

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Monografia de Conclusão de Curso

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA
SEMINAL DE PEIXES, AVES E MAMÍFEROS

Vinicius Farias Campos

Pelotas, março de 2007

VINICIUS FARIAS CAMPOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE
PEIXES, AVES E MAMÍFEROS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia.

Orientador: Tiago Collares, MSc.

Co-Orientador: Prof. João Carlos Deschamps, PhD.

Pelotas, 2007.

Banca examinadora:

Tiago Collares, MSc., Doutorando em Biotecnologia Agrícola, UFPel

Fabiana Kömmling Seixas, MSc., Doutorando em Biotecnologia Agrícola, UFPel

Prof. Marta Gonçalves Amaral, MSc., Doutorando em Biotecnologia Agrícola,
UFPel

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Noli e Clair
e ao meu irmão Jéferson.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas.

Ao meu orientador Tiago Collares, pela confiança em minha capacidade, pela sua preocupação, dedicação e acima de tudo pela grande amizade.

Ao meu co-orientador João Carlos Deschamps pela sua confiança em mim, pela sua dedicação, pelo exemplo de pesquisador e professor e pela sua amizade.

Aos meus pais Noli e Clair e ao meu irmão Jéferson pela força e incentivo nas horas mais difíceis, apesar da nossa grande distância e saudade.

Aos amigos e colegas de laboratório de Biotécnicas da Reprodução e do Grupo de Pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Paulo Varoni Cavalcanti, Marta Gonçalves Amaral, Cristian Kaefer, Evelise Sampaio da Silva, Alinca Peres da Fonseca, Thaís Farias Collares pela amizade, compreensão, auxílio nos momentos necessários, à colega e amiga Fabiana Kömmling Seixas pelo auxílio e amizade e aos demais colegas do Centro de Biotecnologia e do Curso de Ciências Biológicas pela convivência agradável.

Ao colega Ivan Bianchi pela parceria nos experimentos com suínos.

Ao professor Thomaz Lucia Jr. Pela colaboração na análise dos dados obtidos neste trabalho.

A todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

CAMPOS, Vinicius Farias. Universidade Federal de Pelotas. **Análise da expressão de proteínas do plasma seminal de peixes, aves e mamíferos.** 2007. 43f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Orientador: Tiago Collares.

In vivo, o plasma seminal é o mediador essencial para funções espermáticas desde a ejaculação até a fertilização, assim torna-se de fundamental importância para a fisiologia espermática, bem como para a sobrevivência e transporte dos espermatozoides no trato genital feminino. O fluido seminal é constituído por compostos orgânicos e inorgânicos, entre estes íons, aminoácidos livres, lipídeos, carboidratos e proteínas, as quais são o constituinte orgânico em maior abundância. Diversas proteínas exercem diferentes funções em diferentes estágios do processo de fertilização. Além de influenciar no equilíbrio osmótico e na inibição imunológica, algumas proteínas especialmente enzimas catalíticas, estão envolvidas no metabolismo espermático. Entretanto, os mecanismos moleculares de ação destes polipeptídeos ainda não foram elucidados, uma vez que poucas proteínas foram realmente identificadas e caracterizadas. O conhecimento ainda é menor em peixes e aves, onde poucas espécies têm sido estudadas e poucas proteínas caracterizadas e associadas a alguma função na fisiologia reprodutiva. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo analisar e avaliar a variação na expressão de proteínas do plasma seminal de três espécies de três classes taxonômicas distintas: peixes, aves e mamíferos. O jundiá (*Rhamdia quelen*) espécie nativa do sul do Brasil foi a espécie de peixe utilizada para este estudo, entre as aves o modelo eleito e utilizado foi o galo doméstico (*Gallus domesticus*) e entre os mamíferos os suínos foram utilizados como modelo. Para análise da variação da expressão das proteínas do plasma seminal destas espécies foram realizados três experimentos distintos para cada espécie. Nos peixes, foram comparadas quanto a expressão de proteínas, amostras de plasma seminal de animais de ambiente selvagem com amostras de plasma seminal de animais de ambiente de cultivo. Para as aves e para os mamíferos foram realizadas três coletas de sêmen com machos identificados, e posterior comparação da expressão de proteínas do plasma seminal. A técnica de eletroforese unidimensional em géis de poli(acrilamida) do tipo SDS-PAGE foi utilizada para a análise da expressão de proteínas. Para análise dos géis foi utilizado o software TotalLab TL 100 v. 2006 (Nonlinear Dynamics, UK). Foi observado que a intensidade da expressão dos polipeptídeos nos peixes de ambiente selvagem foi significativamente mais elevada ($p < 0,00001$). Os resultados obtidos dos experimentos com aves e mamíferos demonstraram um alto grau de variabilidade na expressão de proteínas durante as coletas de sêmen. Neste trabalho foi relatada pela primeira vez, em três espécies distintas, a variabilidade na expressão de proteínas do plasma seminal. Estes dados poderão contribuir para o melhor entendimento da função destas proteínas na fisiologia reprodutiva.

Palavras-chave: Plasma seminal, proteínas, expressão, peixes, aves, mamíferos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de jundiás selvagens	27
Figura 2 - SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de jundiás cultivados	28
Figura 3 - Imagem da densidade óptica das bandas protéicas do plasma seminal de jundiás selvagens.....	28
Figura 4 - SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de galos.....	30
Figura 5 - Imagem da densidade óptica das bandas protéicas do plasma seminal de jundiás selvagens.....	30
Figura 6 - SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de suínos.....	32
Figura 7 - Imagem da densidade óptica das bandas protéicas do plasma seminal de	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de frequência das bandas protéicas detectadas através de SDS-PAGE no plasma seminal de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	26
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

mg: miligrama

min: minuto

μl: microlitro

kDa: quilo Dalton

ml: mililitro

OD: densidade óptica

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

rpm: rotações por minuto

s: segundos

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 – Plasma seminal	12
1.2 – Proteínas do plasma seminal.....	13
1.2.1 – Proteínas envolvidas na capacitação do espermatozóide.....	13
1.2. 2 – Proteínas envolvidas na proteção dos espermatozóides	14
1.2.3 – Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação oócito-espermatozóide.....	14
1.2.4 – Proteínas potencialmente associadas com a interação e modulação de componentes da matriz extracelular (CME)	15
1.2.5 – Proteínas associadas com a motilidade espermática.....	15
1.3 – Proteínas do plasma seminal de peixes	16
1.4 – Proteínas do plasma seminal de aves	17
1.5 – Proteínas do plasma seminal de mamíferos.....	18
1.6 – Proteômica seminal	19
1.7 – Objetivos.....	21
1.7.1 Objetivos do experimento 1:.....	21
1.7.2 Objetivos do experimento 2:.....	21
1.7.3 Objetivos do experimento 3:.....	21
2 – MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Experimento 1 – análise da expressão de proteínas do plasma seminal de peixes.....	22
2.1.2 – A coleta de sêmen.....	22
2.1.3 – SDS-PAGE.....	22
2.1.4 – Análise estatística	23
2.2 Experimento 2: Avaliação da expressão de proteínas do plasma seminal de aves.....	23
2.2.1 – Coleta de sêmen	23
2.2.2 – SDS-PAGE.....	23
2.2.3 – Análise estatística	24
2.3 Experimento 3: Avaliação da expressão de proteínas do plasma seminal de mamíferos.....	24
2.3.1 Coleta de Sêmen.....	24

2.3.2 SDS-PAGE.....	25
2.3.3 Análise estatística	25
3 – RESULTADOS	26
3.1 Experimento 1.....	26
3.2 Experimento 2.....	29
3.3 Experimento 3.....	31
4 – DISCUSSÃO	33
5 – CONCLUSÃO.....	36
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Plasma seminal

Antes mesmo da ejaculação os espermatozóides necessitam de um meio por onde possam se locomover pelo órgão genital do macho. Este meio, é um fluido chamado plasma seminal, que junto com os espermatozóides constitui o sêmen. *In vivo*, o plasma seminal é o mediador essencial para funções espermáticas desde a ejaculação até a fertilização, neste sentido torna-se de fundamental importância para a fisiologia espermática, bem como para a sobrevivência e transporte dos espermatozóides no trato genital feminino (Pesch et al., 2006).

