

Conteúdo de Peptídeos e Avaliação Morfofisiológica dos Espermatozóides do Epidídimo e Ejaculado de Bovinos¹

Antonio Emidio D. Feliciano Silva², André Lima Dias³, Maria Marina Unanian²,
Alfredo Ribeiro de Freitas⁴, Carlos Bloch Junior⁵

RESUMO - Objetivou-se com este estudo a identificação de alguns fatores protéicos envolvidos na qualidade funcional dos espermatozóides epididimais (SPZEP) e ejaculados (SPZEJ) de bovinos. Foram avaliadas as características morfofisiológicas e analisado o conteúdo peptídico destas estruturas de 11 animais mestiços Nelore, de 24 a 30 meses de idade. As avaliações morfofisiológicas foram motilidade progressiva (MOT, %), vigor, patologias espermáticas, integridade acrossômica e da cromatina. Foi observado que, os SPZEJ, na média, apresentaram MOT maior do que os SPZEP, 72,3 e 46,4%, respectivamente. Considerando as patologias espermáticas, taxas de defeitos maiores (DEFMAI), menores (DEFMEN) e totais (DEFTOT), houve diferença significativa entre as taxas dos DEFMEN e DEFTOT dos SPZEP e SPZEJ, sendo, em média, 91,1 e 8,5% e 95,4 e 11,8%, respectivamente. As taxas dos DEFMEN e DEFTOT dos SPZEP foram maiores em função da presença de espermatozóides com gotas citoplasmáticas distais. A análise das proteínas dos SPZEP e SPZEJ foi realizada por espectrometria de massa, método MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*), e revelou presença de peptídeos de massa molecular variando de 1,1 a 26,3 kDa nos SPZEJ e de 1,1 a 11,6 kDa nos SPZEP. Foram identificados peptídeos de 10,6 e 13,4 kDa somente nos SPZEJ e de 6,8 kDa somente nos SPZEP. Foi observada relação do peptídeo de massa molecular de 7,4 kDa dos SPZEP e de 4,7 kDa dos SPZEJ, com a MOT \geq 80%, destas estruturas. Os resultados sugerem o envolvimento destes peptídeos nos processos funcionais das células espermáticas do epidídimo e ejaculado. O estudo utilizou o método MALDI/TOF para espectrômetro de massa, para identificar peptídeos em espermatozóides do epidídimo de bovinos, pela primeira vez no País.

Palavras-chave: bovinos, espermatozóides do ejaculado, espermatozóides do epidídimo, método MALDI/TOF, peptídeos

Peptides Content and Morphophysiological Evaluation of Epididymis and Ejaculated Sperm in Bovine

ABSTRACT - The objective of the study was to identify some protein factors involved in bovine epididymis (SPZEP) and ejaculated (SPZEJ) sperm functional quality. With this propose, epididymis and ejaculated sperm of 11 Nelore crossbreed animals, 24 to 30 month of age, was evaluated for morphophysiological characteristics and analyzed for the peptides content. The morphophysiological characteristics consisted of progressive motility (MOT, %), velocity, sperm pathologies, and acrosome and chromatin integrity. These evaluations showed that the mean values of the SPZEJ were higher than of SPZEP, 72.3 and 46.4%, respectively. The considered sperm pathologies were the major, minor and total abnormalities. It was observed a significant difference between the means values of the minor and total abnormalities of epididymis and ejaculated sperm, 91.1 and 8.5% and 95.4 and 11.8%, respectively. These differences were caused by the presence of sperm with distal cytoplasmic droplets. The analysis of the protein of epididymis and ejaculated sperm was realized by mass spectrometer, MALDI-TOF method (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*). The method identified low molecular mass proteins, i.e. peptides. The analysis of SPZEJ showed peptides ranging from 1.1 to 26.3 kDa and SPZEP from 1.1 to 11.6 kDa. Some peptides, such as 10.6 and 13.4 kDa, were found only in ejaculated sperm, and the other, such as 6.8 kDa, only in epididymis. A relationship was observed between the 7.4 kDa SPZEP and 4.7 kDa SPZEJ peptides and sperm with \geq 80% motility. These last results suggested the participation of these peptides in the functional processes of spermatid cells. This study used for the first time in this country the MALDI/TOF mass spectrometer method to identify peptides in bovine epididymal sperm.

Key Words: bovine, ejaculated sperm, epididymal sperm, MALDI/TOF, peptides

¹ Parte da dissertação de Mestrado do segundo autor.

² Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia e FMVZ-UNESP-Botucatu. E.mail: emidiofd@yahoo.com; mmunanian@yahoo.com.br

³ Aluno de Mestrado - FMVZ/UNESP/Botucatu - Bolsista FAPESP.

⁴ Embrapa - Pecuária do Sudeste/São Carlos-SP. E.mail: ribeiro@cnpq.br

⁵ Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília-DF. E.mail: cbloch@cenargen.embrapa.br

Introdução

O reprodutor bovino como parte imprescindível à cadeia de produção animal deve apresentar eficiente potencial de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, capacidade de fecundação. Em particular, o potencial reprodutivo *in vitro* é cada vez mais utilizado para garantir a rápida transmissão de características produtivas desejáveis. Nesse sentido, tem-se procurado, por intermédio das técnicas de reprodução assistida, testar e utilizar todas as estruturas celulares espermáticas que possam apresentar capacidade fecundante como: as células primordiais oriundas dos túbulos seminíferos (Martins et al., 2000), os espermatozoides epididimais (Kikuchi et al., 1998) e ejaculados. Entretanto, para o sucesso destas técnicas, é imprescindível que se conheçam os fatores e mecanismos envolvidos na sua capacidade fecundante, desde a formação até saída através do ejaculado.

A capacidade de fecundação dos espermatozoides está em função de alguns dos aspectos funcionais mais importantes, como a motilidade progressiva, capacitação, reação acrossômica e habilidade de ligação e penetração no ovócito com desenvolvimento embrionário (Jones, 1998). Os espermatozoides para realizarem a missão de fecundar o ovócito, devem ser morfológica e funcionalmente normais, características originadas no testículo (espermatogênese) (Nishimune & Okabe, 1993) e complementadas na passagem pelo epidídimo (maturação).

Imprescindível à espermatogênese é a presença e expressão de várias proteínas específicas para cada uma das suas fases de formação celular. Dentre estas proteínas, de extrema importância são as histonas, que, na fase final da espermatogênese, são substituídas por protaminas cujo papel é reorganizar o DNA, constituindo-se uma estrutura altamente condensada, a cromatina (Ward et al., 1999). Neste processo, desempenha papel importante o grupo de proteínas de transição (TP, *transition nuclear proteins*) (Yu et al., 1999). No início da meiose e pós-meiose (Eddy, 1999), foi observado que as proteínas HSP70 (*heat-shock proteins*), HSP70-2 e HSC70T são responsáveis pela proteção contra o estresse térmico, esclarecendo, entre outros fatores, os eventuais aparecimentos de patologias espermáticas em animais criados em climas tropicais.

