfosforilcolina, ergotionina e proteína total estão em menor concentração do que em garanhões maduros (Kosiniak e Bittmar, 1987; Töpfer-Petersen et al., 2005). A variação da concentração de proteína observada no presente estudo poderia estar relacionada a mudanças de componentes do plasma seminais durante maturação sexual da espécie equina. Contudo, a concentração do inibidor de serino protease é mantida constante em todos os animais.

O inibidor de serino proteinase também foi identificado no plasma seminal de javalis (Jelínková et al., 2003), touros (Lewis et al., 1985) e garanhões (Fellenberg et al., 1985). Um complexo protéico que exibe propriedades de inibição de proteinase (800 kDa), composto por diferentes polipeptídios (11 a 30kDa) também foi observado no plasma seminal de garanhões conforme estudos relatadas por Fellenberg et al. (1985). No presente estudo, através do uso da técnica de espectrometria de massa foi observada a presença dos inibidores de serino protease com uma variação da massa molecular (6.3-7,0 kDa). Os diferentes picos observados depois da cromatografia sugere a presença de isoformas do inibidor de serino proteinase.

A variabilidade de proteína pode estar relacionada ao processo de maturação sexual (Strzezek et al., 2005) uma vez que resulta em diferentes isoformas que podem ser formadas durante o processo de transdução e transcrição de proteínas na maturação espermiática (Hachey e

Chaurand, 2004). A maturação epididímaria do espermatozóide envolve grandes mudanças nos domínios específicos na membrana, principalmente nas modificações na composição das proteínas de membrana, além da heterogeneidade dos polipeptídios. Alguns resultados destas modificações estão envolvidos em processos proteolíticos específicos, causando a desaparecimento ou a redistribuição de amino-acidos entre os diferentes domínios protéicos (Metayer et al., 2002).

Alguns inibidores de serino proteinase se ligam à região de acrosoma do espermatozóide, e a liberação destes durante a incubação *in vitro* ou em incubação no trato feminino sugere que estes podem fazer parte no processo do controle do tempo de ocorrência da pré-fertilização (Lai et al., 1991; Tschesche et al., 1982).

5. Conclusão

A cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia em fase reversa apresentaram-se como excelente técnica para a purificação do inibidor do plasma seminal equino, não causando nenhum dano estrutural e funcional ao inibidor. No presente trabalho é possível verificar que esse mesmo inibidor não apresenta relação direta com a maturidade sexual dos equinos, pois a concentração é mantida constante em todos os animais estudados. Contudo é possível verificar por espectrometria de massa que há diferentes isoformas deste inibidor no plasma seminal dos animais estudados, sugerindo mudanças nas isoformas com a idade do animal, uma vez que todos os animais apresentaram isoformas diferentes deste inibidor.

EXPERIMENTO III. Efeito da adição de inibidores de serino protease ao diluidor de resfriamento e congelamento do sêmen equino.

1.Introdução

A criopreservação de sêmen é um importante instrumento de preservação de material genético de bons reprodutores de várias espécie. No entanto, quando comparada ao sêmen fresco à taxa de fertilidade do sêmen equino congelado é inferior (Picket e Amann, 1987).

Alguns estudos tem sido realizados com o intuito de melhorar a qualidade do

sêmen eqüino resfriado e congelado por meio da compreensão dos mecanismos bioquímicos da fertilização (Gadella et al, 2001), pela otimização das curvas de resfriamentos (Fürts et al., 2005), pelo estudo físico-químico dos meios de criopreservação de sêmen (Poomer, et al., 2002; Vidament, et al., 2001; Vidament, 2005) e pela da adição de crioprotetores alternativos (Alvarenga, et al., 2005) aos meios de congelamento da célula espermática.

Na reprodução animal é relatado que os inibidores naturais de serino proteases podem atuar em mecanismos da fertilização dos espermatozóides de mamíferos (Fraser, 1982).

A utilização de inibidores sintéticos tais como os fármacos da família da benzamidina, inibidor sintético da serino protease, representam uma ferramenta biotecnológica em potencial. Há estudos demonstrando sua ação sobre a coagulação sanguínea (Neurath 1984), a inibição da fertilização (Baba et al., 1989), na ativação da resposta imune via complemento (Davie et al, 1991) e em doenças como piroplasmose, tripanossomose, babesiose (Turnipseed et al., 2006).

O presente experimento teve como objetivo adicionar o inibidor de serino protease natural e sintético aos meios diluidores de resfriamento e de congelamento de sêmen com o intuito de tentar melhorar a longevidade do sêmen eqüino criopreservado.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e avaliação do sêmen eqüino

Foi utilizado um ejaculado de seis garanhões, com idade variando entre quatro e doze anos, procedentes da Região Metropolitana de Belo Horizonte – MG. Os animais foram selecionados por meio da realização de exame andrológico. Para estabilização da produção espermática diária dos garanhões, quando necessário, foram realizadas coletas de sêmen diárias por sete dias consecutivos. O sêmen foi coletado com o auxílio de uma vagina artificial modelo “Hannover”. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi filtrado para a retirada da fração gel e avaliado quanto ao aspecto, volume, motilidade progressiva com movimento

retilíneo ou movimento circular aberto, vigor espermático, velocidade dos espermatozóides, com auxílio de microscópio de campo claro (100x). A concentração espermática foi calculada com auxílio de câmara hemocitométrica e morfologia espermática avaliada através do método de preparação úmida (Mies Filho, 1975) em microscopia de contraste de fase (1000x). Somente foram utilizados para o desenvolvimento do projeto ejaculados que apresentaram motilidade espermática progressiva igual ou superior a 50% e vigor igual ou superior a 3.

2.2. Meios

Para o resfriamento, diluição e centrifugação do sêmen foi utilizado o meio de Kenney (Kenney, et al 1975) (Anexo 2) e para o congelamento o meio INRA-82 (Vidament et al., 1997) (Anexo 2).

2.3. Delineamento experimental

Os ejaculados foram divididos em duas alíquotas uma para o resfriamento e outra para o congelamento. Determinado por dois procedimentos distintos:

2.3.1. Procedimento 1. Resfriamento do sêmen eqüino.

Para o resfriamento os ejaculados foram diluídos com diluidor de Kenney (Kenney, 1975) de forma a se obter alíquotas contendo 25×10^6 espermatozóides/mL em tubos graduados, os quais foram adicionados aos inibidores de serino protease nas concentrações finais de Benzamidina(BZ) (5,0 μ M; 7,5 μ M; 9,0 μ M); Berenil (BN) (1,0 μ M; 2,5 μ M; 5,0 μ M); Inibidor purificado (ip) (4,0 μ M) (Figura 1).

As amostras de sêmen foram acondicionadas em tubos graduados estéreis e resfriadas em caixa de isopor (22cm x 13cm x 18cm) contendo quatro gelos recicláveis (-20⁰C) (8cm x 4cm x 3 cm). A redução de temperatura de 37⁰C a 7,4⁰C ocorreu em uma hora e de 7,4⁰C a 5⁰C em uma hora, após a qual o sêmen foi mantido em equilíbrio por mais duas horas totalizando uma curva de resfriamento de quatro horas.

Avaliação do sêmen eqüino pós-resfriamento.

O sêmen foi avaliado após 4 horas de resfriamento quanto à motilidade progressiva e vigor com auxílio de microscópio de campo claro (100x). A integridade física da membrana plasmática foi avaliada de acordo com Harrison e Vickers (1990) utilizando-se da mistura de corantes biológicos, sondas fluorescentes, à base de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de Propídio (IP) com auxílio de microscópio fluorescência modelo (Olympus BX41) comprimento de onda 488/515nm e excitação 620nm (1000x), foram avaliadas 200 células. As seguintes categorias foram observadas para a classificação:

1. Espermatozoides 100% verde fluorescente
2. Espermatozoides 100% vermelho fluorescente
3. Espermatozoides com peça intermediária verde fluorescente
4. Espermatozoides com região acrossômica verde fluorescente
5. Espermatozoides com peça intermediária e região acrossômica fluorescentes

Somente os espermatozoides da categoria 1 foram considerados com a membrana plasmática íntegra. O protocolo da coloração está descrito no anexo 3.

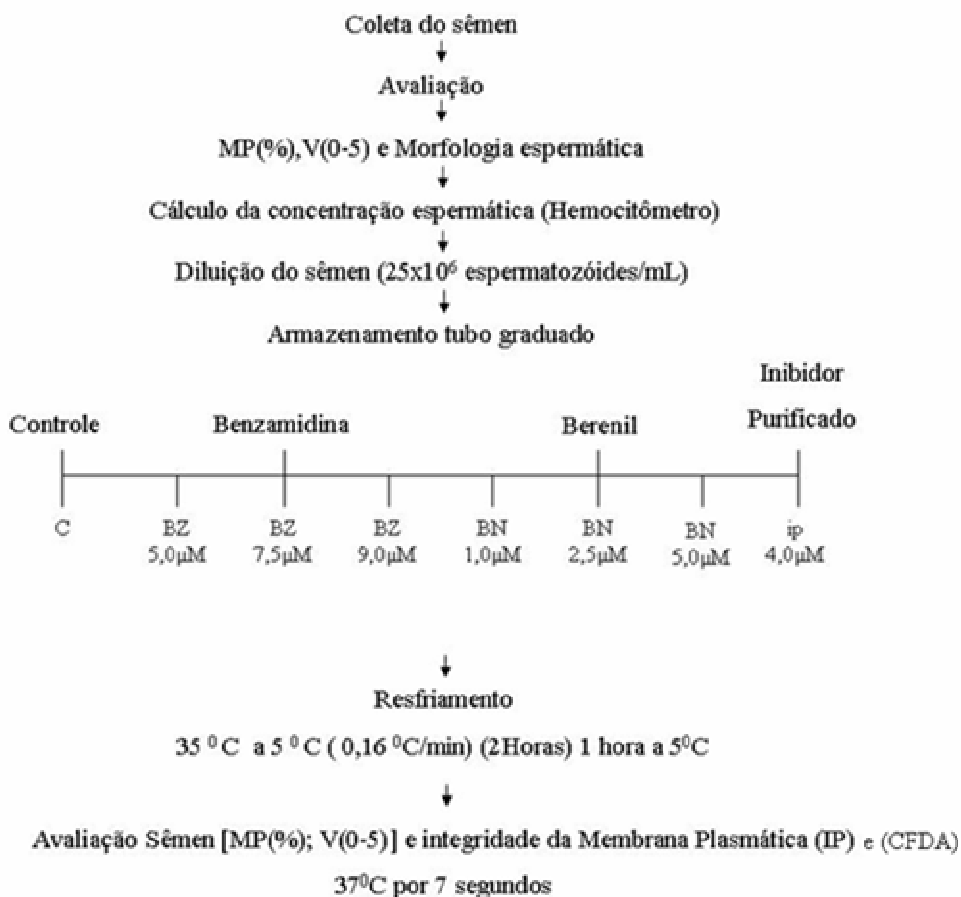


Figura 1. Fluxograma do protocolo de resfriamento do sêmen eqüino com grupo Controle (C) e adição dos inibidores de serino proteases: Benzamidina (BZ); Berenil (BN); Inibidor Purificado (ip). As concentrações finais de cada inibidor foram adicionadas para cada 25x10⁶ espermatozoides/mL, conforme os tratamentos propostos: Sêmen resfriado: BZ (5,0 µM ;7,5µM; 9,0 µM);BN (1,0 µM; 2,5 µM; 5,0 µM); ip (4 µM). IP= Iodeto de propídio, CFDA= 6-carboxifluoresceína diacetato.

2.3.2. Procedimento 2. Congelamento do sêmen eqüino.

Uma amostra de cada ejaculado foi diluída na proporção de 1:1 com diluidor Kenney, centrifugada (500g por 10 min) e o sobrenadante retirado deixando aproximadamente 10% do volume total do sêmen. O sedimento foi homogeneizado por agitação e ressuspendido com diluidor de congelamento, INRA 82 de forma a se obter 100×10^6 espermatozóides/mL. As amostras foram depositadas em tubos graduados com os inibidores de serino protease nas concentrações finais conforme segue:

Benzamidina (5,0 μ M; 7,5 μ M; 9,0 μ M); BN (1,0 μ M; 2,5 μ M; 5,0 μ M); inibidor natural de serino protease (ip) (4,0 μ M) (Figura 2). As amostras de sêmen foram envasadas em palhetas 0,5mL, resfriadas até 5^oC, em caixa de isopor (22cm x 13cm x 18cm) contendo seis gelos recicláveis (8cm x 4cm x 3 cm). A redução de temperatura de 36^oC a 24,1^oC ocorreu em 10 minutos e de 24,1^oC a 4,9^oC em 40 minutos. Após 50 minutos as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido a 3 cm acima da altura do nível de nitrogênio líquido por vinte minutos e imersas no mesmo.

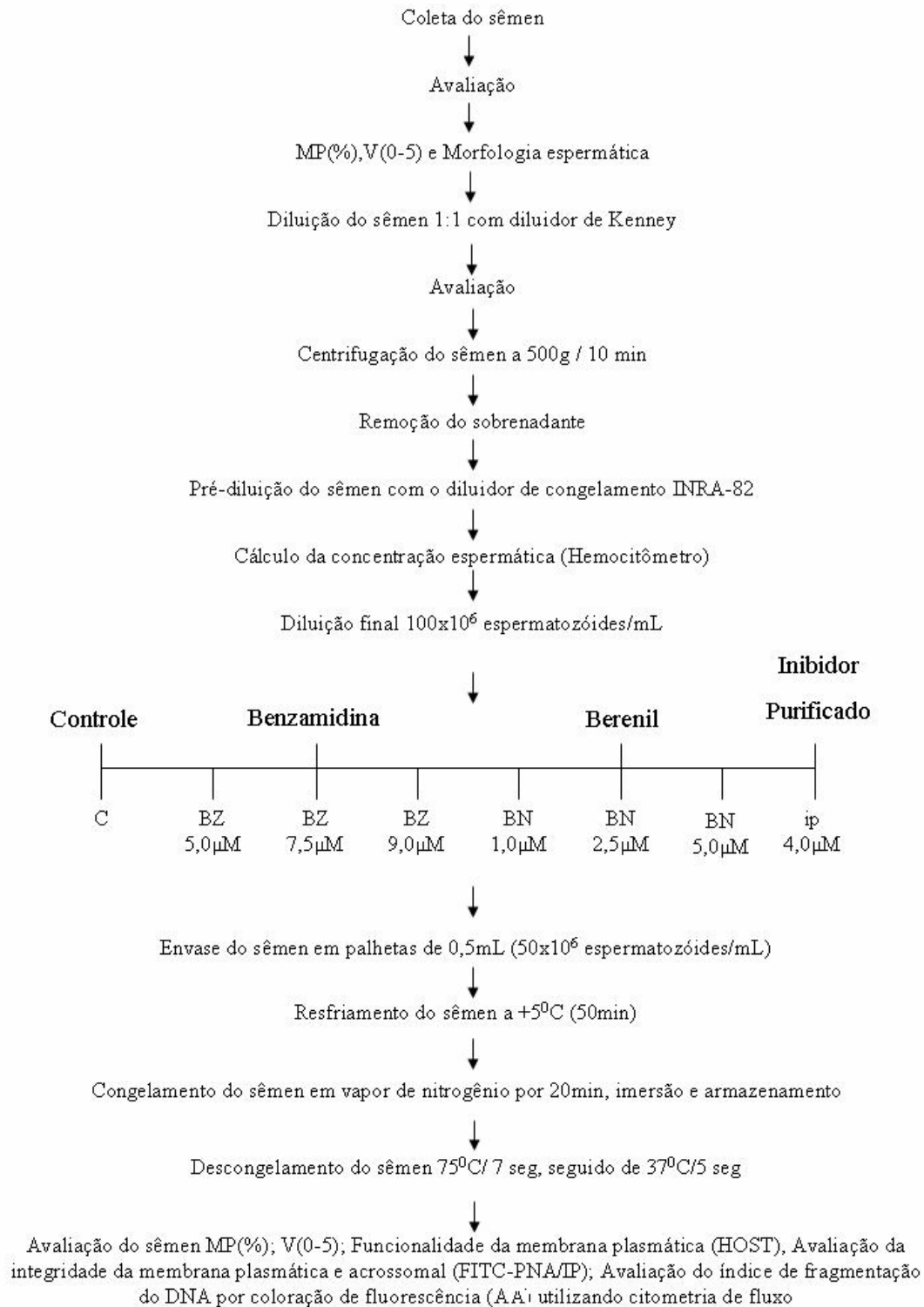


Figura 2. Fluxograma do protocolo de congelamento do sêmen equino com grupo Controle (C) e adição dos inibidores de serino proteases: Benzamidina (BZ); Berenil (BN); Inibidor Purificado (ip). As concentrações finais de cada proteína foram adicionadas para cada 100×10^6 espermatozoides/mL, conforme os tratamentos propostos: BZ (5,0 μ M; 7,5 μ M; 9,0 μ M); BN (1,0 μ M; 2,5 μ M; 5,0 μ M); ip (0,4 μ M).