Existem muitas evidências que os constituintes do plasma seminal são fundamentais para o processo de reprodução, não apenas conduzindo os espermatozóides pelo trato genital feminino até a fecundação (Frazer & Bucci, 1996). Este fluido é composto de secreções dos túbulos seminíferos, epidídimo, ducto deferente, ampola, vesículas seminais, próstata e glândulas bulbo-uretrais (Little & Holyoak, 1992).

Já foi descrito que as funções do plasma seminal estão relacionadas com a fertilidade dos machos e com a ativação de espermatozóides imóveis (Elzanaty et al., 2002). O plasma seminal tem ação bactericida, neutraliza metabólitos espermáticos e nutre os espermatozóides na fêmea (Polakoski & Kopta, 1982). Tem sido demonstrado que este fluido serve para manter a motilidade dos espermatozóides em touros (Bass et al., 1983), e em ovinos (Graham, 1994); é responsável por aumentar a viabilidade espermática em carneiros (Maxwell et al., 1997), e aumentar a resistência de espermatozóides suínos ao dano do choque térmico (Jobim et al., 2004). Este líquido também pode influenciar a fertilidade em bovinos (Kilian et al., 1993; Bellin et al., 1996). Existem evidências que o plasma seminal previne contra a capacitação prematura dos espermatozóides (Eng & Oliphant, 1978) e também protege contra o dano peroxidativo em bovinos (Schöneck et al., 1996).

Em mamíferos o fluido coletado destas glândulas sexuais acessórias aumenta a capacidade de penetração no oócito por espermatozóides da cauda do epidídimo (Henault et al., 1995). Nesse sentido, estas evidências suportam a idéia

que secreções das glândulas sexuais acessórias, que compõem o plasma seminal, participam em eventos chave no tocante a funções espermáticas, fertilização e ao desenvolvimento embrionário no trato reprodutivo feminino.

O fluido seminal é constituído por compostos orgânicos e inorgânicos, entre estes íons, aminoácidos livres, lipídeos, carboidratos e proteínas, as quais são o constituinte orgânico em maior abundância (Pilch & Mann, 2006).

Estes compostos agem em diversos aspectos da biologia espermática, como na motilidade dos espermatozóides, influenciando, conseqüentemente na capacidade de fertilização do sêmen, mas os mecanismos de ação destes componentes ainda não são claros (Kordan et al., 1998). Entretanto, algumas proteínas têm sido identificadas associadas à motilidade espermática em suínos (Strzezek et al., 1992), aves (Mohan et al., 1995) e bovinos (Moura et al., 2006).

O evento da fertilização nos mamíferos inclui interações bioquímicas altamente reguladas, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozóides durante a ejaculação, interação de proteínas de membrana dos espermatozóides com células epiteliais do oviduto, capacitação espermática, reconhecimento dos gametas, ligação entre os gametas, reação acrossômica, penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão dos gametas (Jansen et al., 2001, Suarez et al., 2001, Strzezek et al., 2005).

1.2 – Proteínas do plasma seminal

No plasma seminal, diversas proteínas exercem diferentes funções em diferentes estágios do processo de fertilização. Além de influenciar no equilíbrio osmótico e na inibição imunológica, algumas proteínas especialmente enzimas catalíticas, estão envolvidas no metabolismo espermático (Shivaji et al., 1990). Outras proteínas desempenham importantes funções na motilidade espermática, na capacitação, na reação acrossômica e na fusão oócito-espermatozóide (Wassarman, 1999).

1.2.1 – Proteínas envolvidas na capacitação do espermatozóide

A capacitação é um dos eventos iniciais que ocorrem logo que os espermatozoides são misturados com as secreções das glândulas acessórias. O complexo de proteínas BSP (A1/A2, A3 e BSP 30 kDa) influenciam de modo significativo neste processo atuando no fluxo de colesterol na membrana do espermatozoide (Manjunath & Thérien, 2002). Por um mecanismo semelhante acredita-se que albumina também aja na capacitação (Visconti & Kopf, 1998).

1.2.2 – Proteínas envolvidas na proteção dos espermatozoides

A proteção dos gametas masculinos está direta ou indiretamente relacionada com proteínas presentes no plasma seminal, onde estas atuam em mecanismos de proteção da membrana plasmática, na prevenção do stress oxidativo e do ataque imunológico (Moura et al., 2006). A albumina absorve peróxidos de lipídeos, o que contribui como efeito protetor tanto para o espermatozoide quanto para a motilidade (Alvarez & Storey, 1995) e sabe-se que a proteína ácida do fluido seminal (aSFP) age inibindo o stress oxidativo (Schöneck et al., 1996). A clusterina é um constituinte multifuncional do plasma seminal e pode prevenir contra o dano oxidativo do espermatozoide (Reyes-Moreno et al., 2002), se ligar e aglutinar espermatozoides defeituosos (Ibrahim et al., 1999), e agir como uma chaperona, protegendo os gametas masculinos dos efeitos tóxicos da precipitação de proteínas. (Humphreys et al., 1999; Wilson & Easterbrook-Smith, 2000). Esta proteína ainda tem a capacidade de inibir a indução do complemento de lise do espermatozoide (Ibrahim et al., 1999), esta função também é realizada enzima 5'-nucleotidase (Takayama et al., 2000) presente no plasma seminal. A proteção do esperma do dano oxidativo, da aglutinação e da lise celular pode ser importante para os espermatozoides uma vez presentes no trato reprodutivo feminino.

1.2.3 – Proteínas envolvidas na reação acrossômica e interação oócito-espermatozoide.

Fosfolipase A₂ (PLA₂) tem um amplo espectro de funções, algumas delas relacionadas à reação acrossômica e a fusão das membranas dos gametas (Yuan et al., 2003). Entretanto, também existem evidências que a PLA₂ estimula células imunológicas (Granata et al., 2005) e realiza uma atividade antimicrobiana no plasma seminal (Bourgeon et al., 2004). A osteopontin é outra proteína multifuncional identificada no plasma seminal e descrita originalmente na matriz extracelular de tecidos ósseos (Senger et al., 1979). Em bovinos este polipéptido interage com a membrana dos espermatozóides ejaculados, afeta a ligação dos gametas masculino e feminino e influenciando também no início do desenvolvimento embrionário. A expressão de ambas PLA₂ e osteopontin é detectada em maior abundância em touros com alta capacidade de fertilização (Moura et al., 2006).

1.2.4 – Proteínas potencialmente associadas com a interação e modulação de componentes da matriz extracelular (CME)

A interação e remodelação da CME é alguns dos atributos das proteínas como a, clusterin, e provavelmente a catepsin L, encontradas no fluido seminal. Este grupo de proteínas possivelmente é fundamental no processo de fertilização, uma vez que, os espermatozóides interagem e atravessam barreiras estabelecidas como as células do cumulus, a zona pelúcida e a membrana do oócito. Em hamsters, as metaloproteinases (MMPs) liberadas pelos espermatozóides durante a reação acrossômica facilitam a fusão dos gametas (Díaz-Perez & Meizel, 1992). As catepsinas são peptidases que estão envolvidas na proteólise de componentes usualmente encontrados como parte do CME durante a invasão tecidual, o crescimento e remodelação (Dickinson, 2002).

1.2.5 – Proteínas associadas com a motilidade espermática

Enquanto muitas mudanças bioquímicas ocorrem com os gametas masculinos desde a ejaculação até a fertilização, os espermatozóides também precisam atravessar o trato reprodutivo feminino até chegarem ao oócito. Isto é

acompanhado por uma combinação de contrações do trato reprodutivo feminino com a motilidade espermática. Algumas proteínas do plasma seminal tem um potencial de influenciar na motilidade, incluindo as proteínas do plasma seminal bovino (BSP) A1/A2 (Sanchez-Luengo et al., 2004), aSFP (Schoneck et al., 1996) e a fosfolipase A2 (Bao et al., 2004). Interessantemente, a proteína aSFP do plasma seminal bovino demonstra 50% de homologia com a espermedesina Z13 (Tedeschi et al., 2000). Esta espermedesina tem uma relação inversa com a fertilidade (Moura et al., 2006), mas o mecanismo de ação desta proteína ainda não foi esclarecido. A 5'-nucleotidase (5 – NT) é outro componente que pode ser colocado neste grupo de proteínas, pois os anticorpos contra esta enzima estão associados com a redução da motilidade *in vitro* de espermatozóides humanos (Aumuller et al., 1997). Esta enzima causa hidrólise de nucleosídeos 5' – monofosfatados e isto tem sido demonstrado como parte dos espermatozóides (Takayama et al., 2000).