Ainda, foi demonstrado que os compostos protéicos secretados nos dutos eferentes são imprescindíveis à capacidade de fecundar. Dentre estes,

fazem parte a fertilina (Myles & Primakoff, 1997), pró-acrosina e b1,4-galactosiltransferase (Miller & Shur, 1994), as proteínas sp56 (Cheng et al., 1994) e p95 (Kalab et al., 1994), além de PLPCd (*prostasome-like particles cauda epididymis*) descritos por Frenette et al. (2002) em bovinos e as proteases e inibidores de proteases (Métayer et al., 2002).

O espermatozoide, liberado pelos túbulos seminíferos, ao alcançar o epidídimo ainda não possui a habilidade de se movimentar (Barker & Amann, 1971). Esta habilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides são adquiridas no epidídimo durante o processo de maturação, que envolve mudanças no nível de membrana espermática, principalmente, do seu conteúdo protéico (Yanagimachi, 1994). Nesta fase, inicia a atividade das proteínas necessárias ao estabelecimento da motilidade espermática (Brandt et al., 1978), como as do complexo PP1/I2/GSK-3 (fosfatase protéica 1/inibidor 2/ *glycogen synthase kinase - 3*, de 34, 37 e 39 kDa) (Vijayaraghavan et al., 1996), a proteína do grupo da tirosina de 55 kDa (Vijayaraghavan et al., 2000), ambas de ação ativadora-inibidora da motilidade espermática epididimal de bovinos e a TPP (tirosina fosforilada) envolvida na motilidade da cauda (Yeung et al., 1999).

Ao saírem do epidídimo, os espermatozoides recebem as secreções das glândulas anexas, o plasma seminal, constituídas de aminoácidos, íons e proteínas, que os habilitam para a capacitação, ligação a zona pelúcida e reação acrossômica (Maxwell & Johnson, 2000). Vários compostos protéicos do plasma seminal estimulam o metabolismo dos espermatozoides ejaculados, sendo alguns envolvidos na motilidade e função de proteção (redução de peróxidos) dos espermatozoides, como as proteínas SFP (proteínas do fluido ácido seminal) e LDH-C4 (desidrogenase láctica C4) (Schoneck et al., 1996), e o TNF a (fator de necrose tumoral a) presente no sêmen com motilidade acima de 50 % (Liebermann et al., 1999). Um grupo de proteínas considerado fundamental à fecundação é constituído das proteínas GAGs (proteoglicanos e glicosaminoglicanos) envolvidas na capacitação (Rodríguez-Martinez et al., 1998), e as de afinidade à heparina (HPB) que se ligam à membrana plasmática do espermatozoide, sendo imprescindíveis à reação acrossômica (Bellin et al., 1998).

As proteínas que induzem a motilidade progressiva fazem parte do grupo FMP (proteínas da motilidade progressiva), constituído-se de quatro a cinco proteínas

agregadas entre si, de baixa massa molecular (37,5 kDa), e cuja atuação, juntamente com cAMP, íons de Ca^{2+} e pH, desencadeia a atividade flagelar (Vijayaraghavan et al., 1996). No entanto, várias proteínas do plasma seminal têm papel inibidor da motilidade como as SMIF (fatores de inibição de motilidade do sêmen). Estas proteínas diminuem a velocidade dos espermatozóides pela inibição da dineína intertubular do flagelo, sem, no entanto, afetar a linearidade (Iwamoto & Gagnon, 1988; Iwamoto et al., 1992).

Embora as proteínas contidas no plasma seminal exerçam papel importante na funcionalidade dos espermatozóides, existe a hipótese de que o plasma não seja totalmente essencial à fertilização, ou até mesmo danifica os espermatozóides (Al-Somai et al., 1994). Esta hipótese é sustentada pelos estudos que mostraram ser possível fecundar os ovócitos com espermatozóides epididimais e mesmo células espermáticas primordiais (Kikuchi et al., 1998; Martins et al., 2000).

Em função da crescente demanda pelas técnicas de reprodução assistida e da importância dos fatores protéicos envolvidos na funcionalidade reprodutiva, foi proposto este estudo, com o objetivo de identificar alguns destes fatores, principalmente, peptídeos, por constituírem a maioria dos compostos protéicos tanto dos espermatozóides do epidídimo quanto do ejaculado (Arora & Jain, 1994; Al-Somai et al., 1994), apontados como possuindo função inibidora da motilidade (De Lamirade et al., 1984; Shivaji, 1988; Strzezek et al., 1992). Foi proposto, ainda, observar a sua possível relação com os parâmetros indicadores de normalidade dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado e avaliar a qualidade espermática entre estes espermatozóides.

Material e Métodos

Foram utilizados 11 animais púberes, de 24 a 30 meses de idade, selecionados de um lote de 30 machos mestiços Nelore, por meio de exames morfofisiológicos realizados antes do início do experimento. Os animais cuja motilidade progressiva e vigor foram abaixo de 50% e três, respectivamente, foram descartados (Silva et al., 1993).

Os animais foram submetidos às medições da circunferência escrotal (CE), largura (LARG) e do comprimento (COMP) dos testículos. A partir da LARG e COMP foi calculado o volume (VOL)

segundo Unanian et al (2000). Em seguida, foram colhidos os ejaculados por meio de eletroejaculador e realizadas as avaliações morfofisiológicas, além do armazenamento de espermatozóides (SPZ) do ejaculado (SPZEJ) a $-20^{\circ}C$ para posterior análises de proteínas. O armazenamento dos SPZEJ a $-20^{\circ}C$ seguiu o protocolo para análise de proteínas por espectrometria de massa, descrito adiante (Fenselau, 1997; Bloch Júnior et al., 2001).

A colheita dos espermatozóides do epidídimo (SPZEP) foi realizada no mesmo dia, após a orquiectomia bilateral e separação dos epidídimos, em cuja cauda foram realizadas incisões e retirados os espermatozóides. Após as avaliações morfofisiológicas, o material foi armazenado, a $-20^{\circ}C$, para posteriores análises de proteínas, seguindo o mesmo protocolo utilizado para os SPZEJ.