2.4. Avaliação pós-descongelamento

O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 75 °C por 7 segundos (Cochran et al. 1984) e mantido a 37°C por 30 segundos. Fez-se a avaliação do espermatozóide logo após o descongelamento quanto à motilidade progressiva com movimento retilíneo e movimento circular aberto, vigor espermático, utilizando-se um microscópio de campo claro (100x). A avaliação da funcionalidade de membrana plasmática foi realizada através do teste hiposmótico com água destilada, conforme técnica de Lomeo e Giambersio (1991) modificada por Lagares et al. (1998). Uma alíquota de 100 µL de sêmen foi adicionada a 200 µL de água destilada (diluição 1:2), ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por cinco minutos. Após este período, as amostras foram analisadas em microscopia de contraste de fase (400x). Foram avaliadas 200 células por amostra e calculadas o percentual de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste hiposmótico com cauda enrolada e subtraído do número de espermatozoides com cauda enrolada antes de serem submetidos ao estresse osmótico.

Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

As preparações celulares marcadas com as sondas fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo – FACS_{CALIBUR} ou FACS_{CAN} (Becton & Dickinson) imediatamente após a coloração. Durante a aquisição dos dados foram coletados 10000 eventos. Os dados coletados foram analisados utilizando os programas de computador *Cell Quest* (Becton & Dickinson). A análise consistiu, primeiramente, na determinação da população celular de interesse. Isto se faz baseando-se no perfil de tamanho e granulosidade das populações adquiridas e da expressão de marcadores fenotípicos.

Procedimentos de marcação com sondas fluorescentes

A avaliação da integridade física da membrana plasmática foi realizada utilizando-se as colorações Iodeto de Propídio (IP) e Azul de Tripan, por meio de citometria de fluxo (FACS_{CALIBUR}). As amostras de sêmen descongeladas foram diluídas 1:20 em PBS (250 µL de sêmen:5 mL de PBS). Duas alíquotas de 200 µL dessa amostra diluída foram diluídas novamente acrescentando-se 1 mL de PBS a cada uma delas. A primeira foi adicionada iodeto de propídio IP (1,5 mM) e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente (Anexo 4). À segunda, foi adicionado 20 µL de azul de tripan 0,4% e incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C (Anexo 5). As amostras foram submetidas imediatamente à leitura no citômetro de fluxo (FL3 fotodetector). Estabeleceu-se como critério de leitura dez mil eventos, a uma taxa de 350 células por segundo, para análise de cada amostra. Os espermatozoides que fluoresceram em vermelho foram classificados com membrana plasmática não íntegra, enquanto que os que não foram corados foram considerados com membrana plasmática íntegra.

A avaliação da integridade física da membrana plasmática foi realizada pela seleção das células espermáticas. As mesmas foram marcadas com o corante Iodeto de propídio (IP) e Azul de Tripan (AT), o que permitiu a distinção de dois grupos celulares, que podem ser classificados como: I) Os espermatozoides com membrana plasmática íntegra (IP- e AT-), que constituem o grupo de células localizado no quadrante inferior esquerdo os quais não foram marcados por Iodeto de Propídio e Azul de Tripan; II) Os espermatozoides que constituem o grupo de células com lesão na membrana plasmática (IP+) e (AT+), está localizado no quadrante superior esquerdo, marcadas intensamente pelos corantes (Figura 3).

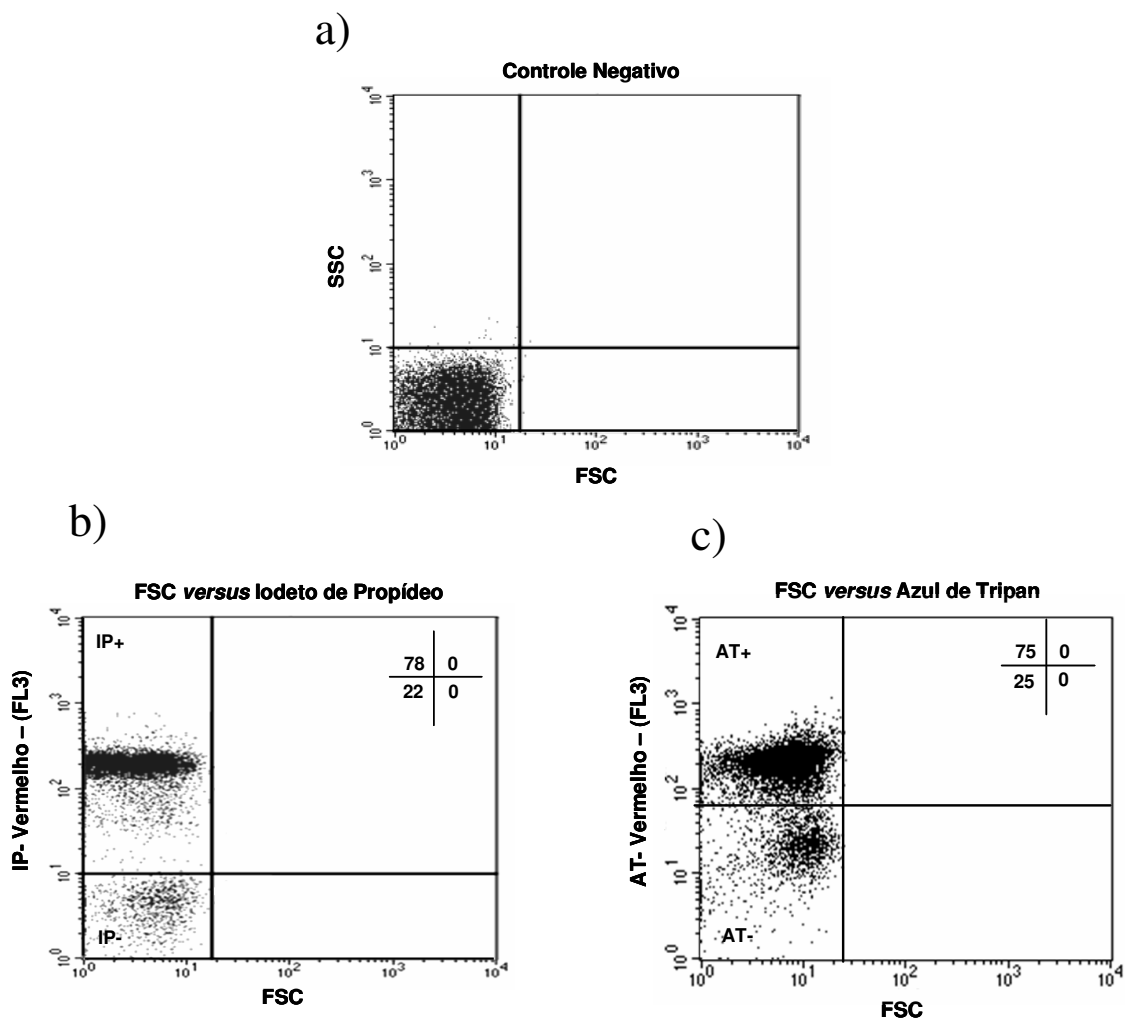


Figura 3. Representação gráfica de distribuição pontual seleção do espermatozóide eqüino, pós-decongelamento, marcados com: a) Controle Negativo; Tamanho *versus* granulosoidade. b) Iodeto de propídeo (IP); c) Azul de tripan (AT). A Distribuição representativa em “dot-plot” obtida pela marcação com as sondas não relacionadas marcados com IP e AT. Espermatozoides eqüino, pós-congelamento, que apresentavam dano a membrana plasmática foram identificados pela alta intensidade de fluorescência do tipo 3 (vermelho – FL3).

Quanto à avaliação da integridade da membrana acrossomal utilizou-se sonda fluorescente PNA-FITC e marcador da integridade física da membrana plasmática (IP). As amostras de sêmen pós-decongelamento foram avaliadas com auxílio de citometria de fluxo (FACS_{CALIBUR}) (Figura 4). As amostras de sêmen descongeladas foram diluídas 1:20 em PBS (250 µL de sêmen:5 mL de PBS), foram coradas com FITC-PNA (1,125 g/mL) e incubadas por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Depois se adicionou IP (1,5 mM) e foram incubadas por mais 10

minutos a temperatura ambiente (Anexo 6). O critério de análise foi o mesmo mencionado anteriormente. Os dados correspondentes à fluorescência vermelha, IP (FL3 fotodetector), e verde, FITC-PNA (FL1 Fotodetector), das partículas foram contabilizados. Os espermatozoides que fluoresceram em vermelho foram classificados com membrana plasmática não íntegra e os que fluoresceram em verde apresentavam membrana acrossomal externa não intacta.

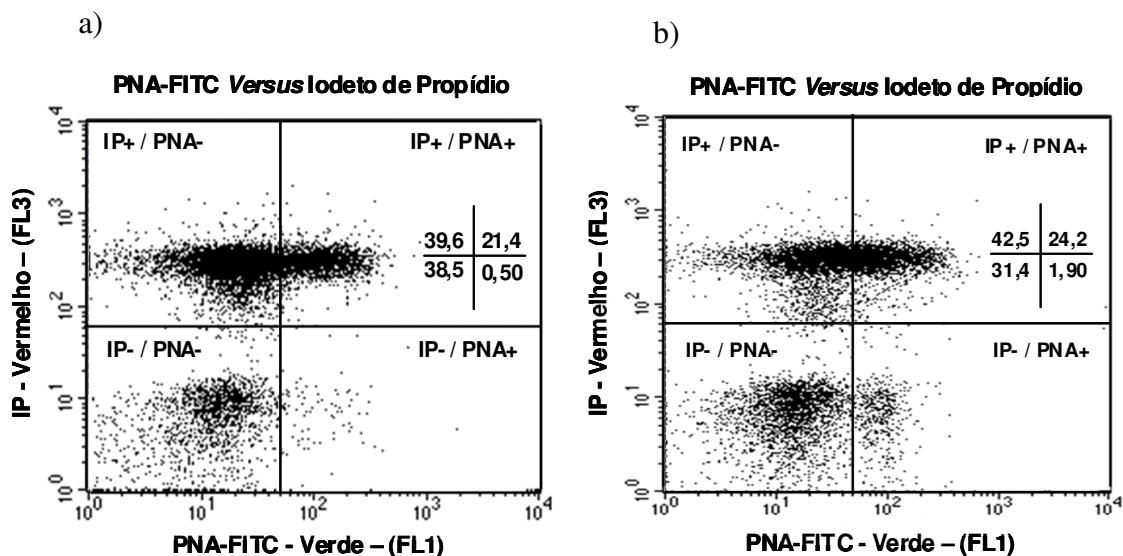


Figura 4. Gráficos representativos de distribuição pontual dos espermatozoides eqüino, pós-decongelamento, com os corantes IP *versus* PNA-FITC. Cada quadrante representa a porcentagem de espermatozoides com lesão ou não, na membrana plasmática e acrossômica. (IP-/PNA-) membrana plasmática e acrossômica íntegra; (IP+/PNA+) e acrossômica íntegra danificada; (IP+/PNA-) membrana plasmática danificada e membrana acrossomal íntegra; (IP-/PNA+) membrana plasmática íntegra e acrossomal danificada. (a) Pré-RAI= Antes da indução da reação acrossômica e (b) Pós-RAI= Pós indução da reação acrossômica utilizando o ionóforo de cálcio.

Os gráficos representativos de distribuição pontual das avaliações por citometria de fluxo com a utilização dos corantes IP e o conjugado de *lectina* (PNA-FITC) estão exemplificados na Figura 4. Cada quadrante representa a porcentagem de espermatozoides com lesão ou não, na membrana plasmática e acrossômica. O quadrante inferior esquerdo (IP-/PNA-) é a frequência de células duplo-negativas, espermatozoides com membrana plasmática e acrossômica intactas, superiores direito (IP+/PNA+) é a frequência de células duplo-positivas, espermatozoides que apresentam membrana plasmática e acrossômica danificadas, superior esquerdo (IP-/ PNA+) são as células espermáticas que estão com a membrana plasmática danificada e a acrossômica íntegra e inferior direito (IP+/PNA-) espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossômica danificada. Na figura 4b, há o quadrante inferior direito (IP+/PNA-), representada as células espermáticas que apresentaram a membrana acrossômica não intacta, devido à indução da

reação acrossômica com o ionóforo de cálcio A 23187.

Na avaliação do índice de fragmentação da cromatina foi utilizado o corante Alaranjado de acridina (AA). O objetivo foi avaliar ao grau de fragmentação da cromatina após o processo de congelamento do sêmen (Figura 5).

Uma alíquota de 5 μ L do sêmen descongelado foi diluída em 200 μ L do **meio-1**, à suspensão foi adicionado o **meio - 2** em intervalo de incubação de 30 segundos em banho-maria a 37°C. Em seguida, foi adicionado o **meio -3** (10 μ L do soluto-estoque 1mg/mL - AA) incubado por 3 minutos em banho-maria a 37°C (Anexo 7). Após este período as amostras foram avaliadas no citômetro de fluxo (FACS_{CAN}). Estabeleceu-se como critério de leitura dez mil eventos, a uma taxa de 500 células por segundo. Os espermatozoides que apresentavam a coloração verde (FL1-fotodetector) apresentavam o DNA íntegro (fita dupla) e aqueles que apresentavam coloração vermelha (FL3- fotodetector) DNA fragmentado (fita simples) (Figura 5).