1.3 – Proteínas do plasma seminal de peixes

De acordo com Loir et al., (1990), o constituinte orgânico em maior abundância no fluido seminal de peixes teleósteos são as proteínas. As funções destas proteínas ainda não são bem compreendidas. Até o presente apenas alguns grupos de polipeptídeos podem ser distinguidos no líquido seminal de peixes como as lipoproteínas (Loir et al., 1990), as anti-proteinases (Ciereszko et al., 2000) entre outras proteínas ainda não bem descritas. Seis lipoproteínas foram identificadas no plasma seminal de trutas *Oncorhynchus mykiss*. Estas proteínas foram inicialmente identificadas como sendo lipoproteínas de alta densidade (HDL). A importância destas lipoproteínas pode ser associada a interação com a membrana plasmática dos espermatozóides para manter a composição lipídica ideal durante o armazenamento nos ductos espermáticos (Wojtczak et al., 2005). A atividade de anti-proteinases foi descrita no plasma seminal de muitas espécies de peixes teleósteos (Dabrowski & Ciereszko, 1994; Ciereszko et al., 1998, 2000). A principal função das anti-proteínas no plasma seminal de peixes está associada à proteção do espermatozóide do ataque proteolítico (Kowalski et al., 2003).

Dados recentes (Lahnsteiner et al., 2004) demonstram que algumas proteínas com peso molecular menor do que 50 kDa estão associadas com o prolongamento da viabilidade dos espermatozóides, onde estas proteínas

Em tilápias (*Oreochromis niloticus*) foi identificado uma glicoproteína com alto peso molecular (120 kDa) como fator imobilizante dos espermatozóides (Mochida et al., 1999; Mochida et al., 2002). Os procedimentos de criopreservação de gametas de peixes causam injúrias irreparáveis a estas células, tornando-as muitas vezes incapazes de desempenhar suas funções. O congelamento pode causar dano tanto em proteínas dos espermatozóides quanto nas proteínas presentes plasma seminal, tornando, muitas vezes, a célula incapaz ou com reduzida capacidade de fertilização (Zilli et al., 2005).

De forma interessante, parâmetros bioquímicos comuns a peixes e mamíferos providenciam evidências para o uso do sêmen de peixes como modelo para pesquisa biomédica (Coward et al., 2002). Em outro caminho, com os avanços nos estudos de proteômica do sêmen de peixes marcadores bioquímicos de congelabilidade dos espermatozóides podem ser descobertos, fornecendo subsídios para a formação de bancos de germoplasma de espécies em extinção.

1.4 – Proteínas do plasma seminal de aves

O principal modelo para o estudo de proteínas presentes no plasma seminal de aves tem sido o galo (*Galus domesticus*). Alguns estudos têm demonstrado que o plasma seminal destes animais possui enzimas inibidoras de proteinases similares às descritas em mamíferos, onde a função destas proteinases pode estar relacionada com a inativação da acrosina, liberada por espermatozóides mortos ou defeituosos (Lessley & Brown, 1978). Em perus (*Meleagris gallopavo*), enzimas proteolíticas também têm sido descritas (Kotlowska et al., 2005). Entre essas enzimas estão metaloproteases, proteinases de serina e inibidores de proteinases de serina. Entretanto, estas proteinases não estão relacionadas com a inativação da acrosina, sugerindo funções espécie-específicas, mesmo entre grupos filogeneticamente próximos como galos e perus (Kotlowska et al., 2005).

Steele & Wishart, (1996) descreveram um perfil eletroforético unidimensional do plasma seminal de galos, com aproximadamente 40 bandas protéicas com pesos moleculares entre 12 e 160 kDa. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o perfil eletroforético de proteínas associadas à superfície dos espermatozóides que foram retiradas pela lavagem salina é semelhante ao do plasma seminal, onde

algumas bandas protéicas com pesos moleculares de 72, 59, 46, 35 e 25 kDa são comuns aos dois perfis.

Em um outro estudo (Mohan et al., 1995), uma proteína com peso molecular aparente de 78 kDa, chamada de fator inibidor da motilidade espermática (SMIF) foi purificada do plasma seminal de galos. Esta proteína demonstrou um grande potencial de inibição da motilidade. Em eletroforese unidimensional este polipeptídeo apareceu apenas com uma única banda com ou sem o tratamento com β -mercaptoetanol, sugerindo que esta proteína consiste de apenas uma única cadeia polipeptídica, entretanto o tratamento com β -mercaptoetanol causou um aparente avanço na mobilidade relativa da banda no gel, sugerindo a presença de pontes dissulfídicas. Neste mesmo estudo, foi comparada a atividade da proteína purificada tratada com β -mercaptoetanol e sem o tratamento, onde foi demonstrado que o polipeptídeo tratado com β -mercaptoetanol apresentou reduzida atividade inibitória da motilidade, sugerindo que as pontes dissulfídicas podem ser essenciais para a atividade biológica deste inibidor. Contudo, poucos trabalhos têm descrito proteínas presentes no plasma seminal de aves, a qual é uma espécie de alto valor econômico e o avanço no conhecimento da fisiologia reprodutiva é essencial para o incremento na produção de aves domésticas. Por outro lado, da mesma forma como em peixes, a busca de marcadores bioquímicos de congelabilidade do sêmen no plasma seminal pode contribuir para a criação de bancos de germoplasma.

1.5 – Proteínas do plasma seminal de mamíferos

A grande parte dos estudos sobre proteínas do plasma seminal é relacionada com espécies de mamíferos domésticos como bovinos, suínos, ovinos e eqüinos, as quais são espécies com alto valor econômico e estudos sobre a fisiologia da reprodução são conduzidos há muitos anos. Em humanos, estudos envolvendo proteínas seminais e fatores clínicos de fertilidade e infertilidade e criopreservação de gametas é o principal alvo dos pesquisadores. Em todas estas espécies, técnicas avançadas de proteômica têm sido empregadas para a detecção de marcadores bioquímicos de fertilidade, de congelabilidade dos espermatozóides e para a detecção de fatores polipeptídicos associados a doenças como câncer de próstata em humanos (Pilch & Mann, 2006). O interesse

médico no conhecimento da composição do fluido seminal está relacionado com a infertilidade e o câncer de próstata. Condição clínica muito comum, a infertilidade masculina causa muitos custos sociais e emocionais na população. Como o fluido seminal tem efeito direto na sobrevivência dos espermatozóides e no sucesso da fertilização, este líquido pode estar diretamente relacionado com a infertilidade (Henault & Killian, 1996). Nesse sentido a ampla análise do proteoma seminal ser de grande interesse. O câncer de próstata é o segundo mais comum em homens nos EUA (Jemal et al., 2005). O plasma seminal pode conter biomarcadores para o câncer de próstata. Em adição, sendo produzido por diferentes glândulas acessórias sexuais é possível que este fluido seja um excelente local de busca sobre o desenvolvimento de cânceres testiculares (Pilch & Mann, 2006). Com a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies domésticas, alguns desses polipeptídeos vêm sendo utilizados como marcadores seletivos de fertilidade e de congelabilidade do sêmen (Killian et al., 1993; Roncoletta et al., 1999; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2006). Um estudo de Nauc e Manjunath (2000) demonstrou que proteínas do plasma seminal bovino (BSP) possuem a propriedade de ligação à superfície do espermatozóide, diminuindo sua quantidade após a criopreservação do sêmen, sugerindo alguma relação com a congelabilidade do sêmen. Entretanto, ainda é desconhecida a influência destas proteínas sobre o processo de criopreservação do sêmen. Roncoletta et al. (1999) demonstraram que a presença de um fator polipeptídico de 61,8 kDa no plasma seminal está associado com a alta congelabilidade do sêmen de touros da raça Gir. Estes avanços na proteômica seminal de mamíferos são de fundamental importância, tanto para a saúde humana, como para o incremento na produção das espécies domésticas e também para a preservação de espécies em extinção como mencionado acima no item 4. Além disso, funções das proteínas do plasma seminal de mamíferos já foram descritas acima no item 2.