As avaliações morfofisiológicas dos espermatozóides SPZEP e ejaculado SPZEJ constaram de: motilidade (MOT), avaliada de 0 a 100%, vigor, na escala de 0 a 5, e patologias espermáticas. A avaliação das patologias espermáticas foi realizada em lâmina úmida pela contagem de 100 células, utilizando-se microscópio de contraste de fase. Foram considerados os defeitos maiores, menores e totais (Silva et al., 1993), avaliados tanto nos SPZ do epidídimo quanto no ejaculado, sendo DEFMAIEP e DEFMAIEJ os maiores, DEFMENEP e DEFMENEJ os menores e DEFTOTEP e DEFTOTEJ os totais, respectivamente.

O teste de integridade acrossômica e da cromatina também fez parte da avaliação morfofisiológica.

A integridade acrossômica foi avaliada tanto nos espermatozóides do epidídimo (ACROEP) quanto do ejaculado (ACROEJ). Para tal, uma amostra de 20 mL foi colocada em tubo *eppendorf* de 1,5 mL, adicionados 20 mL de *tripan-blue* 0,4% e incubada em banho-maria a $37^{\circ}C$ por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água destilada e centrifugada a 700 g por 5 minutos. Após retirada do sobrenadante, a amostra foi ressuspensa em 0,5 mL de água destilada e realizados três esfregaços/amostra. Estes, após secos, foram fixados em solução de metanol e colocados no corante Giemsa a 10%, onde permaneceram 18 a 20 horas. A integridade acrossômica foi avaliada por meio da contagem de 100 espermatozóides, utilizando-se microscópio com contraste de fase (DIC) e objetiva de imersão (Silva, 1998).

A integridade da cromatina dos espermatozóides do epidídimo (CREP) e ejaculado (CREJ) foi deter-

minada em esfregaços corados com o corante metacromático *acridine orange*. Os SPZ foram lavados por centrifugação a 700 g por 10 minutos. Do *pelet* foram feitos três esfregaços/amostra que foram fixados em uma solução de metanol e ácido acético (3:1) durante a noite. Em seguida, os esfregaços foram corados com solução de *acridine orange* durante cinco minutos e avaliada a integridade acrossômica pela contagem de 200 células/lâmina em microscópio com fluorescência. Os SPZ normais apresentaram coloração verde e aqueles com a cromatina danificada, coloração alaranjada (Unanian, 2000).

A análise de proteínas das amostras de espermatozoides do ejaculado e epidídimo foi realizada por espectrometria de massa, método MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight*) (Fenselau, 1997). As amostras submetidas ao método MALDI-TOF foram apenas congeladas a -20°C . A presença de quaisquer substâncias estranhas às amostras (proteínas, carboidratos ou sais) pode interferir, distorcendo a leitura (Fenselau, 1997).

Para a análise das amostras de SPZEP e SPZEJ pelo método MALDI-TOF, procedeu-se à extração das proteínas por meio de ácido trifluoroacético (TFA) a 25% e solução de acetonitrila em 0,1% de TFA. Após esse procedimento, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 7000 g por 30 minutos à temperatura ambiente; o sobrenadante foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido, e liofilizado; este foi ressuscitado e misturado à matriz (5 mg de ácido fíruico diluindo em 200 μl de acetona grau HPLC (height performance liquid chromatography) na proporção de 3 μl de água MilliQ, 1 μl de amostra e 4 μl de matriz. Em seguida, esta preparação foi aplicada à placa do espectrômetro de massa, método MALDI - TOF (Bloch Jr. et al., 2001).

O método MALDI-TOF utiliza impulsos de laser - nitrogênio emitidos em 337 nm, criando íons através da excitação das moléculas deste. A pressão da câmara de ionização do aparelho foi mantida entre 9×10^{-8} e 2×10^{-7} Torr. Os íons que se formaram foram acelerados até atingirem uma energia cinética de 25 KeV. Os íons positivos foram detectados num modo linear após serem atingidas as condições de extração. Os picos dos componentes moleculares protéicos (massa molecular) foram identificados em função da intensidade (%) de resposta à ionização das moléculas de proteína das amostras, sendo considerados aqueles cujas intensidades foram superiores a 50%. Dessa forma, a leitura destas amostras identificou

proteínas em uma escala de 1 a 30 kDa, portanto, proteínas de baixa massa molecular, ou seja peptídeos. A leitura destes peptídeos foi realizada por meio de gráficos (Bloch Jr. et al., 2001).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (*One-Way Analysis of Variance*) utilizando-se o programa ORIGIN (Microcal ORIGIN, 1996-1999). Para efeito de análise foram considerados os parâmetros espermáticos: motilidade, vigor, integridade do acrossoma e cromatina, e defeitos maiores, menores e totais dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado.

Para visualizar as características associadas à distribuição dos dados da resposta de cada parâmetro espermático com relação aos peptídeos, definidos pela massa molecular, foram utilizados diagramas de caixa (*Box-Plot*) por meio do módulo INSIGHT do SAS (SAS, 2000).

Os diagramas de caixa foram utilizados por serem efetivos para explorar e analisar a estrutura dos resultados de maneira rápida, e comparar as distribuições de dados contínuos. Estes revelam, ainda, características importantes, como a dispersão dos dados em torno da média, existência de heterogeneidade de variâncias, presença de outliers, entre outras (Cleveland, 1994; Digby & Kempton, 1996). No *Box-Plot*, a linha horizontal no meio da caixa representa a mediana; a parte inferior e superior da caixa indicam, respectivamente, o primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) quartil, correspondendo aos elementos de posição 25^o e 75^o da amostra. As caixas estreitas (*whisker*) acima e abaixo da caixa central, possuem distância não superior a 1,5 vezes à distância interquartílica (Q3 - Q1). Os valores mais extremos isolados e que recebem marcações individuais foram considerados dados discrepantes da amostra (*outliers*). Os diagramas consideraram somente os peptídeos que apareceram no mínimo em três amostras de SPZEP e SPZEJ. Dessa forma, foram diagramados 19 peptídeos nos SPZEP e 17 nos SPZEJ.

Resultados e Discussão

Os dados de comprimento, largura, volume e circunferência escrotal dos testículos variaram amplamente entre os animais do experimento. Os valores mínimos e máximos observados foram 25 a 35 cm para CE (média 27,8 cm), 9 a 12 cm para COMP (média 5,6 cm), 4,7 a 8 cm para LARG (média 10,8 cm) e 398 a 1004,8 cm^3 para o VOL (média 560,4 cm^3).