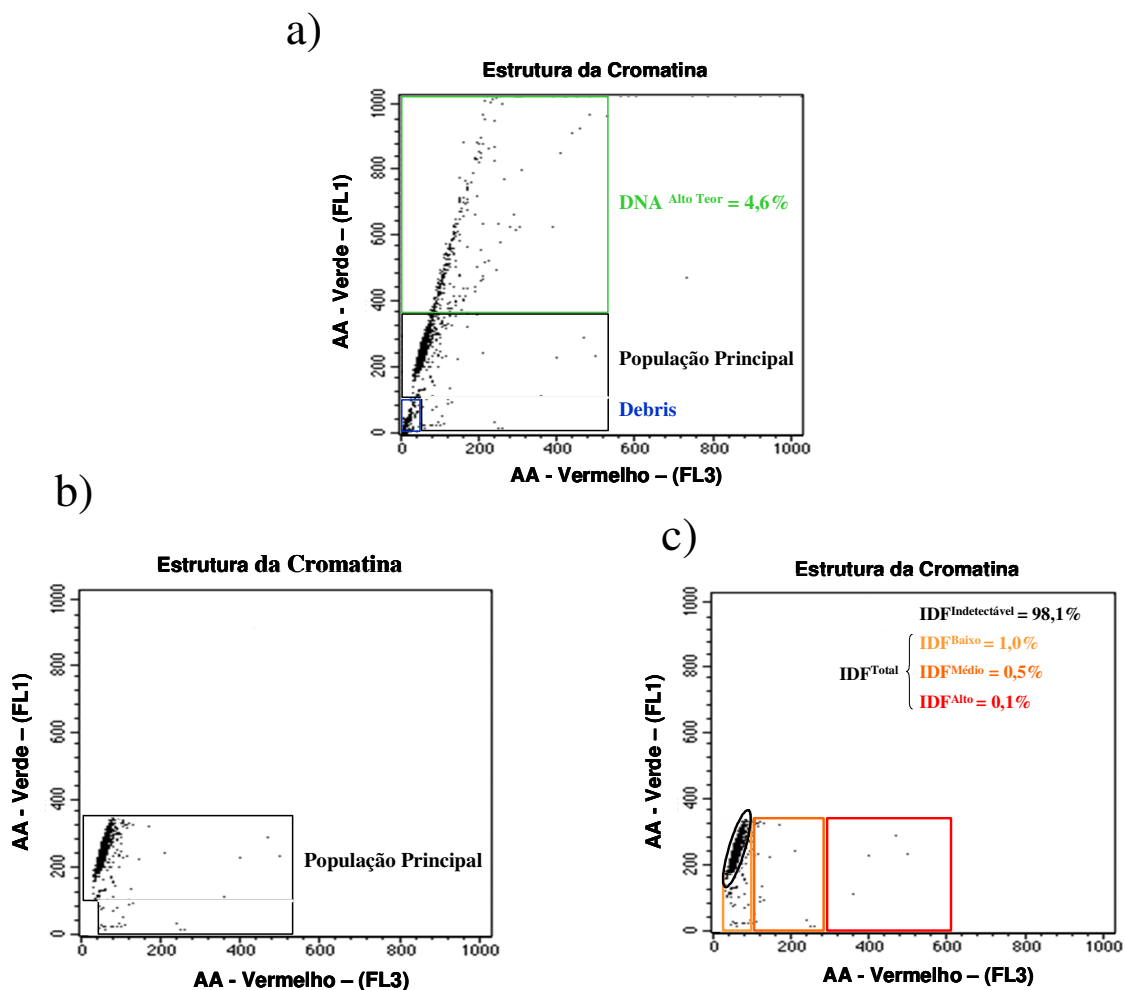


Figura 5. Dot plots representativo das células espermáticas com variação dos níveis de fragmentação da cromatina. Estrutura da cromatina avaliada pela coloração com alaranjado de acridina por citometria de fluxo. a) Fluorescência AA –verde – (FL1) células principais e células imaturas ($\text{DNA}^{\text{alto teor}}$); b) Fluorescência AA –Vermelho – (FL3), células principais-; c) Fluorescência AA –Vermelho – (FL3), sem fragmentação do DNA ($\text{IDF}^{\text{Indetectável}}$), baixo índices fragmentação ($\text{IDF}^{\text{Baixo}}$); médio índices fragmentação ($\text{IDF}^{\text{Médio}}$); alto índices fragmentação (IDF^{Alto}).

A avaliação da estrutura da cromatina foi definida, através do corante metacromático, alaranjado de acridina (AA) por duas populações de interesse: células principais e células imaturas ($\text{DNA}^{\text{alto teor}}$), que apresentam alto grau de fluorescência AA – Verde - (FL1) (Figura 5a). Uma vez definidas as populações espermáticas de interesse, células principais, procedem-se às análises de fluorescência. Nesta marcação, o quadrante é posicionado de forma que, as células de interesse se encontrem no quadrante inferior (Figura 5b). Análise do grau de fragmentação, procedeu-se pelo grau de fluorescência AA – Vermelho – (FL3), sem fragmentação do DNA ($\text{IDF}^{\text{Indetectável}}$),

baixo índices fragmentação ($\text{IDF}^{\text{Baixo}}$); médio índices fragmentação ($\text{IDF}^{\text{Médio}}$); alto índices fragmentação (IDF^{Alto}), quanto maior a emissão de fluorescência maior o grau de fragmentação (Figura 5).

Titulação do ionóforo cálcio A 23187

Foi realizada uma titulação do ionóforo cálcio A23187 a fim de se avaliar o tempo de reação e a temperatura ideal para reação. O sêmen foi descongelado a temperatura de 75°C por 7 segundos (Cochran et al. 1984) e mantido a 37°C por 30 segundos. A essa amostra foi adicionado $5\mu\text{L}$ de solução de ionóforo cálcio na seguinte concentração: $5\mu\text{M}$ (Anexo 8). Foi

avaliada a temperatura de 22°C e 37°C durante período de 5, 10 e 30 minutos. Após estes períodos de incubação, as amostras foram preparadas conforme o protocolo de coloração para integridade da membrana acrossomal utilizando PNA-FITC e IP, descrito anteriormente.

Indução da Reação Acrossômica (RAI)

Para avaliar a capacidade fecundante “*in vitro*” do espermatozóide eqüino pós-descongelamento, foi realizada a indução da reação acrossômica (RAI), com ionóforo de cálcio A23187, em todos os tratamentos. Após preparo de uma solução trabalho de 5µM do ionóforo de cálcio, foi adicionado 5µL dessa solução a uma alíquota de 0,5mL da amostra de sêmen descongelado (50 x 10⁶ espermatozóides) (Anexo 9). Após o período de 30 minutos de incubação, as amostras

foram reavaliadas quanto ao status do acrossoma por meio de citometria de fluxo com PNA-FITC e Iodeto de propídio como descrito anteriormente para avaliação da integridade da membrana acrossomal.

3. Resultados

3.1. Avaliação do sêmen

Os parâmetros de avaliação do sêmen fresco do ejaculado de seis garanhões utilizados no presente experimento foram descritos na Tabela 1.

A motilidade total do sêmen fresco variou de 60 a 75%, a motilidade progressiva de 50 a 70%, enquanto o vigor espermático foi observado de 3 a 4 entre os garanhões avaliados.

Tabela 1. Característica espermática do sêmen fresco de ejaculados de seis animais.

Animal	# Total	[]/mL	Morfologia (%)	Motilidade (%)		Vigor
				Total	Progressiva	
1	8,6	115	82	60	50	4
2	2,8	76	90	75	70	3
3	3,8	110	86	70	60	3
4	1,7	115	84	65	60	4
5	3,9	94	94	70	65	4
6	5,6	140	88	75	70	3

número total de espermatozóides no ejaculado; [] /mL= concentração espermática/mL; Morfologia= porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais.

A concentração espermática/mL de sêmen apresentou uma variação de 76 a 140 x 10⁶ espermatozóides. O número de espermatozóides morfológicamente normais no ejaculado (82 a 94%) apresentou-se dentro da normalidade do sêmen eqüino.

3.1.1. Procedimento 1. Resfriamento do sêmen eqüino.

A porcentagem de espermatozóides com motilidade total, progressiva e vigor após a diluição com o meio diluidor de Kenney não diferiu estatisticamente da observada com sêmen fresco (p>0,05). Ao contrário, o resfriamento interferiu na qualidade das células espermáticas após a criopreservação (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de avaliação das etapas do processo de resfriamento no grupo controle (Um ejaculado de seis animais n=6).

Tratamento	Motilidade (%)		Vigor
	Total	Progressiva	
Sêmen fresco	69,6±5,8 ^a	63,3±7,5 ^a	3,5±0,5 ^a
Pós-diluição Kenney	75,0±12,6 ^a	67,5±12,9 ^a	3,6±0,5 ^a
Pós- Resfriamento	57,5±14,5 ^b	47,5±16,6 ^b	2,5±0,5 ^b

Dados apresentados como média de porcentagem ± desvio padrão para diferentes avaliações. Diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

No presente experimento, a curva de resfriamento (Figura 6) apresentou uma taxa de redução de temperatura de 0,59^oC/min entre 35^oC a 22,6^oC, de 0,38^oC/min entre

22,6^oC a 7,4^oC, e de 0,017^oC/min entre 7,4^oC a 5,0^oC.

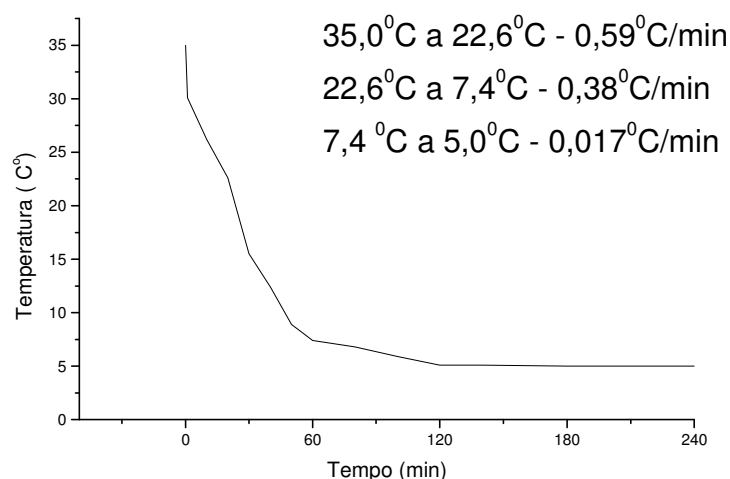


Figura 6. Curva de resfriamento do sêmen equino (240 minutos)

Avaliação do sêmen resfriado equino tratados com os diferentes inibidores de serino protease em diferentes concentrações.

Os valores dos parâmetros de avaliação da motilidade total e progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática

do espermatozói de avaliadas com coloração CFDA/IP foram apresentados Tabela 3. Não foi observada diferença estatística (p>0,05) entre o sêmen tratado com os inibidores de serino protease nas diferentes concentrações e o grupo controle nas características avaliadas.

Tabela 3. Avaliação das porcentagens de motilidade progressiva e total, vigor, membrana plasmática íntegra (CFDA/PI) do sêmen resfriado (5⁰C).

Tratamento	Membrana Íntegra (%)	Motilidade (%)		Vigor	
		Total	Progressiva		
Controle	68,0±12,5	57,5±14,0	47,5±16,3	2,5±0,5	
BZ	5,0 µM	64,6±14,2	63,3±19,1	57,5±18,6	3,6±0,5
	7,5 µM	63,5±9,9	57,5±21,1	46,6±20,8	2,8±0,7
	9,0 µM	59,2±12,3	46,6±12,1	39,1±13,1	2,1±0,7
BN	1,0 µM	63,0±9,1	60,8±8,6	52,5±7,5	2,6±0,7
	2,5 µM	63,3±7,5	53,3±13,6	45,0±11,8	2,5±0,5
	5,0 µM	64,6±10,6	55,8±12,0	47,5±11,7	2,1±0,7
ip	4,0 µM	68,7±12,1	62,5±17,2	52,5±21,8	3,0±1,9

Dados apresentados como média de porcentagem ± desvio padrão para diferentes avaliações. Meio diluidor Kenney. Controle, (BZ)= Benzamidina, (BN)= Berenil, (ip)= Inibidor Purificado. Nenhuma diferença significativa (p>0,05) foi observada para as variáveis avaliadas entre os tratamentos.

3.1.2. Procedimento 2. Congelamento do sêmen equino.

No processo de congelamento do sêmen equino, foi realizada uma curva de resfriamento com uma taxa de 1,19⁰C/min de 35⁰C a 24,1⁰C e de 0,42⁰C/min de

24,1⁰C a 4,9⁰C totalizando 50 minutos (Lagares, et al., 2001) (Figura 7). Após a qual o sêmen foi congelado em nitrogênio líquido.

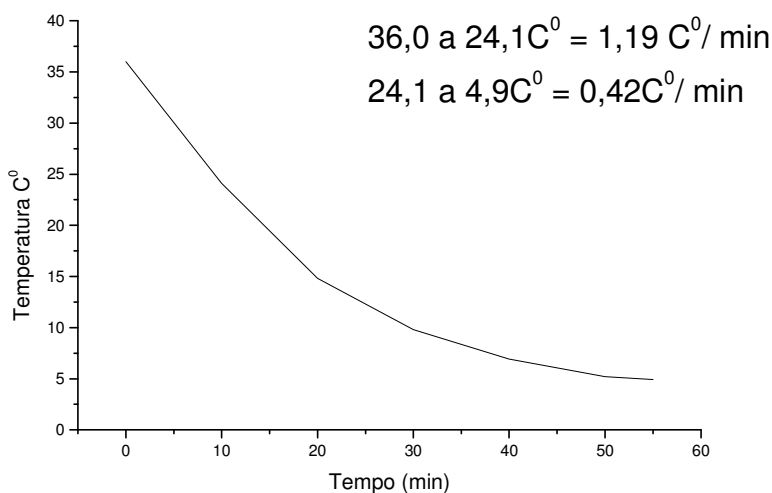


Figura 7. Curva de resfriamento para o congelamento do sêmen equino (50 minutos).

Avaliação do sêmen equino pós-descongelamento tratado com diferentes inibidores de serino-protease em diferentes concentrações.

Na Tabela 4 foram demonstrados os valores percentuais médios e o desvio-

padrão da motilidade espermática progressiva e total, vigor e porcentagem de espermatozoides com membrana funcional, avaliados com o teste hiposmótico. Não foi observada diferença estatística (p>0,05) entre o sêmen tratado com os inibidores de

serino protease nas diferentes concentrações e o controle nas características espermáticas avaliadas.

Tabela 4. Avaliação da motilidade progressiva e total, vigor e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) dos espermatozóides equino pós-descongelamento.

Tratamento	Membrana Funcional (%)	Motilidade (%)		Vigor	
		Total	Progressiva		
Controle	24,7±5,8	18,3±6,8	10,8±5,8	2,1±0,4	
BZ	5,0 µM	24,8±6,5	16,6±4,0	1,5±0,5	
	7,5 µM	24,8±4,9	15,8±6,6	1,5±0,8	
	9,0 µM	20,6±3,9	19,6±6,6	2,0±0,6	
BN	1,0 µM	24,8±7,8	15,0±4,7	1,5±0,5	
	2,5 µM	29,7±5,9	26,6±8,6a	2,5±0,5	
	5,0 µM	28,5±6,8	19,6±8,6	1,8±0,7	
ip	4,0 µM	28,6±3,5	22,5±8,2	18,3±8,6	2,3±0,8

Dados apresentados como média de porcentagem ± desvio padrão para diferentes avaliações como descrito em material e métodos. Meio congelamento INRA-82. Controle, (BZ)= Benzamidina, (BN)= Berenil, (ip)= Inibidor Purificado. Nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi observada para as variáveis avaliadas nas análises entre os tratamentos.

Os dados referentes à avaliação da integridade física da membrana plasmática, utilizando as sondas fluorescentes IP e AT, foram apresentados na Tabela 5. Como se pode observar, não houve diferença estatística, entre os corantes, foi demonstrado que tanto o IP quanto AT podem ser utilizados para avaliar a integridade da membrana plasmática com

auxílio da citometria de fluxo. Da mesma forma não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) entre a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra avaliada com IP e AT entre os grupos tratados com os inibidores de serino protease e o controle.

Tabela 5. Porcentagem de espermatozoides pós-descongelamento, com membrana plasmática íntegra avaliada com Iodeto Propídio (IP) e Azul de Tripán (AT) pré indução da reação acrossômica (Pré-RAI) e pós indução da reação acrossômica (Pós-RAI).

Tratamento		Espermatozoides com membrana plasmática íntegra (%)			
		Pré-RAI		Pós-RAI	
		AT-	IP-	AT-	IP-
Controle		21,4±9,7	21,6±8,2	15,8±6,2 ^a	16,1±6,4 ^a
BZ	5,0 µM	19,4±6,9	19,9±7,5	13,9±3,8 ^a	14,4±4,5 ^a
	7,5 µM	25,1±5,7	27,4±5,2	6,6±5,6 ^a	22,7±5,8 ^a
	9,0 µM	20,7±11,6	20,1±11,9	12,9±6,3 ^a	13,2±6,6 ^a
BN	1,0 µM	27,5±6,5	28,7±6,5	19,8±6,8 ^a	21,1±7,5 ^a
	2,5 µM	19,4±6,9	19,9±7,4	13,4±5,1 ^a	13,9±6,5 ^a
	5,0 µM	21,4±7,9	20,2±7,2	13,0±3,3 ^a	13,5±3,7 ^a
ip	4,0 µM	30,6±7,3	31,3±7,5	21,4±7,7 ^a	21,9±7,8 ^a

Dados apresentados como média de porcentagem ± desvio padrão para avaliação da integridade física da membrana plasmática usando os corantes Iodeto de propídio (IP) e Azul de Tripán (AT) por citometria de fluxo. Meio congelamento INRA-82. Controle, (BZ)= Benzamidina, (BN)= Berenil, (ip)= Inibidor Purificado. Nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi observada para as variáveis avaliadas nas análises entre os tratamentos e os corantes. (IP-); (AT-) = membrana plasmática íntegra.

- Diferença significativa Pré-RAI e Pós-RAI ($p<0,05$). RAI= Reação acrossômica induzida.