1.6 – Proteômica seminal

A multifuncionalidade das proteínas do plasma seminal é facilitada pelas suas estruturas e pela ação de mecanismos moleculares (Strzezek et al., 2002). Estas proteínas são as novas ferramentas no controle dos mecanismos moleculares que acompanham o transporte do espermatozóide no trato reprodutivo

feminino, suprimindo a resposta imune feminina contra antígenos espermáticos e agindo na interação espermatozóide-oócito (Strzezek & Holody, 1996; Töpfer-Petersen et al., 2000). Entretanto, o desenvolvimento de técnicas de fertilização *in vitro* e a micromanipulação de embriões torna necessário o entendimento de várias questões relativas à função dos componentes do plasma seminal no processo de fertilização. Nesse sentido, técnicas apuradas de proteômica têm sido utilizadas para a identificação de polipetídeos expressos nos tecidos do sistema reprodutor masculino. Com o rápido conhecimento desenvolvido nos últimos anos, marcadores bioquímicos têm sido descritos para a detecção de algumas propriedades biológicas de qualidade seminal (Frazer et al., 2006). O uso destes marcadores bioquímicos poderá ajudar a desenvolver novos critérios para a predição e aumento da fertilidade masculina. Com isso a proteômica seminal torna-se essencial para identificação de propriedades e funções de proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação das funções do trato reprodutivo masculino (Strzezek et al., 2005). O método mais comum aplicado nas análises de proteomas é a eletroforese unidimensional do tipo SDS-PAGE, a qual, apesar da limitação de separar proteínas apenas pelo peso molecular é uma alternativa mais barata e que em estudos iniciais de proteomas pode contribuir de maneira significativa. Até agora, o método com melhor resolução na separação de proteínas é a eletroforese bidimensional (2D-PAGE), a qual é o alicerce da análise de proteomas. Entretanto, outros caminhos são necessários para um entendimento amplo dos mecanismos celulares envolvendo proteínas (Strzezek et al., 2005). Entre esses outros caminhos podemos citar métodos de purificação de proteínas como os diferentes tipos de cromatografias (afinidade, gel-filtração) e os modernos equipamentos de cromatografia líquida (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Outro moderno método, aplicado com de forma expressiva nos últimos anos é a espectrometria de massa, a qual é um método de determinação precisa de massas molares. O nível de precisão de espectrômetros de massa chega ao ponto da possibilidade de distinção de duas moléculas que diferem entre si apenas pela presença de um carbono-13 (^{13}C). A espectrometria de massa pode ser usada também para a determinação de modificações pós-traducionais, para o sequenciamento de proteínas e também para o mapeamento de interações moleculares (Cunha et al., 2006).

Deste modo, estas técnicas têm contribuído de maneira significativa na análise de proteomas seminais de diferentes espécies como em humanos (Pilch & Mann, 2006), em bovinos (Moura et al., 2006) e em peixes (Zilli et al., 2005).

1.7 – Objetivos

Com base no exposto acima, este trabalho tem por objetivo avaliar a expressão de proteínas do plasma seminal de peixes, aves e mamíferos em três experimentos diferentes, para identificar a variação que existe na expressão destes polipetídeos entre os indivíduos e entre os diferentes ejaculados.

1.7.1 Objetivos do experimento 1:

- Comparar a expressão de proteínas do plasma seminal do jundiá (*Rhamdia quelen*) de ambiente selvagem com a expressão de jundiás cultivado através da eletroforese unidimensional do tipo SDS-PAGE.

1.7.2 Objetivos do experimento 2:

- Avaliar a expressão de proteínas do plasma seminal de galos (*Gallus domesticus*) entre diferentes ejaculados dos mesmos animais para verificar a variação na expressão dos polipetídeos.

1.7.3 Objetivos do experimento 3:

- Avaliar a expressão de proteínas do plasma seminal de suínos (*Sus scrofa*) entre diferentes ejaculados dos mesmos animais para verificar a variação na expressão dos polipetídeos.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento 1 – análise da expressão de proteínas do plasma seminal de peixes

Neste experimento foram usados exemplares de jundiá (*Rhamdia quelen*). A expressão de proteínas foi comparada entre dois diferentes grupos, no primeiro grupo estavam os animais selvagens e no segundo grupo os animais cultivados. Foram realizadas comparações buscando descobrir se as mesmas proteínas estavam sendo expressas nos dois grupos ou se diferiam. Também foi comparada a intensidade da expressão das proteínas comuns entre dois grupos.

2.1.2 – A coleta de sêmen

Foram usados 13 machos da Estação de Piscicultura Barragem do Chasqueiro da Universidade Federal de Pelotas e 13 machos selvagens, capturados no Canal São Gonçalo em Pelotas, RS. As amostras de sêmen foram coletadas evitando o contato com as fezes, urina e qualquer substância que possa contaminar o fluido seminal, considerando que os espermatozóides de peixes são inativos após a coleta e se tornam ativos em contato com soluções hiposmóticas, deste modo, foi obtido de 4 a 6 mililitros de ejaculado. Foram separadas alíquotas de 1ml de cada amostra e centrifugadas (8000 x g, 10 min., 4°C) para a separação do fluido seminal.

2.1.3 – SDS-PAGE

O plasma seminal foi diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Cada amostra foi preparada para a corrida com 20 µl de plasma seminal e 10 µl de tampão de amostra (Glicerol; Tris-Hcl 0,6173M - pH 6,8; β-mercaptoetanol; SDS 10%; Azul de Bromofenol; água milli-Q). As amostras foram submetidas à fervura por 10 minutos. De acordo com Laemmili (1970), a eletroforese do tipo SDS-PAGE foi feita pelo método vertical com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell® (Bio-Rad Laboratories®, USA). Foram feitas corridas com géis concentrados a 15% com uma voltagem de 120 V por uma hora e quarenta e cinco minutos. Como padrão foi utilizado o marcador molecular BenchMark Protein Ladder™, (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Os géis foram corados a temperatura ambiente com Coomassie

Brilliant Blue. A análise dos géis foi realizada através do software TotalLab TL 100 v.2006 (Nonlinear Dynamics, UK).

2.1.4 – Análise estatística

Os dados obtidos da análise dos géis pelo software foram analisados e associados entre si, a fim de se obter as diferenças entre os dois grupos estudados, o grupo dos animais selvagens e o grupo dos animais cultivados. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistix® 8. Foram feitas distribuições de frequências das bandas protéicas e foi realizada uma Análise de variância de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. Foram considerados significativos valores $p < 0,01$.

2.2 Experimento 2: Avaliação da expressão de proteínas do plasma seminal de aves

Neste experimento foram utilizados 8 galos (*Gallus domesticus*) adultos saudáveis, identificados, submetidos a mesma alimentação e alojados em gaiolas individuais no Biotério Central da UFPel. Foram realizadas três coletas de sêmen durante uma semana, com intervalo de um dia entre cada coleta. Foi avaliada e comparada a expressão de proteínas de uma coleta para a outra de cada macho, buscando avaliar a variação na expressão que ocorre de uma coleta para a outra.

2.2.1 – Coleta de sêmen

A coleta de sêmen dos 8 machos foi realizada através do método da massagem abdominal, evitando o contato do sêmen com as fezes e a urina. Foi obtido cerca de 1 ml de sêmen de cada macho. O sêmen foi centrifugado (3000 x g, 10 minutos, 4°) para a separação do plasma seminal das células espermáticas.

2.2.2 – SDS-PAGE

O plasma seminal foi diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Cada amostra foi preparada para a corrida com 30 µl de plasma seminal e 10 µl de tampão de amostra (Glicerol; Tris-Hcl 0,6173M - pH 6,8; β-mercaptoetanol; SDS 10%; Azul de Bromofenol; água milli-Q). As amostras foram submetidas à fervura

por 10 minutos. De acordo com Laemmili (1970), a eletroforese do tipo SDS-PAGE foi feita pelo método vertical com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell® (Bio-Rad Laboratories®, USA). Foram feitas corridas com géis concentrados a 15% com uma voltagem de 120 V por uma hora e quarenta e cinco minutos. Como padrão foi utilizado o marcador molecular BenchMark Protein Ladder™, (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Os géis foram corados a temperatura ambiente com Coomassie Brilliant Blue. A análise dos géis foi realizada através do software TotalLab TL 100 v.2006 (Nonlinear Dynamics, UK).

2.2.3 – Análise estatística

Foi realizada uma distribuição de frequência das bandas protéicas detectadas de acordo com o macho coletado e com a coleta de sêmen. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistix® 8.