Na média, as mensurações testiculares acompanharam o padrão da raça Nelore na faixa etária de 24 a 36 meses (Silva, 1997). Apenas o VOL foi maior do que os descritos por Godfrey et al. (1990) de 428,6 cm³, aos 21 meses de idade, em animais da raça Brahman, e Unanian et al. (2000) de 239,3 cm³, aos 18 meses, em animais da raça Nelore, provavelmente, devido à idade; os animais do estudo foram mais velhos, isto é, 24 a 30 meses de idade.

A avaliação morfofisiológica da motilidade, vigor e patologia espermática apresentada na Tabela 1 revelou diferenças ($P < 0,05$) entre os SPZ do epidídimo e ejaculado, sendo estes resultados semelhantes aos observados por Howes et al. (2001).

Na média, os valores dos parâmetros MOT, Vigor, DEFMAI, DEFMEN e DEFTOT dos SPZEJ ficaram dentro do padrão de normalidade espermática da raça Nelore (Silva et al., 1993). A MOT dos SPZEJ variou de 50 a 90%, e dos SPZEP de 20 a 70%. A taxa de MOT dos SPZEJ foi maior ($P < 0,0007$) do que a dos SPZEP, diferença essa que poderia ser atribuída a vários fatores. Os espermatozóides adquirem movimentos e completam a maturação na cauda do epidídimo, fases em que ocorrem várias modificações químicas e estruturais. Este processo de formação e liberação dos SPZ, em bovinos, ocorre de forma cíclica (Barth & Oko, 1989), sendo possível que, nas colheitas realizadas neste experimento, foram obtidas populações de SPZ em vários estádios de maturação. Isto poderia explicar a baixa MOT dos SPZEP.

Os resultados da avaliação do vigor dos espermatozóides do ejaculado e epidídimo (Tabela 1) mostraram que, o vigor dos SPZEJ foi maior ($P < 0,0034$) do que o vigor dos SPZEP.

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a taxa de patologias espermáticas (DEFMAI) encontrada nos espermatozóides dos

epidídimos e ejaculados. Os SPZEP apresentaram, na média, taxas maiores ($P < 0,0001$) tanto de DEFMEN (91,1%) quanto DEFTOT (95,4%) (Tabela 1). A alta taxa de defeitos menores e totais encontradas nos SPZEP ocorreu devido a presença de grande número de espermatozóides com gota citoplasmática distal. Estas patologias aparecem em função do incompleto desenvolvimento funcional das células epiteliais do epidídimo e caracteriza os SPZs imaturos (Barth & Oko, 1989). O seu número deve se reduzir com a idade, ou seja, com a maturação (Silva et al., 1993). No entanto, os SPZEP mesmo apresentando gota citoplasmática distal possuem habilidade de fecundar como observado por Martins et al. (2000) em bovinos pertencentes a programa de recuperação, preservação e multiplicação de material genético de raças em perigo de extinção. O importante é que os SPZEP com gota citoplasmática distal tenham taxa de motilidade progressiva acima de 50%. Nestas condições, os SPZs poderiam ser utilizados na inseminação artificial e, principalmente, nas técnicas de reprodução assistida como a fecundação *in vitro* e injeção intracitoplasmática, tanto a fresco quanto pós-congelamento, uma vez que a manipulação de sêmen com SPZs apresentando gota distal ocasiona a liberação da mesma, como observado por Howes et al. (2001) e Martins (2001), em estudos realizados em bovinos.

As taxas de patologias espermáticas dos SPZEJ dos animais do estudo foram semelhantes às descritas por Silva et al. (1993) em animais da raça Nelore.

A avaliação (média e desvio-padrão) da integridade acrossômica ($47,4 \pm 15,6$ e $54,9 \pm 9,9$) e da cromatina ($98,0 \pm 2,4$ e $98,4 \pm 1,7$) dos SPZEP e SPZEJ, respectivamente, foi semelhante nos dois grupos, embora, aparentemente, a taxa da integridade acrossômica dos SPZEJ tenha sido maior. Este último resultado foi semelhante ao encontrado por Rath &

Tabela 1 - Médias \pm desvio-padrão da motilidade progressiva (MOT, %), vigor (Vigor, 0 a 5), taxa (%) dos defeitos maiores (DEFMAI), menores (DEFMEN) e totais (DEFTOT) dos espermatozóides do epidídimo (SPZEP) e ejaculado (SPZEJ), de animais mestiços Nelore

Table 1 - Means \pm standard deviation of epididymal and ejaculated sperm progressive motility (MOT) (%) and velocity (Vigor, 0 to 5), major (DEFMAI), minor (DEFMEN) and total defects rates (%) in crossbred Nelore

Espermatozóides <i>Sperm</i>	Parâmetros espermáticos <i>Sperm parameters</i>				
	MOT	Vigor	DEFMAI	DEFMEN	DEFTOT
SPZEP	43,6 \pm 15,0 ^a	2,0 \pm 0,6 ^a	4,3 \pm 2,8 ^a	91,1 \pm 6,5 ^a	95,4 \pm 8,4 ^a
SPZEJ	72,3 \pm 11,7 ^b	3,5 \pm 0,5 ^b	3,4 \pm 3,2 ^a	8,5 \pm 9,4 ^b	11,8 \pm 10,3 ^b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.
Means followed by different letters are different ($P < 0,05$) by Tukey test.

Niemann (1997) e Martins et al. (2000). Estes autores observaram que, os SPZEP mesmo apresentando taxas de integridade acrossômica menores, não comprometeram a fecundação, sendo esta mais alta do que utilizando SPZEJ. Segundo Rath & Niemann (1997), isto poderia ocorrer em função da ausência dos fatores de decapacitação presentes no plasma seminal e adquiridos pelos SPZs na ejaculação, como também sugerido por Bergeron et al. (2002). Estes últimos autores, além de Igotz et al. (2001), consideram que o plasma seminal poderia exercer efeito deletério à funcionalidade dos SPZ, após ocorrida a ejaculação. O efeito deletério, segundo Bergeron et al. (2002), manifesta-se de acordo com a susceptibilidade de cada animal, que por sua vez esta na dependência de fatores protéicos, que contribuem para a manutenção da integridade da membrana plasmática dos SPZs (Boilard et al., 2001).

A taxa acrossômica dos SPZEJ dos mestiços Nelore foi semelhante à descrita por Silva (1998) e Marques et al. (2000), em touros de várias raças.

Na avaliação da integridade da cromatina dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as médias das taxas encontradas nos SPZEP e SPZEJ, sendo ambas altas. As taxas de cromatina dos SPZEJ foram semelhantes às descritas por Unanian (2000), em bovinos da raça Nelore, que apresentaram motilidade progressiva acima de 60% e patologias espermáticas abaixo de 30%, portanto, dentro da normalidade espermática.