Contudo, foi observada redução do percentual de células espermáticas com a membrana plasmática íntegra ($p<0,05$), decorrente do efeito tóxico do indutor da reação, ionóforo de cálcio, ou pelo efeito da indução da reação acrossômica que favoreceria a perda da integridade da membrana plasmática.

Para determinar o protocolo de indução da reação acrossômica (RAI) pós-descongelamento, com o ionóforo de cálcio A 23187 foram testados três tempos e duas temperaturas de incubação (Tabela 6). A temperatura de 37°C e o período incubação de 60 minutos foram os que apresentaram a maior taxa de espermatozoides com membrana acrossômica não intacta pós-indução sendo considerados reagidos.

No entanto, foi observado aumento da porcentagem de espermatozoides corados com IP representando um maior dano a membrana plasmática de espermatozóide pelo o ionóforo de cálcio. Portanto, optou-se por usar um tempo de incubação de 30 mim e uma temperatura de 37°C, uma vez que foi obtida maior taxa de reação acrossômica pós indução (14,7%) semelhante, estatisticamente, a 60 min (16,6%) e maior taxa de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (81,3%) comparada também ao tempo de incubação de 60 mim (70,6%). Sugereindo que o período de incubação há 60 minutos pode causar um dano maior na integridade da membrana plasmática.

Tabela 6. Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma não íntegro após diferentes tempos e temperaturas de incubação com o ionóforo de cálcio A23187.

Tempo de incubação	Acrossoma não íntegro (%)		Membrana Plasmática íntegra (%)	
	Temperatura		Temperatura	
	22 ^o C	37 ^o C	22 ^o C	37 ^o C
Controle	0,4 ^b	2,02 ^b	80,3 ^a	86,1 ^a
Ionóforo de Cálcio (A23187)	5 min	0,9 ^b	4,64 ^b	77,2 ^a
	10 min	1,3 ^a	8,95 ^b	83,1 ^b
	30 min	1,4 ^a	14,7 ^a	75,8 ^a
	60min	1,9 ^a	16,6 ^a	82,7 ^b
			76,1 ^a	81,3 ^b
			75,3 ^a	70,6 ^c

Na Tabela 7 foi apresentada a porcentagem de espermatozoides com a membrana acrossômica intacta e não intacta após o congelamento e após a indução da reação acrossômica com ionóforo de cálcio A23187

por meio de avaliação com as colorações FITC-PNA e IP nos diferentes grupos tratados com os inibidores de serino protease e o controle.

Tabela 7. Porcentagem de espermatozoides pós-descongelamento com membrana acrossômica íntegra, e acrossoma não intacto e intacto pré a indução (Pré-RAI) e pós a indução da reação acrossômica (Pós-RAI) com o ionóforo de cálcio A23187, do número total de espermatozoides.

Tratamento	Pré-RAI (%)		Pós-RAI (%)
	Membrana plasmática e acrossoma intacto	Membrana plasmática e acrossoma não intacto	Membrana plasmática e acrossoma não intacto
Controle	21,3±8,3	0,8±0,6 ^b	2,9±1,9 ^a
BZ	5,0 µM	20,4±7,5	1,0±0,6 ^b
	7,5 µM	27,1±5,7	0,8±0,3 ^b
	9,0 µM	19,5±11,7	0,7±0,6 ^b
BN	1,0 µM	29,5±4,9	3,4±0,8 ^a
	2,5 µM	19,7±7,4	0,7±0,2 ^b
	5,0 µM	21,3±7,4	0,8±0,4 ^b
ip	4,0 µM	30,9±7,7	1,0±0,7 ^b
			3,0±1,2 ^a

*Dados apresentados como percentual ± desvio padrão para diferentes avaliações da integridade física do acrossoma e da membrana plasmática pelos corantes PNA-FITC e Iodeto de propídio, respectivamente, por citometria de fluxo como descrito em material e métodos. (BZ)= Benzamidina, (BN)= Berenil, (ip)= Inibidor Purificado. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (p>0,05).

Diferença significativa entre Pré-RAI e Pós-RAI (p <0,05).

Não foi observada diferença estatística (p>0,05) quanto à porcentagem de espermatozoides com a membrana

acrossômica e plasmática íntegra após o descongelamento e após a indução da reação acrossômica entre os grupos tratados com o

inibidor de serino protease e o controle. Contudo, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) do número de espermatozoides com acrossoma não intacto após a indução com o ionóforo de cálcio.

Na tabela 8 foi calculada a taxa de reação acrossômica relativa aos espermatozoides que apresentaram membrana plasmática íntegra. Foi observado

aumento de espermatozoides com acrossoma não intacto após a indução indicando resposta positiva ao ionóforo de cálcio A 23187. Entretanto não foi observada diferença da taxa de reação acrossômica ($p > 0,05$) entre os tratamentos antes e após a indução da reação acrossômica pós descongelamento.

Tabela 8. Taxa de reação acrossômica (RA) do total de espermatozoides pós-descongelamento com membrana plasmática íntegra pré a indução (Pré-RAI) e pós a indução da reação acrossômica (pós-RAI).

Tratamento	Taxa de espermatozoides RA+/espermatozoides com Membrana plasmática (%)	
	Pré-RAI	Pós-RAI
Controle	3,8±1,6 ^b	12,7±6,7 ^a
BZ	5,0 µM	4,4±2,0 ^b
	7,5 µM	3,0±1,0 ^b
	9,0 µM	3,0±1,2 ^b
BN	1,0 µM	2,6±0,9 ^b
	2,5 µM	3,5±0,8 ^b
	5,0 µM	3,7±2,6 ^b
Ip	4,0 µM	3,8±2,8 ^b

Dados apresentados como média de porcentagem ± desvio padrão para a avaliação da integridade física do acrossoma pela coloração PNA-FITC, antes e após a indução da reação acrossômica, utilizando o inoforo de cálcio 23187, por citometria de fluxo. (BZ)=Benzamidina (BN)=Berenil (ip)=Inibidor Purificado. Nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) foi observada para as variáveis avaliadas nas análises entre os tratamentos. Diferença significativa Pré-RAI e Pós-RAI ($p < 0,05$).

Na tabela 9 foram apresentados os índices de fragmentação do DNA entre os grupos tratados com o inibidor de serino protease e o controle após o descongelamento do sêmen equino. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados com os inibidores e o controle. Os espermatozoides equinos pós-

descongelamento apresentaram baixo índice de fragmentação, decorrente de alta porcentagem de células maduras ($IDF^{Indetectável}$) e dos sub-índices de desfragmentação muito baixos. As amostras também apresentam baixa porcentagem de células imaturas.

Tabela 9. Valores Médios (\pm SD) dos índices de fragmentação do DNA do espermatozóide eqüino pós-congelamento.

Tratamento	Estrutura da Cromatina α						
	Células Imaturas	Células Maduras		Sub-Índices de fragmentação			
	DNA ^{Alto Teor}	IDF ^{Indetectável}	IDF ^{Total}	IDF ^{Baixo}	IDF ^{Médio}	IDF ^{Alto}	
Controle	4,6 \pm 1,2	98,1 \pm 0,8	1,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	
BZ	5,0 μ M	4,5 \pm 0,7	97,8 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4	1,2 \pm 0,4	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
	7,5 μ M	5,0 \pm 0,8	98,7 \pm 0,9	2,4 \pm 1,3	1,7 \pm 1,1	0,6 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	9,0 μ M	4,5 \pm 0,8	98,2 \pm 0,5	1,6 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
BN	1,0 μ M	4,7 \pm 1,0	98,2 \pm 0,8	1,7 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	2,5 μ M	4,7 \pm 1,1	97,3 \pm 0,9	2,2 \pm 0,8	1,3 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	0,2 \pm 0,3
	5,0 μ M	4,8 \pm 1,2	98,2 \pm 0,2	1,5 \pm 0,6	0,9 \pm 0,9	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
ip	4,0 μ M	4,7 \pm 1,1	97,0 \pm 0,6	1,9 \pm 0,6	1,2 \pm 0,4	0,5 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2

α Dados apresentados como média das porcentagens \pm desvio padrão para diferentes estruturas de cromatina avaliadas pela coloração com alaranjado de acridina por citometria de fluxo. DNA^{Alto Teor} = células imaturas com alta intensidade de fluorescência do tipo 1 (verde - FL1). IDF = índice de desfragmentação da cromatina identificado pela intensidade de fluorescência do tipo 3 (vermelha - FL3). Nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) foi observada para as variáveis avaliadas nas análises entre os tratamentos.

4. Discussão

No presente experimento, foi observada redução da motilidade espermática após quatro horas do início do resfriamento (Vidament et al, 2000). Quanto maior o tempo de armazenamento do sêmen maior a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes podem levar a peroxidação de lipídios de membrana afetando sua fluidez (Yagi 1982; Box et al., 1995).

É possível que o período de armazenamento do sêmen, na temperatura de resfriamento, utilizado no presente experimento tenha sido suficiente para formação de ROS levando a redução da motilidade espermática do sêmen resfriado comparado ao sêmen fresco e diluído no grupo controle.

Uma vez que a adição de inibidores sintéticos e natural de serino protease aos diluidores de resfriamento e congelamento de sêmen não melhorou a qualidade do sêmen eqüino no presente experimento, é possível que estes não tenham atuado sobre os mecanismos responsáveis pelo controle da motilidade e integridade física e funcional da membrana plasmática do espermatozóide eqüino. Inibidores de serino protease atuam em diferentes sistemas

enzimáticos presentes na membrana, desde o bloqueio da inativação da atividade adenil ciclase, como observado em espermatozoides de suíno (Okamura et al., 1990), até a reação acrossômica, observada em espermatozoides de camundongo (Fraser, 1982, Lai, 1982). Inibidores de serino protease se ligam a uma enzima do tipo tripsina de membrana plasmática, a qual bloqueia a adenil ciclase como foi relatado em espermatozoides suíno do epidídimo (Okamura et al., 2002). Uma vez que os inibidores estão presentes no plasma seminal eqüino, no sêmen ejaculado ocorreria bloqueio da ação inibitória da tripsina sobre a adenil ciclase, iniciando os mecanismos envolvidos com a capacitação espermática (Okamura et al., 1990, Okamura et al., 2002). A adição dos inibidores ao sêmen antes do resfriamento e congelamento poderia impedir que ocorresse a reação acrossômica decorrente de alterações resultantes da criopreservação. Inibição da reação acrossômica do espermatozóide de suíno do epidídimo foi relatado com a adição de p-aminobezamidina ao sêmen (Green, 1978). Se os inibidores de serino protease tivessem bloqueado a ação da tripsina sobre a adenil ciclase, no presente experimento, os grupos tratados com os inibidores apresentariam poderiam

apresentar uma maior ou menor taxa de capacitação espermática comparada ao controle. No entanto, isto não foi observado no presente experimento, sugerindo que a adição dos inibidores de serino protease ao sêmen eqüino não impediu os efeitos deletérios resultantes do processo de congelamento e resfriamento dos espermatozoides.

Como observado em espermatozoides eqüino, no presente experimento, não foi verificada diferença da motilidade espermática após a adição de inibidores de serino proteases (*p*-Aminobenzamidina e benzamidina) como foi observado no sêmen de camundongo (Liu e Meizel, 1979; Fraser, 1982), porco da índia (Perreault et al., 1982), e suíno (Winnica et al., 2000).

Durante a capacitação espermática a adenilato ciclase favorecem a produção AMPc, a qual ativa a proteinase quinase A (PKA). A PKA induz a fosforilação de proteínas tirosina produzindo substratos (Visconti e Koft, 1998; Flesh e Gadella, 2000; Gadella e Colenbrander, 2003). Estes em presença de AMPc favorece a produção de ATP, substrato energético responsável pela motilidade espermática (Salem et al, 1992). Outro mecanismo do AMPc é quando este está associado a síntese de proteínas mitocondriais regulando a motilidade espermática via PKA (Bragg & Handel, 1979; Task & Meas, 1976). É possível que os inibidores não tenham atuado sobre os mecanismos controladores da atividade adenil ciclase e conseqüentemente os grupos tratados não tenham diferido do controle quanto a motilidade, integridade física e funcional da membrana plasmática do espermatozoide eqüino.

Durante o armazenamento do sêmen ocorre a produção de ROS, os quais através de suas propriedades anfipáticas poderiam atravessar vários compartimentos celulares favorecendo sua interação com diferentes proteínas, interferindo na função das mesmas (Silva et al., 2006). Os oxigênios reativos poderiam agir sobre as serino proteases desbloqueando a adenil ciclase, a qual promoveria a redistribuição e translocação de fosfolipídios, principalmente, fosfatidilcolina induzindo a desestabilização da membrana plasmática

(Flesh e Gadella, 2000), durante a criopreservação.

Outro fator que poderia interferir com a atividade de algumas proteínas seria a redução de temperatura para +5°C. Esta poderia induzir a ativação prematura da acrosina (e de outras serino protease acrossômicas) e essa ativação poderia induzir a uma proteólise interna do acrossoma, resultando em danos da função dessa estrutura, como foi observado em espermatozoides de peru (Kotlowska et al., 2007). A atividade da enzima acrosina pela hidrólise do BApNA em espermatozoides eqüino, resfriado e fresco foi avaliada. Os resultados demonstram que não há diferença significativa na atividade da acrosina no sêmen fresco e resfriado, ou seja, a acrosina não perde atividade quando é resfriada, ou mantida em temperatura ambiente. Quando este mesmo procedimento foi realizado na presença de inibidores de serino protease, também não houve diferença nos resultados comparados aos procedimentos sem os inibidores (Neurath et al., 2005). Isto pode ser explicado pelo fato de que o plasma seminal já possui inibidores, e esses já estivessem ligados as serino proteases, impedindo a ação de novos inibidores, principalmente no sêmen fresco, pois a estequiometria da reação é 1:1 (Jonakova et al., 1991; Hermans et al., 1994; Ball et al., 1997).

Da mesma forma, nenhum efeito diferencial dos inibidores foi identificado no sêmen pós-congelamento. Hipótese para o acometido pode ser pela ação do agente crioprotetor utilizado glicerol. Em trabalhos realizados com espermatozoides de hmanso quando o glicerol foi usado para extração bioquímica da acrosina (Goodpasture et al., 1980), esse induziu aumento do potencial enzimático da acrosina (Schill e Fritz , 1976). Há, portanto, indícios de que o inibidor de serino protease não tenha apresentado efeito no presente estudo em decorrência da presença do glicerol presente no meio de congelamento. Deste modo, o glicerol poderia ter aumentado a atividade da serino protease, como relatado por (Schill e Fritz , 1976; Goodpasture et al., 1980; Ball et al., 1997), sendo necessária uma maior concentração do inibidor para se obter o efeito desejado sua inibição.

No presente trabalho foi possível iniciar um estudo comparativo da utilização do corante, Azul de Tripán e Iodeto de Propídio na avaliação da integridade física do espermatozoide equino por meio de citometria de fluxo. Visto que a maioria dos corantes apresenta um alto custo, a utilização de um corante com um valor mais baixo como o Azul de Tripán torna-se de grande valia aos estudos da avaliação dos espermatozoides equino, proporcionando uma redução do custo da técnica na citometria de fluxo.

A taxa de reação acrossômica observada nos espermatozoides do grupo controle (3,8%) não foi maior ($p > 0,05$) que nos grupos tratados com os inibidores (2,6 a 4,4%). Ao contrário, em estudos com espermatozoides de camundongo e porco da Índia, após a adição de benzamida (inibidor competitivo de serino protease) foi observada inibição da vesiculação da membrana plasmática e acrossômica externa e da dispersão da matriz acrossomal, após indução com ionóforo de cálcio A23187 (Fraser 1982; Perreault, et al., 1982). A resposta a indução da reação acrossômica pode variar de acordo com o indutor utilizado. Embora os inibidores de serino protease utilizados em estudos com espermatozoides de camundongo (Fraser 1982) e porco da Índia (Perreault, et al., 1982), tenham sido os mesmos utilizados no presente experimento, não foi observado diferença entre a taxa de reação acrossômica induzida entre o grupo controle e os grupos tratados com inibidores sintéticos e natural de serino protease. A diferença quanto a taxa de reação acrossômica observada de acordo com o inibidor utilizado pode ter sido decorrente da diferença entre as espécies estudadas e o método de estudo empregado (Perreault et al., 1982).