2.3 Experimento 3: Avaliação da expressão de proteínas do plasma seminal de mamíferos

Neste experimento foram utilizados 6 machos suínos (*Sus scrofa*) adultos saudáveis, identificados, mantidos sob as mesmas condições de alimentação e alojamento. O objetivo deste experimento foi idem ao descrito para as aves, onde os machos foram coletados três vezes durante uma semana, com intervalo de um dia entre as coletas, foi avaliada e comparada a expressão de proteínas de uma coleta para a outra de cada macho, buscando avaliar a variação na expressão que ocorre de uma coleta para a outra.

2.3.1 Coleta de Sêmen

As coletas foram realizadas através do método da mão-enluvada (Bearden; Fuquay, 1997), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel.

2.3.2 SDS-PAGE

Uma alíquota de sêmen fresco foi centrifugada (2000 x g, 10 min., 4°C) logo após a coleta. O plasma seminal foi congelado e mantido em nitrogênio líquido. Para a análise as amostras foram descongeladas e recentrifugadas (3000 x g, 10 min., 4°C), para eliminar possível contaminação com espermatozóides. O plasma seminal foi diluído três vezes em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Cada amostra foi preparada para a corrida com 50 µl de plasma seminal e 25 µl de tampão de amostra (Glicerol; Tris-HCl 0,6173M - pH 6,8; B-mercaptoetanol; SDS 10%; azul-de-bromofenol; H₂O), após foram submetidas à fervura por 10 minutos para desnaturação protéica. A eletroforese unidimensional SDS-PAGE (Laemmili, 1970) foi realizada com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell® (Bio-Rad Laboratories, USA). Foram usados géis concentrados a 15%. As amostras foram concentradas a 50 V por 20 min., e a corrida a 100 V por aproximadamente 2 h. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™ (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Os géis foram corados a temperatura ambiente com Coomassie Brilliant Blue em over-night. Os géis foram analisados com o software TotalLab TL 100 v. 2006 (Nonlinear Dynamics, UK).

2.3.3 Análise estatística

Foi realizada uma distribuição de freqüência das bandas protéicas detectadas de acordo com o macho coletado e com a coleta de sêmen. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistix® 8.

3 – RESULTADOS

3.1 Experimento 1

Num total, foram detectadas 14 bandas protéicas (Tabela 1) no perfil eletroforético unidimensional das proteínas do plasma seminal de *Rhamdia quelen*, com peso molecular entre 217.1 e 7.1 kDa.

Bandas	Peso Molecular (kDa) Média ± DP	Frequência de Bandas em 13 amostras/ grupo 1 (%)	Frequência de Bandas em 13 amostras/ grupo 2 (%)
1	217.1 ± 3.31	8 (1)	70 (9)
2	147.5 ± 2.18	84 (11)	84 (11)
3	97.3 ± 3.64	23 (3)	70 (9)
4	81.5 ± 2.61	100 (13)	100 (13)
5	60.4 ± 1.60	100 (13)	100 (13)
6	52.1 ± 0.36	84 (11)	100 (13)
7	45.3 ± 0.86	100 (13)	93 (12)
8	38.3 ± 0.46	70 (9)	53 (7)
9	33.6 ± 0.47	100 (13)	76 (10)
10	25.5 ± 0.20	100 (13)	100 (13)
11	21.8 ± 0.43	93 (12)	47 (6)
12	16.3 ± 0.61	53 (7)	47 (6)
13	14.2 ± 0.93	47 (6)	53 (7)
14	7.1 ± 0.59	47 (6)	15 (2)

Tabela 1 - Distribuição de frequência das bandas protéicas detectadas através de SDS-PAGE, no plasma seminal de jundiá (*Rhamdia quelen*).

Nenhum dos ejaculados continha todas as 14 bandas. Apenas um macho do grupo dos animais selvagens (grupo 1) apresentou 13 bandas no seu perfil protéico e outros 2 apresentaram 12 bandas. Cinco animais do grupo 2 (cultivados) apresentaram 12 bandas polipeptídicas. No grupo 1 cinco bandas foram detectadas em todas as amostras (4, 5, 7, 9, 10 – tabela 1). No grupo 2 foram detectadas quatro bandas conservadas em todas as amostras (4, 5, 6, 10 – tabela 1).

A análise relativa à distribuição de frequência das bandas entre os dois grupos não demonstrou resultados significativos, entretanto diferenças significantes estão associadas à concentração de proteínas em cada banda analisada através da densidade óptica (DO) das bandas.

A média de DO de todas as bandas no grupo 1 foi de 48.1 ± 30.9 pixels enquanto no grupo 2 foi de 16.4 ± 15.4 pixels ($p < 0.00001$). Na figura 1 é possível visualizar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal dos machos selvagens, na figura 2 é demonstrado o perfil dos machos cultivados e na figura 3 é possível visualizar a densidade óptica (DO) de algumas bandas protéicas de um dos machos selvagens.

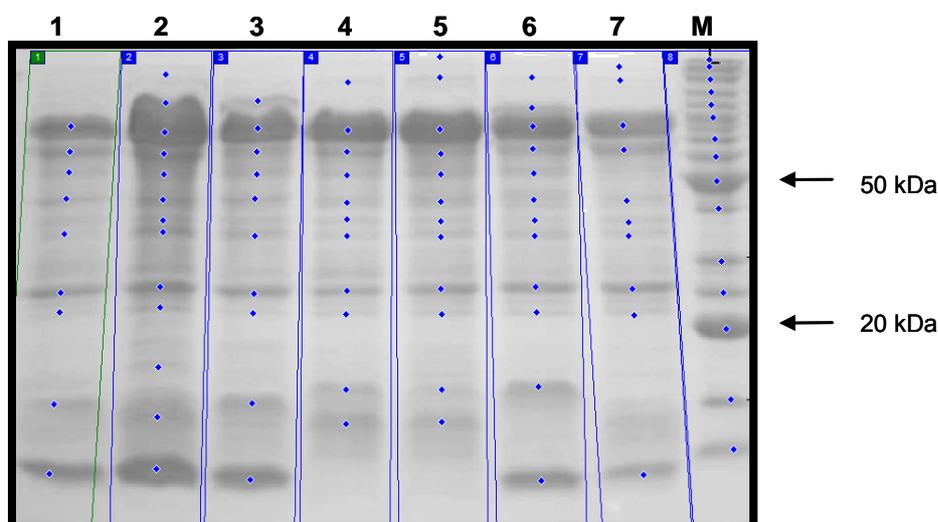


FIGURA 1 – SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de jundiás selvagens. **Coluna 1 a 9** – Plasma seminal de 9 machos. **Coluna M** – Marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™. Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100®.

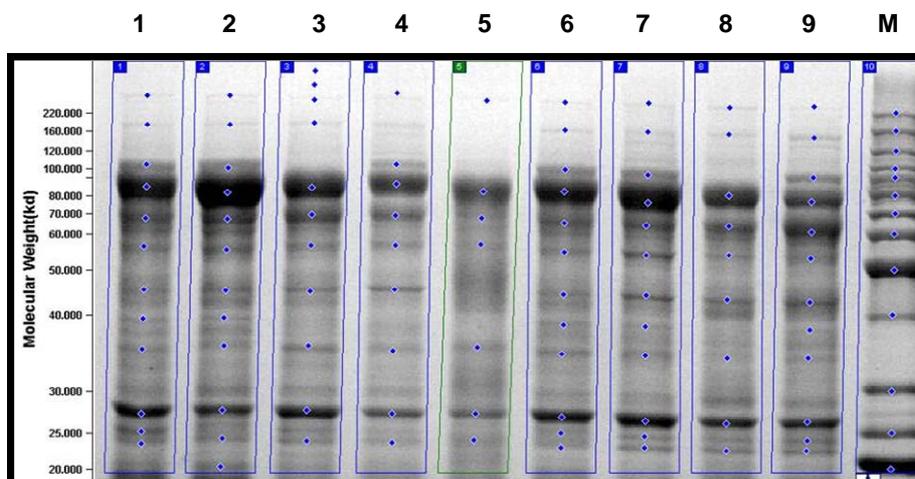


FIGURA 2 – SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de jundiás cultivados. **Coluna 1 a 9** – Plasma seminal de 9 machos. **Coluna M** – Marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™. Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100®.