A massa molecular dos peptídeos identificada pelo método MALDI-TOF variou de 1,1 a 11,6 kDa nos SPZEP e 1,1 a 26,3 kDa nos SPZEJE, a melhor resolução dos picos protéicos ocorrendo acima de 4,8 kDa. Estes resultados, conforme relatado por Fenselau (1997), mostraram alta sensibilidade do método MALDI-TOF para leituras de massas moleculares muito baixas (menores de 14 kDa).

Os resultados obtidos no estudo com mestiços Nelore foram semelhantes aos descritos por Reyes-Moreno et al. (2002), que utilizaram SPZ's do epidídimo, e Arora & Jain (1994), SPZ's do ejaculado.

Nos SPZEP, foram encontrados 48 picos protéicos e no SPZEJ 44. Em todas as amostras de SPZEP, foram observados peptídeos de 6,8 e 10,3 kDa e em cerca de 50% das amostras, de 4,8, 5,5 e 7,4 kDa. Nos SPZEJ foram identificados, em todas as amostras, peptídeos de 5,4, 6,2 e 9,4 kDa e em mais de 50% das amostras, de 10,6 e 13,4 kDa.

Os peptídeos de 5,4 kDa apresentaram a mesma massa molecular do seminalplasmin, relatado por Shivaji (1988) no plasma seminal de ratos e humanos. Ainda, pela proximidade da massa, poderiam apresentar semelhança funcional aos peptídeos de 5,5 kDa e 5,7 kDa identificados no plasma seminal de bovinos (Unanian et al., 2001) e suínos (Strzezek et al., 1992). Algumas das amostras de SPZEP e SPZEJ apresentaram peptídeos de 6,4 kDa, semelhantes aos descritos por Aarons et al. (1991), e os peptídeos de 5 a 12 kDa identificados tanto nos SPZEP como SPZEJ foram, também, encontrados por Al-Somai et al. (1994) e Chao et al. (1996) no plasma seminal bovino.

Os peptídeos, 10,6 e 13,4 kDa, ocorreram somente nas amostras de SPZEJ, assim como o pico de 6,8 kDa somente nos SPZEP. Alguns dos peptídeos foram identificados somente nos EJ e outros somente nos EP, como o de massa molecular 26,3 kDa, encontrado nos SPZ do ejaculado de apenas um animal. Esta proteína pode fazer parte do composto protéico descrito por Killian et al. (1999), a prostaglandina D sintase, no plasma seminal de touros de alta fertilidade.

A quantidade dos peptídeos dos SPZEP foi maior que dos SPZEJ, embora o ejaculado, hipoteticamente, contenha maior quantidade de proteínas em função das secreções das glândulas anexas (Shivaji et al., 1990). Entretanto, convém lembrar que os SPZEP já possuem estrutura estável, ao serem liberados do epidídimo, e que na formação destas estruturas participam inúmeras proteínas (Howes et al., 2001). Assim, é provável que a quantidade de proteínas intrínsecas aos SPZEP pode ser maior que a dos SPZEJ, mesmo estes últimos agregando proteínas do plasma seminal (Cooper, 1990; Syntin et al., 1996).

Mesmo que a melhor resolução para identificação dos picos dos componentes protéicos tenha ocorrido acima de 4,8 kDa, convém mencionar os peptídeos de 1,1 a 4,5 kDa nos SPZEP e 1,1 a 4,7 kDa nos SPZEJ. Dentre estes, os de 2,7 kDa foram identificados tanto nos SPZEP (18%) quanto SPZEJ (73%). Isto sugere que estes peptídeos são secretados e absorvidos no epidídimo e nas glândulas acessórias, através do plasma seminal, uma vez que a taxa dos peptídeos de 2,7 kDa dos SPZEJ foi muito maior (73%). Além destes, os de massa molecular de 4,3 kDa ocorreram em todas as amostras dos SPZEJ, sendo os de 3,1, 3,5 e 4,5 kDa encontrados em 50% dos SPZEP. Estes peptídeos de massa molecular abaixo de 4,8 kDa, possivelmente, provêm da desa-

gregação de proteínas de alta massa, como sugerido por Al-Somai et al. (1994). Segundo estes autores, sob determinadas condições, como baixo pH, pode ocorrer a ruptura de estruturas protéicas o que leva ao aparecimento de vários peptídeos. Entretanto, para provar esta hipótese, é necessário isolar e seqüenciar estes compostos protéicos, fato que poderá esclarecer se possuem estrutura própria ou são pro-

duto de desagregação.

Para observar a eventual associação entre os peptídeos dos SPZEP e SPZEJ com os parâmetros espermáticos estudados, foram considerados 19 e 17 componentes protéicos, respectivamente, isto é, somente aqueles componentes que foram identificados no mínimo em três amostras. A resposta de cada parâmetro (média) em relação aos peptídeos dos