Em espermatozoides de humanos quando a reação acrossômica foi induzida por progesterona na presença de inibidores sintéticos de serino protease não ocorreu a reação acrossômica (Pillai e colaboradores 1991). Ao contrário, com a indução por ionóforo de cálcio houve inibição da vesiculação com perda da matriz acrossomal. Resultados semelhantes foram relatados com espermatozoides de camundongo (Fraser, 1982) e rato (Lui e

Meizel, 1979). Por outro lado, em espermatozoides de porco da Índia foi observado que o inibidor sintético de serino protease, (p-Aminobenzamida) não bloqueava a vesiculação da membrana e sim a dispersão da matriz acrossomal (Green, 1978).

A integridade do DNA das células espermáticas é modificada no processo de espermiogênese e maturação espermática no epidídimo com a substituição das histonas por protaminas responsáveis pela condensação final e estabilização da cromatina espermática (Steger, 1999; Kierszenbaum, 2001; Rodríguez-Martínez, et al., 1990). A sua estabilização é mantida por componentes do plasma seminal como zinco e proteínas ligadas ao zinco (Kvist et al., 1980). A integridade da estrutura da cromatina espermática é um importante fator na fertilização e desenvolvimento embrionário, e pode ser afetada pela composição do meio de congelamento e temperatura e tempo de armazenamento do sêmen (Evenson et al., 1980; Morris, et al., 2002; Love et al., 1998).

Foi verificado que o congelamento de sêmen reduz significativamente a integridade do DNA do espermatozoide equino, sendo um dos problemas nas taxas de fertilidade. Este efeito pode ser decorrente das espécies oxigênio reativas (ROS) ou até mesmo dos protocolos de congelamento. Em um estudo conduzido por Love et al. (2005) ficou demonstrado que o aumento da quantidade de plasma seminal em ganhos altamente férteis, pode levar a um declínio na integridade do DNA, sem, contudo, serem observadas queda na motilidade, isto decorrente da presença de ROS. No presente trabalho não foi observado um alto índice de fragmentação do DNA dos espermatozoides dos animais de estudo, representado pela média e desvio padrão dos valores de células maduras no parâmetro $IDF^{Indetectável}$. Foi demonstrado que a qualidade do DNA espermático de alguns ganhos de baixa fertilidade pode ser menor do que em ganhos férteis quando em condições de armazenamento similares (Love, 2005). Deste modo, é possível inferir que os animais do presente estudo apresentaram uma boa qualidade estrutural do DNA espermático. A

desnaturação da cromatina é mais alta no sêmen de garanhões sub-férteis em comparação a garanhões férteis (32% versus 16%) e o escore de desnaturação é negativamente correlacionado com a taxa de prenhez (Kenney et al., 1995).

O presente estudo corrobora com os trabalhos realizados Kvist e colaboradores (1980) e Neild colaboradores (2005) nos quais que a variação individual do índice de fragmentação do DNA espermático equino está relacionado somente a espermiogênese e não a fatores ligados ao processo de criopreservação do sêmen.

5. Conclusão

A adição de inibidores de serino protease natural ou sintético, no meio de resfriamento e congelamento do semen equino, mostrou que estas proteínas não melhoram a qualidade espermática pós-descongelamento. Em relação aos parâmetros avaliados integridade e funcionalidade da membrana plasmática, integridade do acrosoma, na indução da reação acrossomica, motilidade progressiva e na estrutura do DNA.

CAPÍTULO IV

SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

Conforme sugerido na discussão dos dados recomendam-se estudos físico-químicos do inibidor de serino protease (natural) do plasma seminal equino, para dirimir quaisquer dúvidas quanto ao seu papel de associação enzima-inibidor natural. Além de estudos do seu efeito inibidor no processo de fertilização.

Trabalhos futuros devem ser realizados para elucidar a estrutura primária do inibidor de serino protease, visto que a comparação com outras enzimas com a mesma característica torna-se de grande interesse para o estudo proteômico. Outro fato de estudo são as diferentes isoformas encontradas do inibidor que podem estar relacionadas à individualidade do animal ou a fatores relacionados à maturidade sexual.

Quanto ao efeito do inibidor sobre as células espermáticas é necessário um esclarecimento se realmente constituintes do meio de congelamento como o glicerol, ou o efeito da diluição podem ter sido os fatores

preponderantes para a não ação do inibidor sobre as células espermáticas.

Como se pode observar o tema deste estudo é bastante amplo e não se considera que tenham sido esgotadas todas as variáveis envolvidas no processo de criopreservação e de sua melhoria nesta investigação. Uma vez que foge ao nosso objetivo, neste trabalho não foram investigados o potencial de ação do inibidor de serino protease nem o sequenciamento do mesmo. Considera-se que dado o caráter deste trabalho como iniciador de uma linha de pesquisa.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1) ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. RAFF, M.; KEITH, R. e WALTER, P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: _____. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 4 ed. Cap. 10, p. 583-595.
- 2) ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.105–113, 2005.
- 3) AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1992. Cap. 80, p. 717-718.
- 4) AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Practice*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- 5) ANDERSEN, C.Y. Concentrations of free estradiol and progesterone in human preovulatory follicular fluid. *Hum Reprod*, v.6, p.359–364, 1991.
- 6) ANDREWS, P. The gel filtration behaviors of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem .J*, v.96, p. 595-606, 1965.
- 7) ANTÃO, C.M.; MALCATA, F.C.X Plant serine protease biochemical, physiology and molecular features. *Plant physiology and Biochemistry*, v.43, p.637-650, 2005.

- 8) ARBOLETA, C.E.; GERTON, G.L. Proacrosin/Acrosin during guinea pig spermatogenesis. *Developmental Biology*, v.125, p.217-225, 1988.
- 9) ASCENZI, P.L.; MENEGATI, E.; BORTOLOTTI, F.; GUARNIERI, M.; ANRONINI, E. Steady-state and pre-steady-state kinetics of trypsin catalysed hydrolysis of CBZ ester. *Biochem. Biophys. Acta*, v.658, p.158-164, 1981.
- 10) ASHWORTH, P. J. C.; HARRISON, R. A. P.; MILLER, N. G.A. et al. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction Fertility Development*, v. 6, p. 173-180, 1994.
- 11) AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p. 185-192, 1997.
- 12) BABA, M.; TANAKA, H.; De CLERCQ, E.; PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; NAKASHIMA, H.; PERNO, C.F.; WALKER, R.T.; MIYASAKA, T. Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclouridine derivative. *Biochem Biophys Res Commun* v.165, p.1375-81,1989.
- 13) BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. v.21, 2000.
- 14) BALDI, E.; LUCANI, M.; BONACCORSI, L.; FORTI, G. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol*, v.53, p. 121-131, 2002.
- 15) BALL, B.A.; FAGNAN, M.S.; DOBRINSKI, I. Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.48, p.1191-1198, 1997.
- 16) BALL, B. A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, n.2-4, p. 299-300, 2002.
- 17) BALL, M.A.; PARKER, GA. Sperm competition games: sperm selection by females. *J Theor Biol*. v.7, p.27-42. 2003.
- 18) BARTH, A.D. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility *Can Vet J*. v.8, p.656-662. 1989.
- 19) BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A. et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, n. 7, p. 1239-1247, 2003.
- 20) BAZER, F.W.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T. Fertilização, clivagem e implantação. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 8, p. 191-193.
- 21) BEDFORD, J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*, v.2, p.128-158, 1970.
- 22) BEDFORD, J.M.; CALVIN, H.I. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zoo*, v.188, p.137-55 1974.
- 23) BEDFORD, S. J.; MIRANDA, P. V.; VISCONTI, P. E. Media requirements for stallion sperm capacitation. In: PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p.50-52.
- 24) BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, p. 1338-1344, 2006.
- 25) BHATTACHARYYA, A.K.; SARKAR, S.R.; DATTA, D. inhibitory properties of several synthetic compounds towards human and goat Acrosin and Trypsin. *Int. Journal Fertil*, v. 31, p.293-297, 1986.
- 26) BLOTTNER, S.; WEGNER, I.; ROELANTS, H. e JEWGENOW, K. 1998. Durchflußzytometrische Bestimmung des akrosomalen status von Bullen und Hengstsperrmien nach markierung mit FITC-konjugiertem PNA

- (peanut agglutinin). *Tierärztl Umschau*, v. 53, p. 441-447.
- 27) BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*, v.204, p. 433-451, 1992.
 - 28) BOETTGER-YONG, H.; AARONS, B.; BIEGLER, T.; POIRIER, G.R. Competition between zona pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding. *Biology of Reproduction*, v. 47, p.716-722, 1992.
 - 29) BOX, H.C.; FREUND, H.G.; BUDZINSKI, E.E.; WALLACE, J.G.; MACCUBBIN, A.E. Free radical induced double base lesions. *Radiat Res*, v.4, p.141-149, 1995.
 - 30) BRANDON,C.I.; HEUSNER,G.L.; CAUDLE,A.B.; FAYRER-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.
 - 31) BRAGG P.W.; HANDEL M.A. Protein synthesis in mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, v.20, p.333-337, 1979.
 - 32) BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOORE, H.D.; ENGLAND, G.C.; Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.491-497,2001.
 - 33) BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.
 - 34) CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology*, v.58, p.1587-95, 2002.
 - 35) CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M. e DROBNIS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Andro.*, v. 14, p. 289-297, 1993.
 - 36) CELEGHINI, E.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*. v.42, p.479-88, 2007.
 - 37) CHENG,F.P.; GADELLA, B.M.; FAZELI, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B.; VOORHOUT, W.F. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biology of Reproduction*, v. 59, p.733-742, 1998.
 - 38) CHENG, FP, Fazeli, A, Marks, A, Bevers, MM, Colenbrander, B, and Voorhout, WF. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome eaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.17, p.674-682,1996.
 - 39) CHOU, K.C.; CAI,Y.D. Preditions of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical research. Communications*, v.339, p.1015-1020, 2006.
 - 40) CHRAMBACH, A.; RODBARD, D. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science*, v. 30, p.440-51, 1971.
 - 41) COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; FROMAN, D. P. e PICKETT, B. W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v. 22, p. 25-38, 1984.
 - 42) COLENBRANDER, B.; BROWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M. et al. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, v. 58, p.341-345, 2002.
 - 43) CROSS, N. L. e MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod*, v. 41, p. 635-641, 1989.
 - 44) DAVIE, J.R.; DELCUVE, G.P. Characterization and chromatin distribution of the H1 histones and high-mobility-group non-histone chromosomal

- proteins of trout liver and hepatocellular carcinoma. *Journal. Biochem*, v. 280, p.491-7 1991.
- 45) DELPECH, S.; THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C. e HUNTER, R. H. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993. Cap. 14, p. 268-278.
- 46) DETERMANN, H.; MICHEL, W. The correlation between molecular weight and elution behavior in the gel chromatography of proteins. *J. Chromatography*, v. 25, p.303-313, 1966.
- 47) DIXON M, WEBB EC Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note *Adv Protein Chem*, v.16, p.197-219, 1961.
- 48) D'OCCHIO, M.J.; HENGSTBERGER, K.J.; JOHNSTON. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science*, v.1001, p.1-17, 2007.
- 49) EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: Knobil, E.; Neill, J. D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. 2ed. Cap. 2, p. 29-77.
- 50) ELLERMAN, D.A.; DA ROS, V.G.; COHEN, D.J.; BUSO, D.; MORGENFELD, M.M.; CUASNICU P.S. Expression and structure-function analysis of de, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. *Biol Reprod*, v.37, p.1225-31, 2002.
- 51) EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v.5, p.1131-3, 1980.
- 52) EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.U.; CLEGG, E.; PURVIS, K. ET AL. Utility of the sperm chromatin structure assay as diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod*, v.14, p.1039-1049, 1999.
- 53) FELLEBERG, R.V.; ZWEIFEL, H.R.; GRUENIG, G.; PELLEGRINI, A. Proteinase inhibitors of horse seminal plasma. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v.366, p. 705-712, 1985.
- 54) FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- 55) FRASER, L.; STZEZEK J. Effect of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.530-536, 2005.
- 56) FRASER, L.R. p-Aminobenzamide, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.65, p.185-194, 1982.
- 57) FREUD, M. Mechanisms and problems the sperm transport. In: _____. *The Regulation of mammalian Reproduction*. Edit. by S.J. Segal, R. Crozier, P.A. Corfman and P.G. Condliffe. Thomas, Springfield, Illinois, p.352, 1973.
- 58) FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Effect of freezing and thawing protocols on post-thaw quality of equine semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.57, p. 599-607, 2005.
- 59) GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: *PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS*, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p. 43-48.
- 60) GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.
- 61) GADELLA, B. M.; LOPES-CARDOSO, M.; VAN GOLDE, L. M. G.; COLENBRANDER, B.; GADELLA Jr, TWJ. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction: Evidence for a primary capacitation event in boar

- spermatozoa. *J. Cell Sci*, v. 108, p. 935-945, 1995.
- 62) GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. e PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biology of Reproduction*, v. 34, p. 127-138, 1986.
- 63) GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e plasma seminal In: Hafez, E.S.E.; Hafez, B. Reprodução animal, malone: Barueri, ed7. Cap.7 p.97-110, 2004.
- 64) GOODPASTURE, J.C.; POLAKOSKI, K.L.; ZANEVELD, L.J.D. Acrosin, proacrosin and acrosin inhibitor of human spermatozoa: Extration, quantitation and stability, *J.Androl*, v.1, p.16-27, 1980.
- 65) GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*, v. 12, p. 131-147, 1996.
- 66) GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod*, v. 43, p. 55-64, 1990.
- 67) GRAHAM, J. K.; CRABO, B. G.e PACE, M. M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of Animal Science*, v. 47, p. 80-119, 1978.
- 68) GREEN, G.R.; BALHORN, R.; POCCIA, D.L.; HECHT, N.B. Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.255-63, 1994.
- 69) HACHEY, L.D.; CHAURAND, P. Proteomics in reproductive medicine: the technology for separation and identification of proteins. *Journal of Reproductive Immunology*, v.63, p. 61-73, 2004.
- 70) HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: __. Reprodução Animal. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 24, p. 513-535.
- 71) HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, v.11, p.73- 88, 1990.
- 72) HARRIS, D.C. Quantitative Chemical Analysis. W.H Freeman and Company, New York. 1999.
- 73) HARRIS, D.A; BASHFORD, C.L. Spectrophotometry e spectrofluorimetry. 1nd ed. England: *Practical approach series*, p.49-59, 1987.
- 74) HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*, v. 88, p.343-52, 1990.
- 75) HARRISON, RAP, Ashworth, PJC, and Miller, NGA. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development*, v.45, p.78-391,1996.
- 76) HAUGLAND, RP. Assays for cell viability, proliferation and function. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 2004.
- 77) HEDSTRAM, L.; SZILAGYI, L.; RUTTER, W. Converting Trypsin to chymotrypsin: The role of surface loops. *Science*, v.225, p.1249-1253, 1992.
- 78) HEITLAND, A. V.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. e PICKETT, B. W. Motility and fertility of stallion sperm cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. *Biology of Reproduction Monograph*, v. 1, p. 753-759, 1996.
- 79) HOLDEN, CA, Hyne, RV, Sathananthan, AH, and Trounson, AO. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Molecular Reproduction and Development*, v.25, p.247-257,1990.
- 80) HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p.3-22, 2000.
- 81) HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool*, v. 230, p. 473-483, 1984.