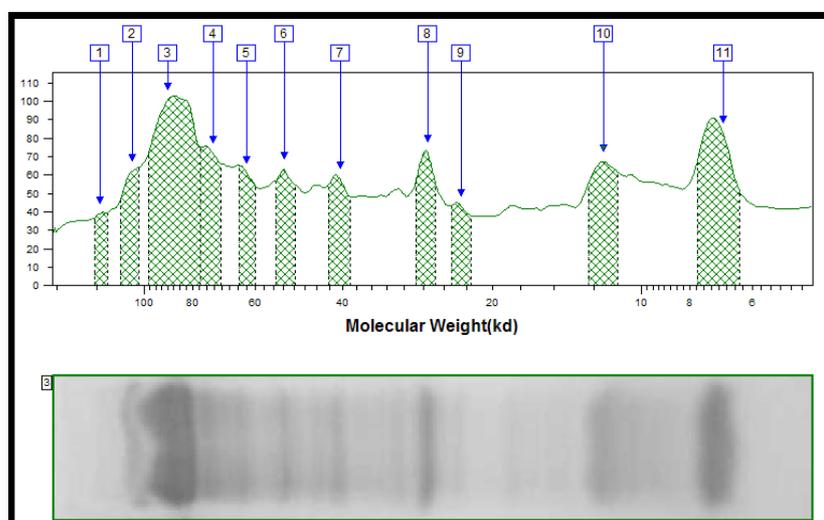


FIGURA 3 – Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100, demonstrando os picos de pixels relativo à densidade óptica das bandas protéicas do plasma seminal de jundiás selvagens (indicadas pelas setas em azul).

3.2 Experimento 2

O perfil eletroforético do plasma seminal dos galos demonstrou a presença de 21 bandas protéicas com peso molecular entre 280 e 4 kDa. Nenhum do ejaculados possuía todas as 21 bandas detectadas.

Na distribuição de frequência das bandas de acordo com a coleta e com o macho utilizado foi possível demonstrar que a banda de 72 kDa, com o maior nível de expressão em relação às outras bandas, estava presente em todos os 8 animais durante as três coletas de sêmen. A banda de 56 kDa não foi detectada em um macho na segunda coleta e a banda de 12 kDa não foi detectada na primeira coleta do macho n° 7. A banda de 180 kDa também não foi detectada na segunda coleta em dois machos. A banda de 100 kDa não foi detectada nas duas primeiras coletas no macho n° 7 e banda de 31 kDa não detectada na primeira coleta no macho n°2 e estava ausente na terceira coleta no macho n°1.

A banda de 50 kDa não foi detectada na primeira coleta dos machos 1 e 6 e também na segunda coleta dos machos 1, 4 e 6. Em contraste a banda de 4 kDa foi detectada apenas no macho n° 8 na primeira coleta e a banda de 48 kDa foi detectada apenas na terceira coleta em três machos (2, 4 e 7). A banda de 86 kDa foi detectada na terceira coleta dos machos 3, 4 e em todas as três coletas do macho 7. A banda de 280 kDa estava presente em todos os animais durante a primeira e terceira coleta, entretanto na segunda coleta a banda estava presente apenas nos machos 3 e 7. As bandas restantes (240, 160, 67, 63, 47, 42, 20, 16, 15, 11) demonstraram uma grande variabilidade na expressão durante as todas as coletas.

O perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de galos pode ser visualizado na figura 4 e a densidade óptica do perfil de um dos machos na figura 5.

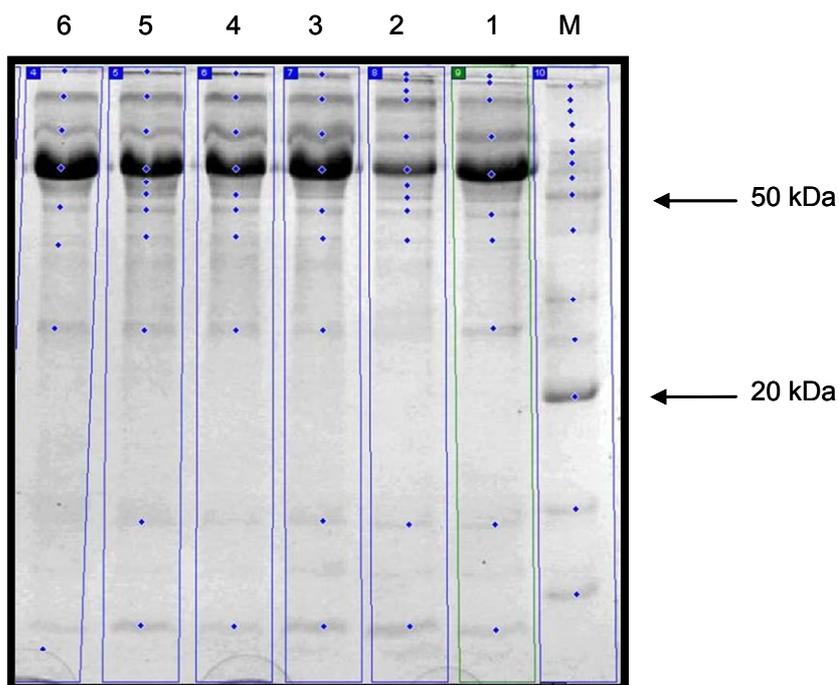


FIGURA 4 – SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de galos. **Coluna 1 a 6** – Plasma seminal de 6 machos. **Coluna M** – Marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™. Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100®.

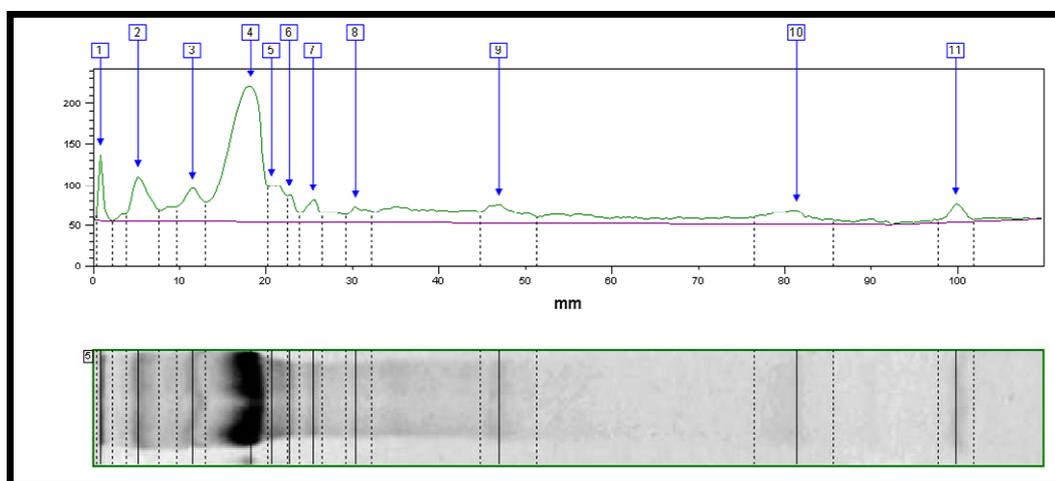


FIGURA 5 – Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100, demonstrando os picos de pixels relativo à densidade óptica das bandas protéicas do plasma seminal de galos (indicadas pelas setas em azul).

3.3 Experimento 3

A análise do perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal suíno demonstrou a presença de 24 bandas protéicas com pesos moleculares entre 340 e 7 kDa. Nenhuma das amostras de plasma seminal apresentou todas as 24 bandas. Da mesma forma que no experimento 2, foram observadas as variações na expressão das proteínas, na forma de presença ou ausência das bandas a cada coleta em cada macho. As bandas de 238, 118, 84 e 67 kDa foram detectadas em todas as coletas e em todos os animais. A banda com o maior peso molecular (340 kDa) foi detectada apenas na terceira coleta no macho 5 e 6. A banda de 268 kDa foi detectada apenas em uma das amostras de plasma seminal da última coleta do macho 6. A banda de 60 kDa estava presente em todos ejaculados, em contraste na segunda coleta a banda não estava presente no macho 4 e 5 e na última coleta só estava presente no macho 6. A banda de 26 kDa também demonstrou variabilidade, onde estava presente na primeira coleta no macho 1 e 5, na segunda coleta estava presente no macho 1, 2, 4 e 5 e na última coleta estava presente no macho 1, 3 e 4. As outras bandas detectadas também tinham alguma variação na expressão em relação as coletas de sêmen. O perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de suínos pode ser visualizado na figura 6 e a densidade óptica do perfil de um dos machos na figura 7.