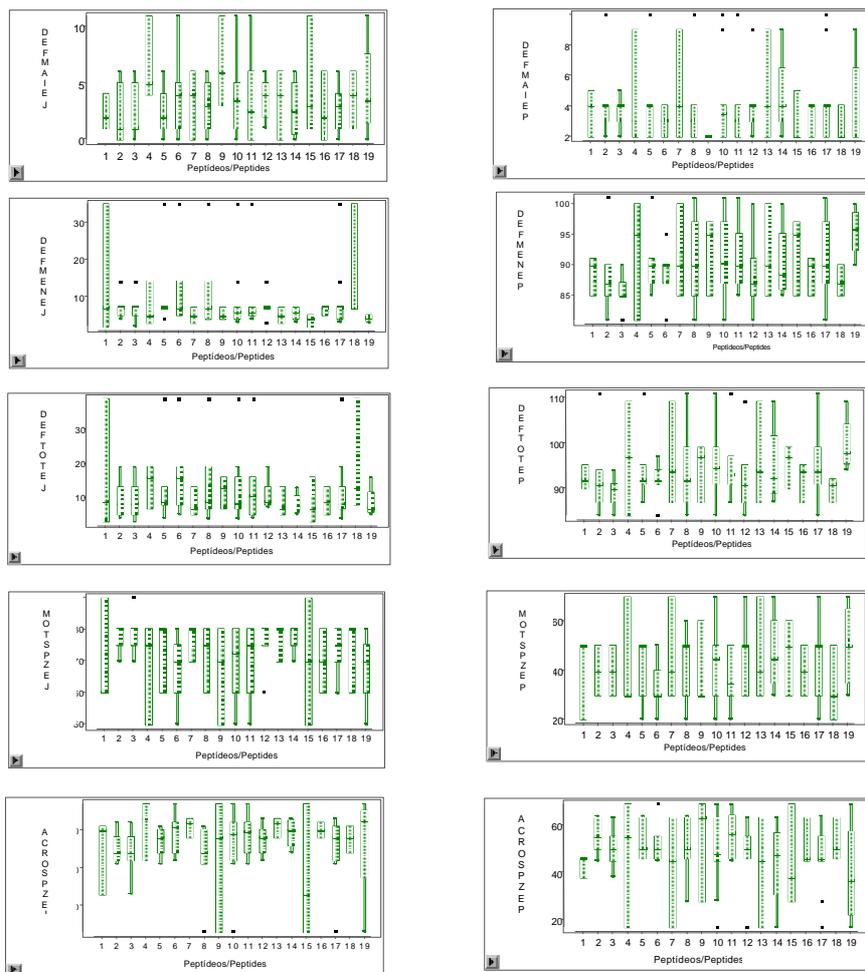


Figura 1 - Representação gráfica (*Box-Plot*) dos peptídeos (1 a 19) identificados nos espermatozóides do epidídimo (EP) em relação à motilidade progressiva, às patologias espermáticas e à integridade acrossômica de animais mestiços Nelore.

Figure 1 - *Box-Plots* representing the relationship between epididymal (EP) sperm peptides (1 to 19), progressive motility, sperm pathologies and acrosome integrity, in Nelore crossbred animals.

MOTSPZEP e MOTSPZEJ = motilidade progressiva dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado, respectivamente (*Epididymal and ejaculate sperm progressive motility, respectively*).

DEFMAIEP, DEFMAIEJ, DEFMENEP, DEFMENEJ, DEFTOTEP e DEFTOTEJ = Defeitos maiores (MAI), menores (MEN) e totais (TOT) dos espermatozóides do epidídimo (EP) e ejaculado (EJ), respectivamente (*Epididymal and ejaculate major, minor and total defects, respectively*).

ACROSPZEP e ACROSPZEJ = integridade acrossômica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado, respectivamente (*Epididymal and ejaculate sperm acrosome integrity, respectively*).

Peptídeos 1 a 19 = 2,6; 3,1; 3,4; 3,7; 4,5; 4,8; 5,4; 5,5; 5,6; 6,8; 6,9; 7,4; 7,6; 8,5; 8,6; 9,8; 10,3; 10,4; e 11,5 kDa.

Peptides 1 to 19 = 2.6, 3.1, 3.4, 3.7, 4.5, 4.8, 5.4, 5.5, 5.6, 6.8, 6.9, 7.4, 7.6, 8.5, 8.6, 9.8, 10.3, 10.4, and 11.5 kDa.

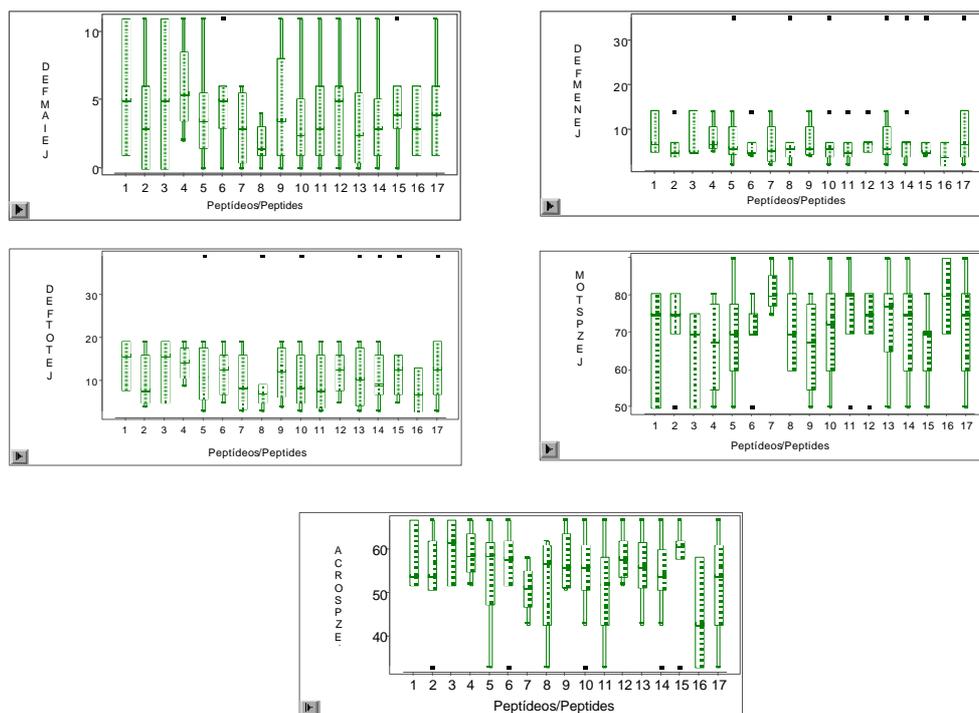


Figura 2 - Representação gráfica (*Box-Plot*) dos peptídeos (1 a 17) identificados nos espermatozóides do ejaculado (EJ) em relação à motilidade progressiva, às patologias espermáticas e à integridade acrossômica, de animais mestiços Nelore.

Figure 2 - *Box-Plots* representing the relationship between ejaculated (EJ) sperm peptides (1 to 17), progressive motility, sperm pathologies and acrosome integrity, in Nelore crossbred animals.

MOTSPZEJ = motilidade progressiva dos espermatozóides do ejaculado (*ejaculated sperm progressive motility*).

DEFMAIEJ, DEFMEJ, e DEFTOTEJ = Defeitos maiores (MAI), menores (MEN) e totais (TOT) dos espermatozóides de ejaculado (*Ejaculated sperm maior, minor and total defects*).

ACROSPZEJ = integridade acrossômica dos espermatozóides do ejaculado (*Ejaculated sperm acrosome integrity*).

Peptídeos = 1 a 17 = 2,5; 2,7; 2,9; 3,9; 4,3; 4,6; 4,7; 5; 5,1; 5,4; 5,5; 5,8; 6,2; 9,4; 10,6; 12,9; e 13,4 kDa.

Peptides = 1 to 17 = 2.5, 2.7, 2.9, 3.9, 4.3, 4.6, 4.7, 5, 5.1, 5.4, 5.5, 5.8, 6.2, 9.4, 10.6, 12.9, and 13.4 kDa.

SPZEP e SPZEJ pode ser visualizada nas Figuras 1 e 2.