- 82) INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma, *J.Vet.Med.Sci*, v.64, p.75-77, 2002.
- 83) ICHIMURA, K.; OHMACHI, K. Effects of chlorpromazine on reticuloendothelial phagocytosis and antibody formation in mice. *J Reticuloendothel Soc*, v.3, p.239-50, 1971.
- 84) JANSEN, S.; JONES, R.; JENNECKENS, I.; MARSCHALL, B.; KREIGESMANN, B.; COADWELL, J.; BREINIG B. Site-directed mutagenesis of boar proacrosin reveals residues involved in binding of zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development*, v.51, p. 184-192, 1998.
- 85) JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*, v.4, p.859-75, 2000.
- 86) JASKO, D. P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Veterinaria*, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.
- 87) JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 37, p.1241-1252, 1992.
- 88) JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.32, p. 99-107, 2003.
- 89) JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, v.70, p.219-28, 1984.
- 90) JOBIM, M.I.M.; SCHMITT, F.L.; OBERST, E.R.; BRONZATTO, M.; KROTH, E.; SMIDERLE, W.; MATTOS, R.C. Perfil proteína do plasma seminal de garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen. *Rev. Bras. Reprod. An.* v.27, p.209-211, 2003.
- 91) JONES, K. H.; SENFT, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The J. Histochem Cytochem*, v. 33, p. 77-79, 1985.
- 92) KASLIK, G.; PATTHY, A.; BÁLINT, M.; GRÁF, L. Trypsin complexed with α -1-proteinase inhibitor has an increased structural flexibility. *FEBS Lett*, v.370, p.179-183, 1995.
- 93) KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*, v.5, p.508-511, 1997.
- 94) KENNEY, R. M., BERGMANN, R. V., COOPER, W. L. e MORSE, G. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proceedings American Association Equine Practice*, v. 21, p. 327-349, 1975.
- 95) KIERSZENBAUM, A.L. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev.* v.4, p.357-8. 2001.
- 96) KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- 97) KIRK, E. S. Flow cytometric evaluation of stallion sperm. TESE. (Master of Science) – Colorado University, Fort Collins. 131p, 2001.
- 98) KOTLOWSKA M, DIETRICH G, WOJTCZAK M, KAROL H, CIERESZKO A. Effects of liquid storage on amidase activity, DNA fragmentation and motility of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.276-286, 2007.
- 99) KVIST, U, AFZELIUS, BA, NILSSON, L. The intrinsic mechanism of chromatin decondensation and its activation in human spermatozoa. *Dev Growth Differ* V.22, p.543-544, 1980.
- 100) LAGARES, M. A; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Preservação do

- sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivos da Faculdade de veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.
- 101) LAI, M.L.; CHEN, S.W.; CHEN, Y.H. Purification and characterization of trypsin inhibitors from mouse seminal vesicle secretion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 290, p. 265-271, 1991.
- 102) LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, n. 2, p. 48-54, 1997.
- 103) LAMIRANDE, E.; BELLE-ISLES, M.; GAGNON, C. Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Analns new york academy of sciences*, 1988.
- 104) LANDIM-ALVARENGA, F. C.; GRAHAM, J. K.; ALVARENGA, M. A. e SQUIRES, E. L. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during in vitro capacitation. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 96 – 105, 2004.
- 105) LAURENT, T.C.; KILLANDER, J. A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr*, v.14, p.317-330, 1964.
- 106) LAWRENCE, P.K.; KOUDAL, K.R.; Plant protease inhibitors in controlo f phytiphagous insects. *Eletronic journal of Biotechninology*, v.5, p.93-109, 2000.
- 107) LENZI, A., PICARDO, M., GANDINI, L. DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum. Reprod*, Update, v.2, p.246-56, 1996.
- 108) LEWIS, R.V.; AGUSTIN, J.S.; KRUGGEL, W.; LARDY, H.A. The structure of caltrin, the calcium-transport inhibitor of bovine seminal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 82, p. 6490-6491, 1985.
- 109) LEWIS, M.S.; KRIEG, L.C.; KIRK, W.D. The molecular weight and detergent binding of bovine rhodopsin. *Exp Eye Res*, v.18p.29-40. 1974
- 110) LLANOS, M.N.; MORALES, P.; RIFFO, M.S. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool*,v,267 p.209-16, 1993.
- 111) LOIR, M.; BOUVIER, D.; FORNELLS, M.; LANNEAU, M.; SUBIRANA, J.A. Interactions of nuclear proteins with DNA, during sperm differentiation in the ram. *Chromosoma*,v.92, p.304-12,1985.
- 112) LOMEIO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. “Water test”: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *International Journal Andrology*, v. 14, p. 278-282, 1991.
- 113) LOVE CC, BRINSKO SP, RIGBY SL, THOMPSON JA, BLANCHARD TL, VARNER DD. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.1584-1591, 2005.
- 114) LOVE, C.C.; KENNEY, R.M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*, v.50, p.955-972, 1998.
- 115) MAGISTRINI, M. Semen evaluation. IN: SAMPER, J. C. Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. Cap.8.
- 116) MANN, T. Biochemistry of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.23, p.47-52, 1975.
- 117) MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen general features of the seminal plasma. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, p. 28–34, 1981.
- 118) 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.
- 119) MARDEN, W.; WERTHESTEN, N.T. Influence of seminal fluid on sperm motility. *Fertility and Sterility*, v.7, p.508- 515, 1956.
- 120) MARTINEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J.M.; BALLESCA, J.L.; OLIVRA, R. Proteomic identification of

- human sperm proteins. *Proteomics*, v.6, p. 4356-4369, 2006.
- 121) MATTOS RC, SCHMITT FL, OBERST ER, JOBIM MIM. Influência do Plasma seminal de garanhões de baixa e alta qualidade espermática na motilidade, integridade, funcionalidade de Membrana plasmática resfriado a 4°C. *Rev. Bras. Reprod. An.* v.27, p.336-338, 2003.
- 122) MAYER, D. T.; LASLEY, J. F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing ability of mammalian spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v. 4, p. 261-269, 1945.
- 123) MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of physiology*, v. 247, p.125-142, 1984.
- 124) MEIZEL, S.; LUI, C.W. Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool*, v,195p.137-44,1976.
- 125) MENDOZA C.; TESARIK, J. A plasma-membrane progesterone receptor in human sperm is switched on by increasing intracellular free calcium. *FEBS Lett*, v. 330 p. 57-60, 1993.
- 126) MEYERS, S.A.; OVERSTREET, J.W.; LIU, I.K.; DROBINS, E.Z.; Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl*, v.16, p.47- 54, 1995.
- 127) MEYERS, S. A.; TABLIN, F.; COWE, J. H. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? In: PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p.70-73.
- 128) MÉTAER, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L. Comparison, characterization and identification of protease and protease inhibitors in epididimal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1219-1229, 2002.
- 129) MIES FILHO, A. Tecnologia do semen I – Exame e classificação. In: _____. Reprodução dos animais e inseminação artificial. Porto Alegre: Sulina, 1975. 3 ed. Vol. 2. p. 423-458.
- 130) MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L. e GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to stallion sperm improves cryosurvival and osmotic tolerance limits. In: Proceedings 30th Annu. Mtg. Am. Soc. Androl., Seattle, WA. *American Society of Andrology, Schaumburg, IL.* P.77, abstract 115, 2005.
- 131) MORAN, D. M. Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa. Fort Collins: Colorado State University, 1992.
- 132) MORRIS, ID, ILOTT, S, DIXON, L, BRISSON, DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by the single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* v. 17, p. 990-998, 2002.
- 133) MORTINER, S.T.; SCHEVAERT, D.; SWAN, W.A.; MORTINER, D. Quantitative observations of flagella motility of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.12, p.1006-1012, 1997.
- 134) MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J.Androl*, v.27, p.201-211, 2006.
- 135) NEILD DM, BROUWERS JFHM, COLENBRANDER B, AGUERO A, GADELLA BM. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.230-238, 2005.
- 136) NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, v.224 , p. 350-7, 1984.
- 137) NEURATH, H. The regulation of protease action: Na overview. In: Innovations in proteases and their

- inhibitors (Aviles, F.X.ed) Editora de Gruyeter, Berlin, 1993.
- 138) OLIVEIRA M.; RUIZ, T.; TARAZONA, A.; GIRALDO, C. El espermatozóide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col.Cienc. Pec*, v.19, p.426-436, 2006.
- 139) OSMAN, R.A.; ANDRIA, M.L.; JONES, A.D.; MEIZEL, S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, v.160, p.828-833,1989.
- 140) OKAMURA, N.; ONOE S.; KAWAKURA, K.;TAJIMA, Y.; SUGITA, Y. Effects of a membrane-bound trypsin-like proteinase and seminal proteinase inhibitors on the bicarbonate-sensitive adenylate cyclase in porcine sperm plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, v. 1035, p.83-9 1990.
- 141) OLIVA, M.L.V.; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.C.; ARAUJO, M.S.; SILVEIA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELA, R.; ECKERSON, C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Leucaena leucocephala serine protease inhibitor; primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat parv edema. *Biochimica, et Biophysics Acta*, V.1477, p.64-74, 2000.
- 142) PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- 143) PENHA-SILVA, N. O Efeito de Substituintes sobre a Formação de Complexos entre a α -tripsina Bovina e para-Derivados do Íon Benzamídínio: um Estudo Termodinâmico. DSc Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. (1989)
- 144) PERREAULT, S.D.; ZIRKIN, B.R.; ROGERS, B.J. Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.26, p. 343-351, 1982.
- 145) PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea e Febiger, 1992. Cap. 83, p. 769-789.
- 146) PINTADO, B, De La Fuente, J, and Roldan, ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: Accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*,v.118,p.145-152,2000.
- 147) PILCH, B.; MANN, M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*, v.7, p. 40, 2006.
- 148) POMMER, A. C.; RUTLANT, J.; MEYERS, S. A. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology Reproduction*, v. 68, n. 4, p. 1208-1214, 2003.
- 149) PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature*, v. 183, p.1657-1659,1959.
- 150) POWERS, J.C.; ASGIAN, J.L.; EKICI, O.D.; JAMES, K.E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threosine protease. *Chem. Rev*, v.102, p.4639-4750, 2002.
- 151) PRUIT, J.A.; AMS, M.J.; POOL, K.C. Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (+37 °C) and cold storage (+5 °C). *Theriogenology*, v.39, p. 291-296, 1993.
- 152) RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. e GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 462 – 470, 2001.
- 153) REINERT, M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MANN, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem*, v.15, p.636-40,1996.
- 154) RIGBY, S.L.; BRISNSKO S.P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; VARNER D.D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.171-180, 2001.

- 155) RODGER, J. C. Seminal plasma an unnecessary evil. *Theriogenology*, v.3, p. 237-246, 1975.
- 156) RODGER, J.C.; WHITE, I.G. Free Nacetylglucosamine in marsupial semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.39, p. 383-386, 1974.
- 157) RODRÍGUEZ-MARTINEZ; H, COURTENS; J.L.; KVIST, U.; PLOEN L. Immunocytochemical localization of nuclear protamine in boar spermatozoa during epididymal transit. *JReprod Fertil* v.89, p.591-595, 1990.
- 158) SENGER, P. L. Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation e fertilization. In: __. Pathways to pregnancy and parturition. 2 ed. Moscow: Current Conceptions, Inc, 2003. Cap. 12, p. 266-283.
- 159) SCHILL, W.B.; FRITZ, H. Enhancement of sperm acrosin activity by glycerol-pretreatment quantitative estimations. *Arch Dermatol Res*, v.256, p.1-11, 1976.
- 160) SILVA, P.F.N.; BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm PhD Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine 2006
- 161) SILVA JUNIOR, J.G. Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2004
- 162) SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v.175, p.720-31, 1972.
- 163) SKUTELSY, E.; RANEN, E. e SHALGI, R. Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, p. 35-41, 1994.
- 164) SMITH, A.U., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, v.166, p. 668-669, 1950.
- 165) SOMANATH, P.R.; SURAJ, K.; GANDHI, K.K.; Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rumin Res*, v.37,p.279-286,2000
- 166) SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K., VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M. e BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratoryl, Bulletin n. 9. Fort Collins: Colorado State University, 1999.
- 167) STEGER, D.J.; WORKMAN, J.L. Transcriptional analysis of purified histone acetyltransferase complexes. *Methods*, v.19, p.410-6,1999.
- 168) STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRASER, L. Proteomics of boar seminal plasma-current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology*, v.5, p. 279-290, 2005.
- 169) SZASZ F.; SIRIVAIYAPONG, S; CHENG, F.P; MARKS, A; COLENBRANDER, B; GADELLA, B.M; VOORHOUT, W.F; SOLTI, L. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Molecular Reproduction and Development*. v.55, p.289-298, 2000.
- 170) TALBOT, P.; SUMMERS, R.G.; HYLANDER, B.L.; KEOUGH, E.M.; FRANKLIN, L.E. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool*. v,8 ,p.383,1976.
- 171) TALHOUT, R.; ENGBERTS, J.B. Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamidines to trypsin. *Eur J Biochem*, v, 268, p.1554-60, 2001.
- 172) THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididimal sperm. *Biol. Reproduction*, v.59, p.768-776, 1999.
- 173) TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *J.Repr.Fert* , v.41. p. 329-335, 1974.
- 174) TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in

- fertilization. *Animal Reproduction Science*, v.89, p. 159-170, 2005.
- 175) TRONCOSO, M.F.; ZOLEZZI, P.C.; HELLMAN, U.; WOLFENSTEIN-TONEL, C. A novel Trypsin inhibitors from *Peltophoron dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.411, p.93-104, 2003.
- 176) TURNIPSEED, S.B.; CLARCK, S.B.; ANDERSEN, W.C.; ARBIWNYK, C.M.; MILLER, K.E.; HURLBUT, J.A. Confirmation of diminazene diacetate in bovine plasma using electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 844 ,p. 127-33, 2006.
- 177) VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 29, p. 1043-1054, 1988.
- 178) VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*, v.28, p. 709-723, 1987.
- 179) VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p.115–136, 2005.
- 180) VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M. PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54 p. 907-19 2000.
- 181) VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P., BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. *Theriogenology*, v. 58, p. 249–251, 2002.
- 182) VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology Reproduction*, v. 59, p. 1-6, 1999.
- 183) WARD, W.S.; COFFEY, D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, v.4, p. 569-74. 1991.
- 184) WARSHEL, A.; NARAY-SZABO, G.; SUSSMAN, F. HWANG, J.K. How do serine protease really work? *Biochemistry*, v.28, p.3629-3637, 1989.
- 185) WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction and Fertility Development*, v.7, p.871-891, 1995.
- 186) WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- 187) WEITZE, K.F., PETZOLDT, R. Preservation of semen. *Animal Reproduction Science*, v.28, n.1-4, p.229-235, 1992.
- 188) WENZEL, H.R.; TSCHESCHE, H. Reversible inhibitors of serine proteinase. In: Peptides: Synthesis, structures and Applications. Academic Press, Inc, 1995.
- 189) WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E.L. Enzimas hidrolíticas. In: Princípios de Bioquímica. Editora Guanabara Koogan, 1986.
- 190) WINNICA, E.D.; NOVELLA, M.L.; DEMATTEIS, A.; CORONEL, E.C. Trypsin/acrosin inhibitor activity of rat and guinea pig caltrin proteins: structural and functional studies. *Biology of Reproduction*, v.63, p. 42-48, 2000.
- 191) YAGI, K. Lipid Peroxides in Biology and Medicine. London, New York: Academic Press; 1982, p. 223–42.
- 192) YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. New York: E. Knobil e JD Neil, 1994, p. 189-317.
- 193) YAVELow, J.; FINLAY, T.H.; KENNEDY, A.R.; TROLL, W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Research*, v.43, p.2454 – 2459, 1983.
- 194) ZHAO, Y.; JIN, Y.; WER, S.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitors from skin secretion of

- Bufo andrewsi. *Toxicon*, v.46, p.635-640, 2005.
- 195) ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J. e MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, v. 32, p. 335-343, 2000.
- 196) ZINDL, C.; ASA, C.S.; GÜNZEL-APEL, A.R. Influence of cooling rates and addition of Equex on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (Canis lupus) and Mexican gray wolves (C. l. baileyi). *Theriogenology*, v. 66, p. 1797-1802, 2006.

ANEXO 1.**PROTOCOLO DE PREPARO DO GEL GRADIENTE**

Soluções	Gel de Separação 5%	Gel de Separação 20%
Acrilamida 30%	4,17 mL	16,7 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	6,25 mL	6,25 mL
SDS 10%	250 µL	250 µL
Persulfato de Amônio 10%	125 µL	125 µL
TEMED	25 µL	25 µL
Água Milli_Q	14,18 mL	1,65mL

ANEXO 2.**MEIO DE DILUIÇÃO E CONGELAMENTO**

Meio Kenney (Kenney et al., 1975)

Componente	Quantidade
Glicose	49g
Leite em Pó (desnatado)	24g
Penicilina	1,5x10 ⁶ UI
Estreptomicina	1,5g
pH	7,4
Osmolaridade	392 mOsm
Volume final (1 litro)	

INRA 82 (Vidament et al., 1997)

Componente	Quantidade
Leite desnatado UHT	500 mL
Glicose	25g
Lactose	1,5g
Rafinose	1,5g
Citrato de Sódio	0,25
Citrato de Potássio	0,41g
Hepes	4,76g
Gema de ovo	20 mL (0,2%)
Glicerol	25 mL (2,5 %)
Sulfato de gentamicina	50 mg
Penicilina G	50.000uni
pH	6,9
Osmolaridade	356 mOsm
Volume final (1 litro)	

ANEXO 3.

PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO ESPERMÁTICA CFDA e PI

Solução de coloração

- 20 µL solução A
- 10 µL solução B
- 20 µL solução C
- 950 µL sêmen

Incubar a 30^oC por 8min no escuro. Depositar 3 µL da amostra sobre a lâmina e sobre esta a lamínula. Observar com aumento de 1000X e óleo de imersão (200 esp).

Interpretação – espermatozoides com membrana plasmática íntegra fluorescerão de verde e os com membrana plasmática lesionada corarão de vermelho.

Solução A

- 1mL DMSO
- 0,46 mg CFDA
- (Congelar a -20^oC mantendo no escuro)

Solução B

- 1mL de solução Salina (0,9% NaCl)
- 0,5 mg de PI
- (Congelar a -20^oC mantendo no escuro)

Solução C

- Solução Formolcitrato
- 0,725g citrato de sódio
- 25mL água bidestilada
- Desprezar 1mL e adicionar 1mL formalina (37%)

ANEXO 4.

PROTOCOLO PNA/PI (Citometria de fluxo)

- Descongelar a amostra de sêmen a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Diluir 1:20 em PBS filtrado (0,22 µm) - 250 µL sêmen em 5 mL PBS a 37°C; (SUSPENSÃO)
- Misturar 200 µL da suspensão + 15 µL (Conc. final 1,125 µg/mL) da solução trabalho de FITC-PNA diluída 1:2
- Incubar 10 minutos em temperatura (37°C);
- Adicionar 1 mL PBS + 30 µL PI (1,5 mM) e incubar por mais 10 minutos; (Temperatura ambiente)
- Fazer a leitura no citômetro de fluxo.

Solução Estoque (PNA-FITC)

1500 µg/mL

Solução Trabalho

100 µL da solução estoque + 1 mL PBS (150 µg/mL)

Acrescentar + 1 mL de PBS e pipetar 15 µL nas amostras (75 µg/mL).

ANEXO 5.

PROTOCOLO COM AZUL DE TRIPAN (Citometria de fluxo)

- Descongelar a amostra de sêmen a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Diluir 1:20 em PBS filtrado (0,22 µm) - 250 µL sêmen em 5 mL PBS a 37°C;
(SUSPENSÃO)
- 200 µL da suspensão (diluída em PBS)
- Adicionar 1mL PBS + 5 µL Azul de Tripán 0,4%
- Incubar por 10 min (37°C)
- Fazer leitura no citômetro de fluxo

ANEXO 6.

PROCOLO COLORAÇÃO DNA COM ACRIDINE ORANGE (AO) (Citometria de Fluxo)

- Descongelar a amostra de sêmen a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Amostra mantida a 37°C
- 5 µL de sêmen diluído em 200 µL do **Meio – 1** (37°C)
- Adicionar 400 µL do **Meio – 2** (37°C)
- Após 30 segundos 1.2 mL do **Meio – 3** (37°C)
- Adicionar 10 µL de AO concentração inicial de 1mg/mL (37°C)
- Avaliação 3 minutos após a adição do meio – 3 (37°C)

Interpretação

Verde fluorescente –DNA integro (fita dupla)

Vermelho fluorescente – Dupla com defeito (fita simples)

Soluções dos meios

Meio -1

(4,380g NaCl; 0,790g Tris-HCl; 0,186g EDTA ; em água 500mL deionizada pH7,4)

(Concentração células 1-2 x10⁶ cells/mL)

Meio – 2

(1 mL de 2N de HCl; 2,19g NaCl; 0,25 mL Triton X100 ; preparado em 250 mL água deionizada pH7,4)

Meio -3

(3,8869g ácido cítrico; 8,9429g NaHPO₄; 0,17 g M EDTA Disodiu ; 4,3850g NaCl ;

Contendo **4µg/mL** de (AO) da solução estoque 1mg/mL – água deionizada 500mL pH 6,0

ANEXO 7.

PROTOCOLO DE TITULAÇÃO DO IONÓFORO DE CÁLCIO (Citometria de Fluxo)

- Descongelar a amostra de sêmen a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Adicionar 5 µL (TITULAÇÃO) em 50 x 10⁶ sptz (1 palheta);
- 5 µL do IONO 0,95mM diluída 1: 200 (5µM)
- Preparar amostra para avaliação (Temperatura 22⁰C)
- 5 min; 10 min; 30 min
- Preparar amostra para avaliação a (Temperatura de 37⁰C)
- 5 min; 10 min; 30 min

- Seguir o protocolo do PNA/PI Anexo 2.

ANEXO 8.

PROTOCOLO DE REAÇÃO ACROSSÔMICA INDUZIDA (RAI) (Citometria de Fluxo)

- Descongelar a amostra de sêmen (1 palheta) a 75°C por 7 segundos, seguido de imersão em banho-maria 37°C por mais 30 segundos;
- Adicionar 5 µL da solução trabalho (5µM) em 50 x 10⁶ sptz (1 palheta);
- Incubar por 30 minutos;
- Fazer a leitura com PNA/PI no citômetro de fluxo.

Solução Estoque

Misturar 1 mg de Cálcio ionóforo + 2mL DMSO (Concentração: 0,00095 M)

Solução Trabalho

Misturar 5,26 µL + 994,7 µL DMSO (Concentração: 5µM/mL)

Purification and partial characterization of proteinase inhibitors from equine seminal plasma

Vasconcelos, A.B. Oliveira, J.S.², Santos, A.M.C.², Lagares, M.A.¹, Santoro, M.M.².

¹Clinical and Surgery Veterinary Department of Veterinary Scholl of University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, MG, Brazil.

²Departament of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, MG, Brazil.

Abstract

Study of the seminal plasma proteinase inhibitors can help discover various changes in protein functions and protein-protein interactions, which can modulate sperm function, such as hyperactivation and acrosome reaction. Proteinase inhibitors are present in various glands, tissues, and secretions of the male reproductive tract. Some of these inhibitors bind to the acrosomal region of the sperm, and their release during *in vitro* or *in utero* incubation suggests that they may play a role in fertilization process.

The aims of the study were to isolate and identify equine seminal plasma proteinase inhibitors, to evaluate their inhibitory potential, and to test a correlation between protein concentration in seminal plasma supernatant (obtained after precipitation with 36% ammonium sulfate) and stallion sexual maturity. Seminal plasma proteins obtained from six stallions were chromatographed in a Superose 12 (FPLC system) column followed by C₁₈ HPLC reverse-phase. Inhibition of trypsin amidasic activity was evaluated in the collected fractions and active proteins were founded with an average molecular mass of 6.3-7.0 kDa identified by mass spectrometry. The older stallions showed a tendency the reduction in total seminal plasma protein concentration, but had similar concentrations of proteinase inhibitor in seminal plasma supernatant (p>0.05). Different proteinase inhibitor isoforms were found in semen of all stallions which suggests that the isoforms may be used as biomarkers of individual animals.

Key words: Serine-proteinase inhibitor, seminal plasma, stallion.

1.Introduction

Spermatozoa acquire the ability to fertilize an egg during a complex, sequentially-ordered process known as post-testicular sperm maturation [1]. Some proteins that are present in the seminal fluids could act as inhibitors or activators of processes related to the fertilization [2]. The inhibitors of serine proteases are important natural tools to regulate the physiological activity of the proteinase as well as to signal interactions with receptors [3]. Inhibitors of serine proteases were discovered and characterized in the seminal plasma of bulls [4], mice [5] and guinea-pig [6]. The study of inhibitors of serine protease in these seminal plasma can help to understand the physiological changes that occur during the reproduction as well as in the protein-protein interactions in the fertilization process. The subsequent phenomena can modulate functions in the spermatozoon such as training hyperactivation and acrosome reaction [3,7,8]. Inhibitors of serine protease act as a decapacitation factor [9] that could prevent the penetration of the spermatozoon "in vitro" in the zona pellucida of oocyte of mammals [10,11,12]. Considering that this inhibitors acta in the acrosomal membrane of the spermatozoon, it is suggested that these inhibitors can act in the fertilization process [5].

The aim of the study was to isolate and to partial characterize proteinase inhibitors from equine seminal plasma to evaluate their possible inhibitory potential. IA correlation between total protein concentration in seminal plasma (obtained after precipitation with 36% ammonium sulfate) and serine protease inhibition degree was also performed and stallion sexual maturity.

2.Materials and Methods

Animals. Ejaculates of six stallions (5, 8, 14 and 20 years old) were collected using an artificial vagina (model "Hannover"). Semen samples were evaluated for progressive motility with a bright field microscopy (100×). Ejaculates containing a minimum of 50% of spermatozoa with progressive motility were used in the study. All samples were cooled down to 5°C with a cooling rate of 1°C min⁻¹ since such a rate does not induce a cold-shock effect [13,14].

Protein purification. To obtain isolated seminal plasma proteins, semen was centrifuged for 30 min at 4°C (600g). Then, the supernatant was brought to 36% (wt/vol) saturation with ammonium sulfate adjusted to pH 2.0 with 6 mol L⁻¹ HCl, stirred for 30 min, and allowed to stand at 0°C for 30 min [4]. The samples were centrifuged again (600×g, 4°C, 30 min), the supernatant and the ammonium sulfate pellet were dialyzed for 24h up to a 8,000 dilution factor with 0.5% (by volume) aqueous acetic acid solution using exclusion membrane of 1,000 Da cut-off, and finally freeze-dried.

Trypsin inhibitors were further purified (the supernatant) by gel filtration chromatography using a Superose 12 HR 10/30 column equilibrated with 25 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4 at room temperature in a fast performance liquid chromatography (FPLC-system), using a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ and a collected fraction volume of 1.5 mL. The mobile phase was the same solution used for equilibration.

The fractions containing trypsin inhibitory activity were then applied to a reversed-phase C₁₈ column Shim-pack CLC-ODS and subjected to a high performance liquid chromatography (RP-HPLC), the proteins were detected by absorbance at 280nm. Mobile phase A was a aqueous solution of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and mobile phase B was 80% aqueous acetonitrile solution containing 0.1% TFA, the loaded sample volume was 50µL and the collected sample volume was 500 µL. Percentage of solvent B varied from 0 to 80% during 50min at a 1.0 mL.min⁻¹ flow rate.

Protein determination. The total protein in the crude extract and in the fractions enriched with serine protease inhibitor were determined according to the Bradford method in triplicate [15].

Mass spectrometry. The average molecular mass of the protein was determined by electro spray mass spectrometry (Q-TOF Micro®, Micromass, UK) in positive ion mode. Mass spectrometer calibrations were performed by using sodium iodide with cesium iodide in the 100-3000 *m/z* range. The protein was solubilised (at final concentration up to 20-50µmol.L⁻¹) in 100 µL of 50% aqueous acetonitrile containing 0.1% TFA and applied to the mass spectrometer by a syringe pump system at a flow rate of 10 µL.min⁻¹. The capillary voltages was 2 kV and the cone voltages was 15 V. The spectrum obtained was the result from twenty combined scans (2.0s). Original data (*m/z*) were treated (base line subtraction, smoothing and centering) and transformed into a mass (Da) spectrum. Data were analysed by the Masslynx® 4.0 software.

Proteinase inhibitory activity. Trypsin activity was used to evaluate proteinase inhibitory activity of the partially-purified extracts. The trypsin activity was assayed spectrophotometrically (UV-visible recording spectrophotometer Shimadzu-160A) at 410 nm by using the synthetic substrate N- α -alpha-benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide (BAPNA) in 25 mmol.L⁻¹ Tris-buffer, pH 7.4. Each 1 mL assay contained 3 µg mL⁻¹ trypsin, 55 mmol.L⁻¹ DL-BAPNA, and various amounts of buffered supernatant protein fractions solutions were prepared at 4 µg mL⁻¹. This assay was performed at 37°C [1,9].

Statistical analysis. The statistics of entire work were calculated using the software Origin® version 7.0 (Originlab – Scientific Graphing and Analysis Software). The statistical analysis T test was used to compare the trypsin inhibition percentages.

3. Results

Relation between total protein concentration and stallion age. After the preparation of seminal plasma proteins, the Bradford [15] assay was used to determine the total protein concentration (Table 1). Results suggest that there is an inverse relation between stallion age and total protein concentration (Fig.1).

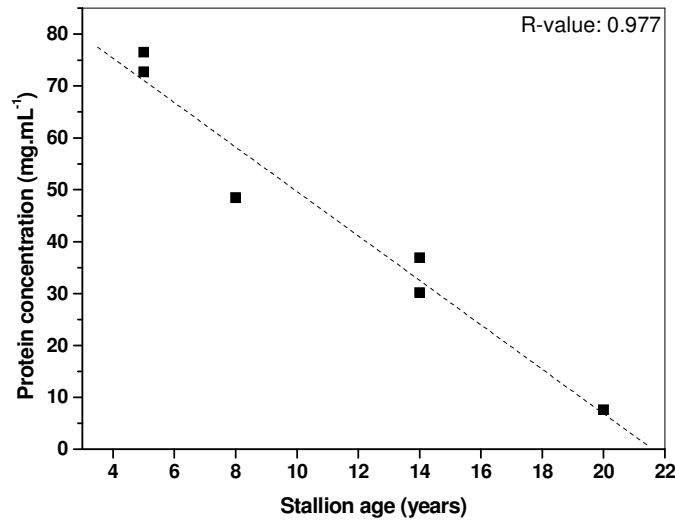


Figure 1. Fitting of experimental points of protein concentration in seminal plasma supernatant versus stallion age; Linear regression shows an R value of the 0.978; $p < 0.001$.

Table 1. Total protein and Inhibitor concentration of six animals

Animal	Age (years)	[Prot] ^{±SD} (mg.mL ⁻¹)	Inhibitor concentration (mg.mL ⁻¹)
1	14	30.2 ^{±0.15} a	0.27 ^{±0.01} a
2	5	76.5 ^{±0.21} b	0.25 ^{±0.01} a
3	20	7.6 ^{±0.38} d	0.40 ^{±0.05} a
4	5	80.0 ^{±0.79} b	0.20 ^{±0.06} a
5	14	36.5 ^{±0.05} a	0.30 ^{±0.03} a
6	8	29.3 ^{±0.26} c	0.26 ^{±0.02} a

[Prot] = Total protein concentration. The inhibitor concentrations, combined fractions No. 8 and 9 after gel filtration, are statistically similar in all animals ($p < 0.05$).

Purification of protease inhibitors. After inhibition activity determination of the plasma seminal sample (supernatant and the reconstituted ammonium sulfate pellet), it was observed that the unique sample that had inhibitory activity was the supernatant. Seminal plasma supernatant proteins were submitted into gel filtration (Superose12) chromatography in FPLC-system. Fifteen fractions were collected and analyzed. Four main peaks with satisfactory separation were found (Fig.2).

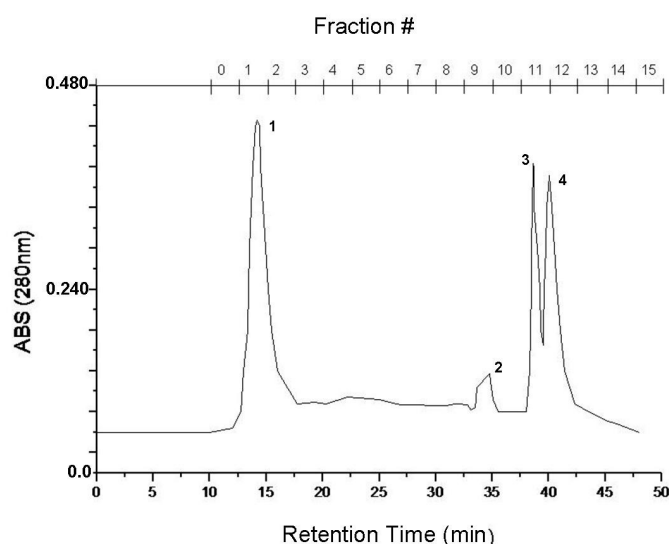


Figure. 2. Fast performance liquid chromatography (FPLC) of stallion seminal plasma proteins using a Superose 12 gel filtration column. Absorbance at 280 nm is presented as a line and the peaks represent proteins in different retention time. The chromatogram is representative for all the studied animals.