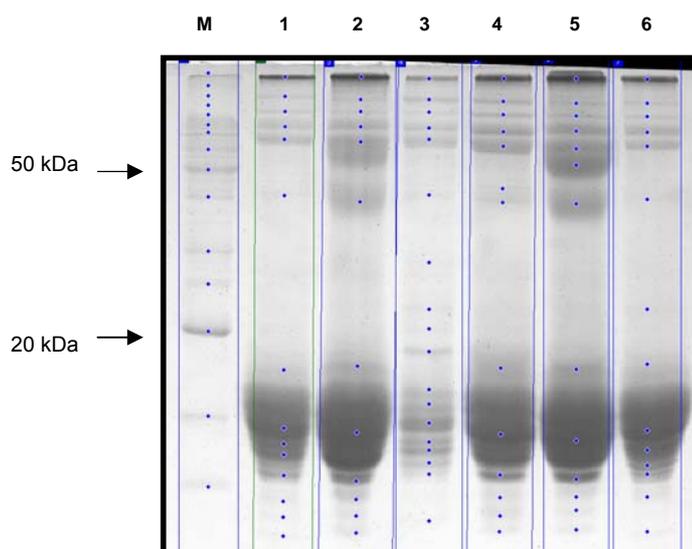


FIGURA 6 – SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de suínos. **Coluna 1 a 6** – Plasma seminal de 6 machos. **Coluna M** – Marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™. Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100®.

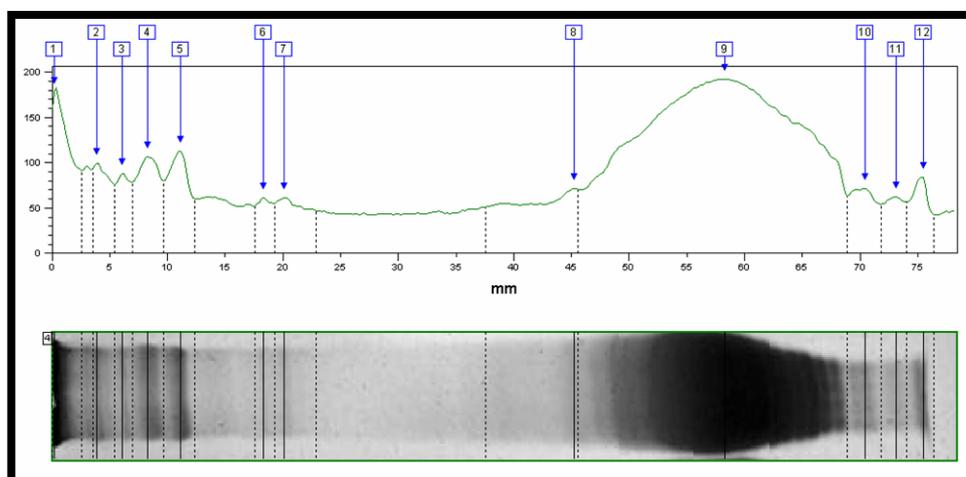


FIGURA 7 – Imagem gerada pelo software TotalLab TL 100, demonstrando os picos de pixels relativo à densidade óptica das bandas protéicas do plasma seminal de suínos (indicadas pelas setas em azul).

4 – DISCUSSÃO

Neste trabalho é relatada pela primeira vez a comparação entre as proteínas do plasma seminal entre peixes selvagens e cultivados. A significativa diferença na concentração de proteínas nas bandas formadas na eletroforese, sendo que a concentração nos ejaculados de machos cultivados é menor em relação aos animais de ambiente selvagem é um indício de diferenciação no mecanismo molecular de reprodução, de acordo com o habitat da espécie. Em mamíferos a ligação de algumas proteínas do plasma seminal estabiliza componentes da membrana plasmática, mascara antígenos expostos na superfície celular e previne contra a reação acrossômica prematura (Strzezek et al., 2005). Os espermatozoides de peixes não possuem acrossoma, entretanto, proteínas do plasma seminal provavelmente interagem da mesma forma como em outras espécies. É bem conhecido que a adsorção de elementos pela superfície celular é um processo dependente da temperatura (Leeuw et al., 1990).

Neste sentido, a alteração da temperatura do ambiente selvagem para o ambiente controlado pode influenciar na adsorção de elementos protéicos, responsáveis por funções na fisiologia espermática, aumentando ou diminuindo a capacidade de fertilização. A mudança de habitat também está relacionada com hábitos alimentares, uma vez que, espécies onívoras como o jundiá, passam a receber, em ambientes controlados, apenas um tipo de alimento (ração), onde possivelmente exista uma carência de nutrientes, que poderão influenciar a capacidade reprodutiva da espécie. Considerando que esta espécie nativa do Rio Grande do Sul possui uma boa aceitação para o consumo (Barcelos et al., 2001; Golombieski, 2003) este trabalho apresenta dados que representam uma base para estudos futuros sobre a influência das proteínas do plasma seminal na fisiologia reprodutiva desta espécie, o que contribuirá de maneira significativa para o incremento na produção em sistemas de aquicultura.

Também é relatada pela primeira vez a análise da variação da expressão de proteínas do plasma seminal de galos e suínos. No presente estudo foram detectadas 21 bandas protéicas no plasma seminal de galos com pesos moleculares entre 4 e 280 kDa, contrariamente ao que Steele & Wishart, (1996) descreveram, onde foram detectadas 40 bandas protéicas com pesos moleculares entre 12 e 160 kDa.

Também foram detectadas alterações significantes no perfil eletroforético, onde algumas bandas protéicas estavam presentes na primeira coleta de sêmen, ausentes na segunda e voltavam a ser expressas no plasma na terceira coleta. Recentemente foi demonstrado variações mensais na expressão de proteínas de ovinos, baseado em eletroforese bidimensional. Entretanto, é bem conhecido que a sazonalidade influencia significativamente a eficiência reprodutiva em ovinos (Cardozo et al., 2006). Análises do plasma seminal de ovinos através de SDS-PAGE demonstraram que muitas bandas protéicas com pesos moleculares entre 20 e 70 kDa encontradas em todas as amostras dos animais estudados durante a estação de produção, estavam ausentes do plasma durante a estação de pausa na produção (Smith et al., 1997). Neste presente estudo, pela primeira vez, foi avaliado a variação na expressão de proteínas do plasma seminal em três coletas de sêmen dentro de uma semana, tanto em suínos quanto em galos, buscando identificar possíveis alterações no perfil protéico. A alta variabilidade encontrada em algumas bandas em um curto período ainda não foi elucidada. Entretanto, estas proteínas são produtos da expressão de diversos genes, os quais têm sua transcrição influenciada por diversos fatores. Diferentemente dos ovinos, as aves não sofrem tanta influência da sazonalidade e mantêm sua capacidade reprodutiva durante todo o ano.

O plasma seminal contém fatores protéicos específicos que provocam importantes efeitos tanto na capacidade de fertilização do espermatozóide quanto na fisiologia reprodutiva da fêmea (Strzezek et al., 2005). Entretanto, os efeitos biológicos específicos das proteínas do plasma seminal nas funções espermáticas são complexos e não compreendidos totalmente. Nos bancos de dados in silico foi encontrado um grupo protéico com peso molecular de aproximadamente 26 kDa chamado Sialoproteínas, que tem por função a inibição da aglutinação das cabeças dos espermatozoides. A deficiência deste grupo pode comprometer o potencial espermático de fertilização (Strzezek et al., 2002). Usando eletroforese bidimensional (2D-PAGE), Flowers (2001) demonstrou a importância biológica de duas proteínas (26 kDa, pl 6,2; 55 kDa, pl 4,8) presentes no plasma seminal de suínos, relacionadas com altas taxas de parição (em torno de 86%). Killian et al. (1993) associou quatro proteínas do plasma seminal com a fertilidade de touros. Duas proteínas (26 kDa, pl 6,2; 55 kDa, pl 4,5) foram detectadas em touros de alta

fertilidade e outras duas (16 kDa, pI 4,1; 16 kDa, pI 6,7) estavam presentes em touros de baixa fertilidade.

Contudo, os dados obtidos neste trabalho poderão auxiliar em estudos posteriores para a elucidação das funções destas proteínas na fisiologia espermática e reprodutiva.

5 – CONCLUSÃO

- Foi possível observar que a expressão de proteínas do plasma seminal de jundiás (*Rhamdia quelen*), variou em termos de intensidade, ou seja, em animais selvagens a expressão é mais forte.

- Em aves e suínos a expressão de proteínas do plasma seminal variou de uma coleta para a outra em cada animal.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Mol Reprod Dev**, 42, 334-346.