Houve diferença na distribuição dos peptídeos, em função da MOT dos SPZ do ejaculado. A MOT dos SPZEP, no entanto, não mostrou estar influenciada pelos peptídeos encontrados nestes espermatozóides, de 2,6 a 11,5 kDa, pois os mesmos aparecem em todas as faixas de MOT, de 30 a 50%. Já a distribuição, pela média, destes peptídeos (2,6 a 11,5 kDa), em relação à MOT dos SPZ do ejaculado, mostrou que os de massa molecular de 3,1, 3,4, 5,4, 7,4, 7,6, 8,5 e 10,3 kDa situaram-se na faixa de 70 a 80% de MOT. Dentre estes, o de massa molecular 7,4 kDa apresentou maior evidência de relação às taxas de MOT altas, ou seja, 80%.

A distribuição dos peptídeos em relação às patologias espermáticas (defeitos maiores, menores e totais) foi semelhante à observada na MOT, ou seja,

a influência destes foi mais evidente sobre os SPZ do ejaculado. Porém assim mesmo, não houve evidência de que algum destes peptídeos (2,6 a 11,5 kDa) indicasse um determinado nível de defeitos, embora os de massa molecular de 3,1 a 10,3 kDa apareceram nas amostras de SPZ do ejaculado contendo níveis de DEFMEJ, em média, abaixo de 10% (Figura 1). Como a taxa de defeitos menores dos SPZ do epidídimo foi alta, isto sugere que os peptídeos identificados nos SPZ do epidídimo não interferem no aparecimento das patologias espermáticas próprias de SPZ's imaturos, no caso as gotas citoplasmáticas distais.

Foi observado que a maioria dos peptídeos identificados tanto nos SPZEP como SPZEJ se associou às taxas (médias) de integridade acrossômica acima de 50% (Figura 1).

Nenhuma observação referente à relação dos peptídeos identificados nos espermatozóides do epidídimo com os parâmetros espermáticos foi comparada à literatura, pois, na faixa de massa molecular de 2,6 a 11,5 kDa, nada foi, até o presente, relatado. Na maioria dos trabalhos, obtiveram-se compostos protéicos acima de 14 kDa, provavelmente, em função dos métodos utilizados, via de regra eletroforese uni ou bidimensional (Syntin et al., 1996). Este estudo, portanto, é pioneiro.

Referente aos defeitos, praticamente todos os peptídeos encontrados nos SPZ do ejaculado apresentaram associação com taxas (iguais ou abaixo de 20%) consideradas baixas e dentro da normalidade espermática (Silva et al., 1993). No entanto, convém observar a distribuição dos peptídeos em relação às taxas de DEFMEN, que foi a mesma da observada nos SPZEP. Como houve diminuição na taxa destes defeitos após a liberação dos SPZEP no ejaculado, seria possível que estes peptídeos tenham relação com as baixas taxa de DEFMEN, uma vez que a maioria ficou distribuída abaixo de 10%. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que, mesmo tendo estes peptídeos origem epididimária, se expressam no ejaculado. Segundo Gagnon & Sullivan (1999), os componentes que induzem a motilidade progressiva dos espermatozóides são proteínas "processadas, expressadas e liberadas pelas células epididimais".

O peptídeo de massa molecular de 10,6 kDa foi encontrado nas amostras de SPZEP com integridade acrossômica próxima a 60%. Esta relação entre o acrossôma e compostos protéicos foi, também, encontrada por Marques et al. (2000), embora a massa molecular identificada por estes autores foi de 15,7 kDa.

Conclusões

Os espermatozóides do epidídimo apresentaram taxas de motilidade progressiva menores e de defeitos menores e totais maiores que a dos espermatozóides do ejaculado. As diferenças foram significativas.

Alguns peptídeos foram identificados somente nos espermatozóides do epidídimo e alguns somente nos do ejaculado.

Pela comparação das médias dos parâmetros espermáticos estudados, houve indicação de possível associação entre estes e alguns dos peptídeos, tanto dos espermatozóides do epidídimo quanto ejaculado.

Os peptídeos identificados pelo método

MALDI/TOF para espectrometria de massa, nos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos, foram relatados pela primeira vez no país.

Literatura Citada

- AARONS, D.; BOETTGER-TONG, H.; HOLT, G. et al. Acrosome reaction induced by immunoadgregation of a proteinase inhibitor bound to the murine sperm head. **Molecular Reproduction and Development**, v.30, p.258-264, 1991.
- AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAN, P.C. et al. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**, v.39, p.328-336, 1994.
- ARORA, N.; JAIN, M.C. Molecular weights of proteins in bovine sperm fractions: a preliminary report. **Indian Veterinary Journal**, v.71, p.781-784, 1994.
- BARKER, L.O.S.; AMANN, R.P. Epididymal physiology. II. Immunofluorescent analyses of epithelial secretion and absorption and of bovine sperm maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.26, p.319-332, 1971.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BELLIN, M. E.; OYARSO, J. N.; HAWINKNS, H. E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2032-2039, 1998.
- BERGERON, A.; BLINDLE, Y.; MANJUNATH, P. A continuous contact of sperm with seminal plasma results in the increased binding of seminal phospholipid-binding proteins to sperm surface and an extensive modification of sperm membrane lipid composition. **Biology of Reproduction**, v.66, Supl. 1, p.167, 2002.
- BLOCH JR., C.; UNANIAN, M.M.; DIAS, A.L. Preparo de sêmen bovino para análise de proteínas pelo método MALDI-TOF/MS. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: 2001. p.142.
- BOILARD, M.; MORENO REYES, C.; SIRARD, M.A. et al. Binding of chaperonis to bovine spermatozoa by direct contact to apical plasma membrane of oviduct epithelial cells. **Biology of Reproduction**, v.64, Supl. 1, p.112, 2001.
- BRANDT, H.; ACOTT, T.S.; JOHNSON, D.B. et al. Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. **Biology of Reproduction**, v.19, p. 830-835, 1978.
- CHAO, C.F.; CHIOU, S.T.; JENG, H. et al. The porcine sperm motility inhibitor is identical to b-Microseminoprotein and is a competitive inhibitor of Na⁺, K⁺-ATPase. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v.218, p.623-628, 1996.
- CHENG, A.; LE, T.; PALACOIS, M.; BOOKBINDER, L.H. et al. Sperm-egg recognition in the mouse, characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. **Journal of Cell Biology**, v.125, p.867-878, 1994.
- CLEVELAND, W.S. **The elements of graphing data**. Murray Hill: AT&T Bell Laboratories, 1994. 297p.
- COOPER, T.G. Secretory proteins from the epididymis and their clinical relevance. **Andrology**, v.22, Supl. 1, p.155-165, 1990.
- De LAMIRADE, E.; BELLES-ISLES, M.; GAGNON, C. Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility.