The same procedure was performed for all six animals and a great similarity was observed among their chromatograms, and this can be observed in Table 2.

Table 2. Comparison of the retention time values among the main four peaks of gel filtration chromatography, of samples from six stallions.

Animal	Retention Time (min)			
	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
1	14.7	34.8	38.7	40.7
2	15.1	34.5	38.9	40.9
3	15.2	35.0	39.0	40.0
4	14.9	35.7	39.7	40.7
5	14.6	35.1	39.6	40.6
6	14.9	34.9	39.1	40.1

The protease inhibitor activity was found in fractions 7, 8 and 9 from the gel filtration column with inhibition in range of the 80-97% (Fig.3). These results were observed in all the studied animals. Protein concentration in the combined fractions 8 and 9 the mean trypsin inhibitor concentration were similar in each animal ($p>0.05$).

Reverse phase chromatography of proteinase inhibitors. The fractions containing trypsin inhibitors (fractions 8 and 9) were combined and applied to a reverse phase C₁₈ column in order to obtain proteins with high purity. Four main protein fractions were obtained in all stallions

samples (Fig. 4). The inhibition potential of all the fractions was evaluated and only fractions that present inhibitory activity higher than 50% were further analyzed by the percentage of peak area and inhibitory activity (Table 3).

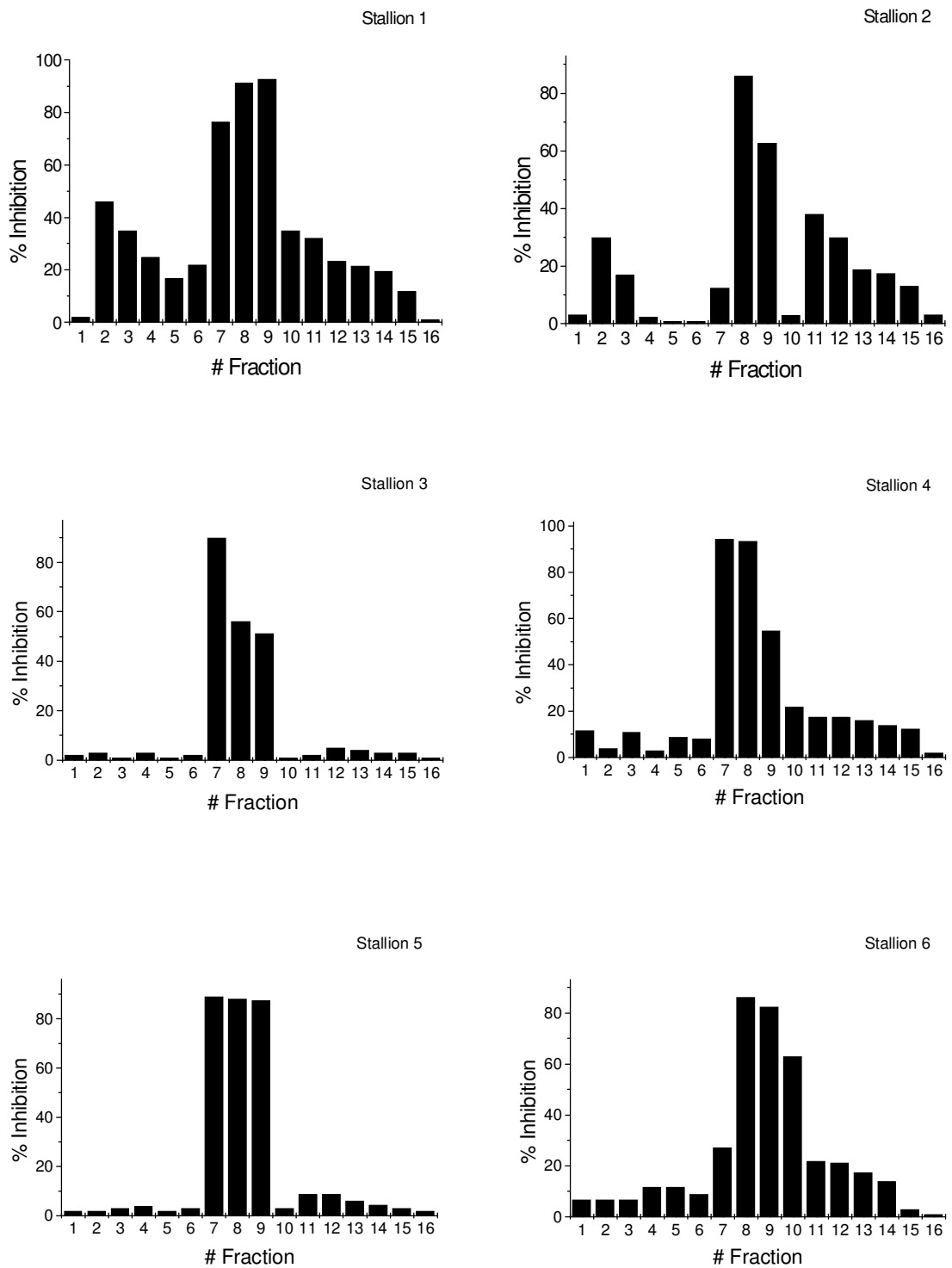
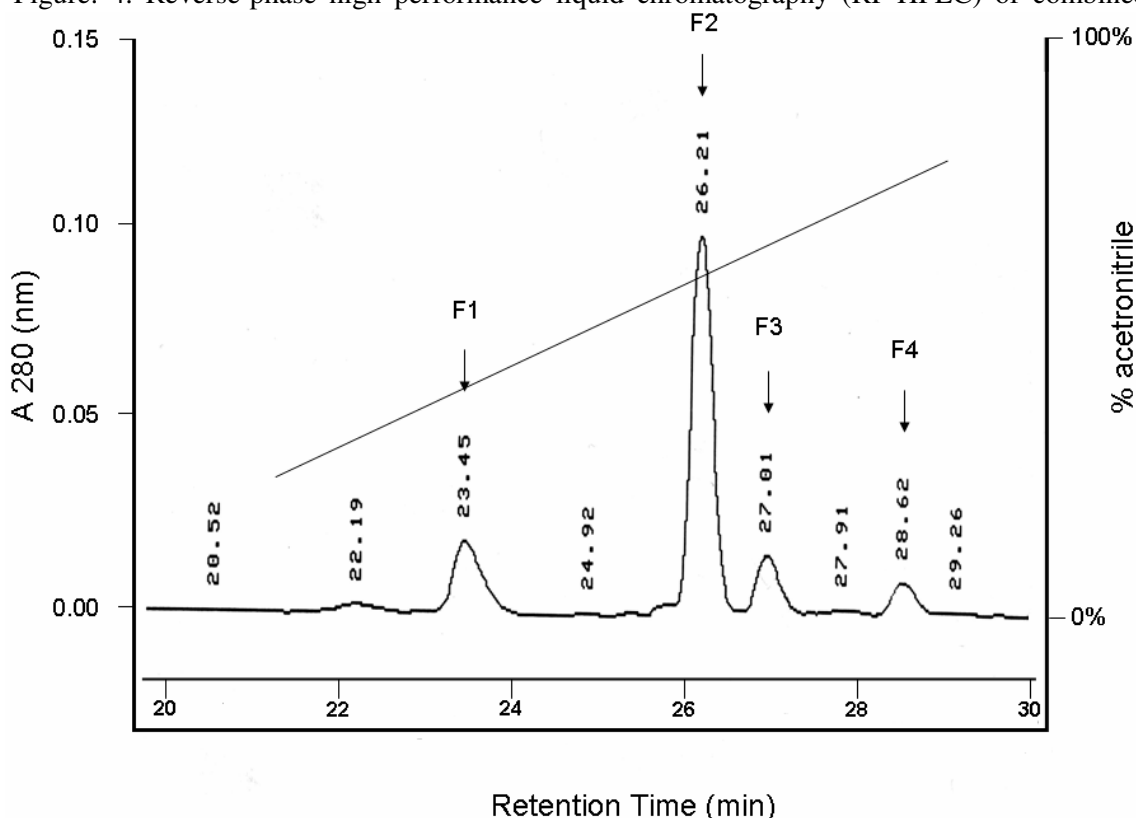


Figure 3. Percentage of inhibition of the fifteen fractions, after chromatography of molecular exclusion of the seminal plasma proteins from six stallions. The inhibition potential was found in fractions 7, 8 and 9 in most of the animals. The last column is the corresponding control.

Figure. 4. Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) of combined



fractions 8 and 9 obtained after gel filtration (see: fig. 2); this profile is representative for all animals. Elution was carried out with a linear gradient of 0-80% acetonitrile/0.1%TFA for 50 minutes. The F1 fraction was the only one that has more than 50% inhibitory activity (see Table 3).

Table 3. Characterization of F1 protein fractions obtained by RP-HPLC chromatography.

Animal	Retention time (min)	Inhibition (%)	Peak area (%)	Inhibition/Peak area
1	24.12	97	25.3	3.83
2	23.45	97	17.5	5.54
3	24.08	96	24.4	3.93
4	24.09	95	25.6	3.71
5	24.06	98	24.2	4.04
6	24.07	98	23.9	4.10

Mass spectrometry results. The ESI-MS spectra showed two distinct distribution patterns of ion peaks. The presence of one or two trypsin inhibitors in the F1 fraction of the seminal plasma is shown in Table 4. Each stallion contained inhibitors of different molecular masses in the seminal plasma.

Table. 4. Molecular mass of trypsin inhibitors of the F1 fraction detected by mass spectrometry (ESI-MS) in individual stallions.

Stallion	Molecular mass (Da)	
1	6925.14 ± 0.02	-----
2	6772.65 ± 0.14	7227.48 ± 0.38
3	6732.42 ± 0.01	7030.19 ± 0.50
4	6372.75 ± 0.03	7226.93 ± 0.55
5	6372.71 ± 0.05	7029.42 ± 0.39
6	6372.26 ± 0.55	-----

The F1 fraction obtained after RP-HPLC is the only fraction with more than 50% of inhibitory activity.

4. Discussion

In the present study, the results suggest a negative correlation between total semen protein concentration and stallion age. According to Strzezek et al. [16], there are qualitative changes in protein profiles of boar seminal plasma during the animal aging and quantitative changes in response to variation of physiological processes maturation. In 4.5 year-old stallions, some biochemical components of the seminal plasma such as glycerylphosphorylcholine, ergothioneine and total protein are significantly lower than those of mature stallions [3,17].

Investigations by Fillenberge et al. [18] in horse seminal plasma, using precipitation also reported the presence of a complex displaying proteinase inhibitory properties (800 kDa). The proteinase inhibitor was also identified in seminal plasma of boars [19], bulls [4].

The present study, using seminal plasma fractionation by gel filtration chromatography followed by reverse-phase separation and mass spectrometry identification, proteinase inhibitors could be identified by assay with bovine trypsin showed was. It was observed that these proteinase inhibitors are low-molecular weight proteins (6.3-7.0 kDa) in contradistinction to the high-molecular weight complex found in previous studies. Another important observation is that the low-molecular weight inhibitor is glycosylated, which is in accordance to previously described studies [23]. In conclusion, the present study shows that different inhibitor types can be found in horse seminal plasma, which can be related to physiology or biochemical parameters such as modification of proteolytic activity in the animal [20]. The own epididimal sperm maturation could involve changes in proteins domains, mainly due to modifications in protein structure [21]. Some of these modifications result from very specific proteolytic processing leading to the disappearance or formation of the new proteins. Thus, this suggests that some physiological regulation occurs, governing the transcription process and the expression of one or other inhibitor species. Nevertheless, the inhibitor type does not interfere in the overall trypsin-like specific activity that is kept over 95% in all the samples. The inhibition percentage of serine protease does not correlate to the total protein concentration, suggesting that this is not related to the processes of sexual maturation. Thus, this suggests the possibility of using proteinase inhibitors with other function as biomarkers of stallion semen [22]. Therefore, the total protein concentration may be related to the sexual maturation, but new studies have to be accomplished.

5. Conclusion

The chromatography of molecular exclusion and the chromatography in reverse phase came as excellent technique for the purification of the inhibitor of the equine seminal plasma, not causing any structural and functional damage to the inhibitor. In the present work it is possible to verify that that same inhibitor doesn't present direct relationship with the sexual maturity of

the equine ones. However it is possible to verify for mass spectrometry that there is different isoform of this inhibitor in the seminal plasma of the studied animals, suggesting changes in the isoform with the age of the animal.

References

- [1]R. Yanagimachi, (1988). Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction, pp135-185. Eds Knobil, E and Neil, JD, Raven Press, New York.
- [2]T. Mann, Journal of Reproduction and Fertility. 23 (1975) 47-52.
- [3]E. Töpfer-Petersen, M. Ekhlasi-Hundrieser, C. Kirchhoff, T. Leeb, H. Sieme, Animal Reproduction Science. 89 (2005) 159-170.
- [4]R. V. Lewis, J. S. Agustin, W. Kruggel, H. A. Lardy, Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 82 (1985) 6490-6491.
- [5]M. L. Lai, S. W. Chen, Y. H. Chen, Archives of Biochemistry and Biophysics. 290 (1991) 265-271.
- [6]E. D. Winnica, M. L. Novella, A. Dematteis, E. C. Coronel, Biology of Reproduction. 63 (2000) 42-48.
- [7]J. M. Bedford, Biology of Reproduction. 2 (1970) 128-158.
- [8]S. D. Perreault, B. R. Zirkin, B. J. Rogers, Biology of Reproduction. 26 (1982) 343-351.
- [9]H. Boettger-Tong, B. Aarons, T. Biegler, G. R. Poirier, Biology of Reproduction. 47 (1992) 716-722.
- [10]W. Bode and R. Huber, European Journal of Biochemistry. 204 (1992) 433-451.
- [11]L. R. Fraser, Journal of Reproduction and Fertility. 65 (1982) 185-194.
- [12]S. Jansen, R. Jones, I. Jenneckens, B. Marschall, B. Kreigesmann, J. Coadwell, B. Brenig, Molecular Reproduction and Development. 51 (1998) 184-192.
- [13]J. P. Kayser, R. P. Amann, R. K. Shideler, E. L. Squires, D. J. Jasko, B. W. Pickett, Theriogenology. 38 (1992) 601-614.
- [14]A. I Moore, E. L. Squires, J. E. Bruemmer, J. K. Graham, Journal of Equine Veterinary Science. 26 (2006) 215-218.
- [15]M. Bradford, Analytical Biochemistry. 72 (1976) 248-254.
- [16]J. Strzezek, P. Wysocki, W. Kordan, M. Kuklinska, M. Mogielnicka, D. Soliwoda, L. Fraser, Reproductive Biology. 5 (2005) 279-290.
- [17]K. Kosiniak and A. Bittmar, Polskie Archiwum Weterynaryjne. 27 (1987) 5-21.
- [18]R. V. Fillenberge, H. R. Zweifel, G. Gruenig, A. Pellegrini, Biological Chemistry Hoppe-Seyler. 366 (1985) 705-712.
- [19]P. Jelínková, P. Manásková, M. Tichá, V. Jonáková, International Journal of Biological Macromolecules. 32 (2003) 99-107.
- [20]L. D. Hachey and P. Chaurand, Journal of Reproductive Immunology. 63 (2004) 61-73.
- [21]B.M. Phelps, D.E. Koppel, P.Primakoff, D.G. Myles, Journal Cell Biology. 111 (1990) 1839-1847.
- [22]L. Fraser, P. Wysocki, A. Ciereszko, G. Plucienniczak, M. Kotłowska, W. Kordan, M. Wojtczak, G. Dietrich, J. Strzezek, Reproductive Biology. 6 (2006) 5-20.
- [23]J. S. Mills, M. Needham, T. C. Thompson, M. G. Parker, Mol.Cell.Endocrinol. 53 (1987) 111-118.