- Annales of New York of Academy Science**, v.438, p.125-131, 1984.
- DIGBY, P.G.H.; KEMPTON, R.A. **Multivariate analysis of ecological communities**. London: Chapman & Hall, 1996. 206p.
- EDDY, M. Spermatogenesis and HSP70 chaperones. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.74, 1999.
- FENSELAU, C. MALDI-MS and strategies for protein analysis. **Analytical Chemistry News & Features**, p.661-665A, 1997.
- FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididimal cauda fluid are transferred to epididimal caput spermatozoa in bull. **Biology of Reproduction**, v.67, p.308-313, 2002.
- GAGNON, A.; SULLIVAN, R. Positive effects of the co-culture of sperm with epididimal cell monolayers on the motility of bovine sperm. **Theriogenology**, v.51, n.1, p. 343, 1999.
- GODFREY, R.W.; LUNSTRA, D.D.; JENKINS, T.G. et al. Effect of location and season on body and testicular growth in Brahman and Hereford bulls. **Journal Animal Science**, v.68, p.1520-1529, 1990.
- HOWES, E.A.; HURST, S.M.; JONES, R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. **Journal of Andrology**, v.22, n.1, p.62-72, 2001.
- IGNOTZ, G.G.; LO, M.C.; PEREZ, C.L. et al. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v.64, n.6, 1806-1811, 2001.
- IWAMOTO, T.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. **Journal of Andrology**, v.9, p.377-383, 1988.
- IWAMOTO, T.; TSANG, A.; LUTERMAN, M. et al. Purification and characterization of a boar motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.55-62, 1992.
- JONES, R. Spermiogenesis and sperm maturation in relation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F.; ENNE, G. et al. (Eds.) **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, 1998. p.205-218.
- KALAB, P.; VISCONTI, P.; LECLERC, P. et al. p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa in a hexokinase with unique properties. **Journal of Biology and Chemistry**, v.269, p.3810-3817, 1994.
- KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N. et al. Cryopreservation and ensuing "in vitro" fertilization ability of boar spermatozoa from epididymis stored at 4°C. **Theriogenology**, v.50, p.615-633, 1998.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; CANCEL, A.M. et al. Male factors affecting sperm fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.2, p.83-85, 1999.
- LIEBERMANN, J.; HAEGELE, F.; STECK, T. et al. TNF-Alpha increases the motility of sperm in normo-oligozoospermic men. **Biology of Reproduction**, v.60, suppl.1, p.134, 1999.
- MARQUES, A.L.; GOULART, L.R.; FELICIANO SILVA, A.E.D. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A₂ concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrosome reaction. **Genetical Molecular Biology**, v.23, n.4, p.825-829, 2000.
- MARTINS, C.F. **Avaliação do potencial de produção de embriões bovinos pela técnica de injeção intracitoplasmática de células espermáticas (intracitoplasmic sperm injection, ICSI)**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista 2001. 146p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 2001.
- MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; MATARAZZO, R. et al. Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididimal spermatozoa by analysis of motility, acrossomal status, penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin. **Biology of Reproduction**, v.62, Supl.1, p.156, 2000.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1273-1280, 2000.
- MÉTAYER, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and proteases inhibitors in epididimal fluid of domestic animals: matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1219-1229, 2002.
- MICROCAL ORIGIN. **Version 6.0**. Northampton, MA: Microcal Software, 1996-1999. 1 CD-ROM.
- MILLER, D.J.; SHUR, B.D. Molecular basis of fertilization in the mouse. **Seminar of Developmental Biology**, v.5, p.255-264, 1994.
- MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. Function of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. **Biology of Reproduction**, v.56, p.320-327, 1997.
- NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. **Development and Growth Differentiation**, v.34, p.479-486, 1993.
- RATH, D.; NIEMANN, H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididimal semen obtained from identical boars. **Theriogenology**, v.47, p.785-793, 1997.
- REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R. et al. Characterization and identification of epididimal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biology of Reproduction**, v.66, p.159-166, 2002.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERETOFT, H. et al. GAGs and spermatozoon competence in vivo and in vitro. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F.; ENNE, G. et al. (Eds.) **Gametes, development and function**. Roma: Serono Symposia, 1998. p.239-272.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS user's guide: statistics**. Versão 6.0, Cary, NC. 2000. 956p.
- SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced "in vitro" by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v.45, p.633-642, 1996.
- SHIVAJI, S. Seminalplasmin: a protein with many biological properties. **Bioscience and Reproduction**, v.8, p.609-618, 1988.
- SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990. 526p.
- SILVA, A.E.D.F. A identificação da puberdade, através do sêmen, em gado Nelore. In: SIMPÓSIO: O NELORE DO SÉCULO XXI, 4., 1997, Uberaba. **Anais...** Uberaba: 1997. p.51-58.
- SILVA, A.E.D.F. **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p. (Documentos, 35).
- SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.N.; UNANIAN, M.M. **Capa-**

- cidade reprodutiva do touro de corte:** funções, anormalidades e fatores que a influenciam. Campo Grande: CNPGC, 1993. 128p. (Documentos, 10)
- STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H. et al. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.35-52, 1992.
- SYNTIN, P.; DACHEUX, F.; DRUART, X. et al. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p.956-974, 1996.
- UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina:** método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Documentos, 56).
- UNANIAN, M.M.; BLOCH JR., C.; SILVA, A.E.D.F. Proteínas de baixa massa molecular do plasma seminal de bovino (*Bos indicus*) identificadas pelo método MALDI-TOF/MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p.456-458.
- UNANIAN, M.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C. et al. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.136-144, 2000.
- VIJAYARAGHAVAN, S.; MOHAN, J.; GRAY, H. et al. A role for phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α in bovine sperm motility regulation. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1647-1654, 2000.
- VIJAYARAGHAVAN, S.; STEPHENS, D.T.; TRAUTMAN, K. et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase Kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biology of Reproduction**, v.54, p.709-718, 1996.
- WARD, W.S.; McCARTHY, S.; KLAUS, A. et al. The function of higher order sperm chromatin structures. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.84, 1999.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds) **The physiology of the reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.
- YEUNG, C.H.; WEINBAUER, G.F.; COOPER, T.G. Responses of monkey epididymal sperm of different maturational status to secondary messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. **Biology of Reproduction**, v.60, suppl.1, p.206, 1999.
- YU, Y.E.; UNNI, E.; ZHANG, Y. et al. Spermatogenesis in mice lacking transition nuclear proteins in condensing spermatids. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.76, 1999.

Recebido em: 13/09/02

Aceito em: 28/04/03