AUMULLER, G.; RENNEBERG, H.; SCHIEMANN, P. J.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; KONRAD, L.; WENNEMUTH, G. (1997). The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. In: IVELL, R., HOLSTEIN, A.F. (Org.). **The Fate of the Male Germ Cell**. Plenum Press, Nova Yorque, 193–219.

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. (1983). Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **J Reprod Fertil**, 68, 275-280.

BAO, S.; MILLER, D. J.; MA, Z.; WOHLTMANN, M.; ENG, G.; RAMANADHAM, S.; MOLEY, K.; TURK, J. (2004). Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. **J Biol Chem**, 279, 38194-38200.

BARCELLOS, L. J.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V.; KRIEGER, M. H.; QUEVEDO, R. M.; LULHIER, F. (2001). Steroid profiles of cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. **Gen Comp Endocrinol**, 121, 325-332.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection, in: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Eds.), **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, p.147-157.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J.; AX, R. (1996). Monoclonal antibody detection of heparinbinding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J Anim Sci**, 74, 173-182.

BOURGEON, F.; EVRARD, B.; BRILLARD-BOURDET, M.; COLLEU, D.; JÉGOU, B.; PINEAU, C. (2004). Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. **Biol Reprod**, 70, 768-774.

CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, in press.

CIERESZKO, A.; KWASNIK, M.; DABROWSKI, K.; PIROS, B.; GLOGOWSKI, J. (2000). Chromatographic separation of trypsin-inhibitory activity of rainbow trout blood and seminal plasma. **Fish and Shellfish Immunology**, 10, 91-94.

CIERESZKO, A.; PIROS, B.; DABROWSKI, K.; KUCHARCZYK, D.; LUCZYNSKI, M. J.; DOBOSZ, S.; GLOGOWSKI, J. (1998). Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. **J Fish Biol**, 53, 1292-1305.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R.; HIBBITT, O.; PARRINGTON J. (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 12, 33-58.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. (2006). Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 36, 40-46.

DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. (1994). Proteinases inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish. **J Fish Biol**, 45, 801-809.

DÍAZ-PEREZ, E.; MEIZEL, S. (1992). Importance of mammalian endoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. **Mol Reprod Dev**, 31, 122-130.

DICKINSON, D. P. (2002). Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, 13, 238-275.

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. (2002) The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Hum Reprod**, 17, 2904-2911.

ENG, L. E.; OLIPHANT, G. (1978). Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. **Biol Reprod**, 19, 1083-1088.

FLOWERS, W. L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**, USA, 2001, p.1-4.

FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A. et al. (2006). Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reprod Biol**, 6, 5-20.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. (1996). SDS-PAGE characterization of the proteins in equine seminal plasma. **Theriogenology**, 46, 579-591.

GOLOMBIESKI, J. I.; SILVA, L. V.; BALDISSEROTTO, B.; DA SILVA J. H. (2003). Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. **Aquaculture**, 216, 95-102.

GRAHAM, J. K. (1994). Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and the bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, 41, 1151-1162.

GRANATA, F.; PETRAROLI, A.; BOILARD, E.; BEZZINE, S.; BOLLINGER, J.; DEL VECCHIO, L.; GELB, M. H.; LAMBEAU, G.; MARONE, G.; TRIGGIANI, M. (2005). Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. **J Immunol**, 174, 464-474.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. (1996) Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, 108, 199-204.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J. F.; GRIEL Jr., L. C.; (1995). Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biol Reprod**, 52, 390-397.

HUMPHREYS, D. T.; CARVER, J. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B.; WILSON, M. R. (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **J Biol Chem**, 274, 6875-6881.

IBRAHIM, N. M.; TROEDSSON, M. H.; FOSTER, D. N.; LOSETH, K. J.; FARRIS, J. A.; BLASCHUK, O.; CRABO, B. G. (1999). Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytotoxicity. **J Androl**, 20, 230-240.

JANSEN, S.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. (2001). Sperm adhesion molecules: structure and function. **Cells Tissues Organs**, 168, 82-92.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R. C.; GHAFOR, A.; FEUER, E. J.; THUN, M. J. (2005). Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin**, 55, 10-30.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. (2004). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, 61, 255-266.

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

KORDAN, W.; HOLODY, D.; ERIKSSON, B.; FRAZER, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; STRZEZEK, J. (1998). Sperm motility inhibiting factor (SMIF) – A plasmatic peptide with multifunctional effects on boar spermatozoa. **Reprod Dom Anim**, 33, 347-354.

KOTLOWSKA, M.; KOWALSKI, R.; GLOGOWSKI, J.; JANKOWSKI, J.; CIERESZKO, A. (2005). Gelatinases and serine proteinase inhibitors of seminal

plasma and the reproductive tract of turkey (*Meleagris gallopavo*). **Theriogenology**, 63, 1667-1681.

KOWALSKI, R.; GLOGOWSKI, J.; KUCHARCZYK, D.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; CIERESZKO A. (2003). Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts. **J Fish Biol**, 63, 1008-1019.

LAEMMILI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, 5, 677-680.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. (2004). Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, 62, 801-808.

LEEUW F. E.; CHEN, H. C.; COLENBRANDER, B. et al. (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, 27, 171-183.

LESSLEY, B. A.; BROWN, K. I. (1978). Purification and properties of a proteinase inhibitor from chicken seminal plasma. **Biol Reprod**, 19, 223-234.

LITTLE, T.V.; HOLYOAK, G. R. (1992). Reproductive anatomy and physiology of the stallion. **Vet Clin N Am – Equine Practice**, 8, 1-30.

LOIR, M.; LABBE, C.; MAISSE, G.; PINSON, A.; BOULARD, G.; MOUROT, B.; CHAMBEYRON, F. (1990). Proteins of seminal fluid and spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): partial characterization and variations. **Fish Physiology and Biochemistry**, 8, 485-495.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I.; (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **J Reprod Immunol**, 53, 109-119.

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

MOCHIDA, K.; KONDO, T.; MATSUBARA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. (1999). A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Devlop Growth Differ**, 41, 619-627.

MOCHIDA, K.; MATSUBARA, T.; ANDOH, T.; URA, K.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. (2002). A novel seminal plasma glycoprotein of a teleost, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), contains a partial von Willebrand factor type D domain and a zona pellucida-like domain. **Mol Reprod Dev**, 62, 57-68.

MOHAN, J.; SAINI, M.; JOSHI, P. (1995). Isolation of a spermatozoa motility inhibiting factor from chicken seminal plasma with antibacterial property. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1245, 407-413.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. (2006). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**, in press.

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

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. (2006). Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, 66, 307-313.

PILCH, B.; MANN, M. (2006). Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. **Genome Biology**, 7, 1-10.

POLAKOSKI, K. L.; KOPTA, M. (1982). Seminal Plasma. In: ZANEVELD, L. J. D.; CHATTERTON, R. T. (org). **Biochemistry of mammalian reproduction**. Wiley Interscience Publicações, p. 89–117.

REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A.; (2002). Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. **Mol Reprod Dev**, 63, 500-509.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. (1999). Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 36:0-0.

SANCHEZ-LUENGO, S.; AUMULLER, G.; ALBRECHT, M.; SEN, P. C.; ROHM, K.; WILHELM, B. (2004). Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. **J Androl**, 25, 234-244.

SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. (1996). Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, 45, 633-642.

SENGER, D. R.; WIRTH, D. F.; HYNES, R. O. (1979). Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. **Cell**, 16, 885-893.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K. H.; BHARGAVA, P. J. (1990). Proteins of Seminal Plasma. **New York: J.H.Wiley and Sons, Inc.**, 1990.

SMITH, J. F.; PARR, J.; SMITH, J. K.; BRIGGS, R. M.; DUGANZICH, D. M. (1997). Seasonal patterns in production and quality of semen of rams from flocks selected for or against an early breeding season. **Proc N Z Soc Anim Reprod**, 57, 259.

STEELE, M. G.; WISHART, G. J. (1996). The effect of removing surface-associated proteins from viable chicken spermatozoa on sperm function in vivo and in vitro. **Anim Reprod Sci**, 45, 139-147.

STRZEZEK, J.; HOLODY, D. (1996). Separation of 54 kDa glycoprotein with suppressive properties from boar seminal plasma. **Advances in Contraceptive Delivery System**, 12, 235-246.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIK, A. (1992). Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Anim Reprod Sci**, 29, 35-52.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRAZER, L. (2005). Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reprod Biol**, 5, 279-290.

STRZEZEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P. et al. (2002). Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports**, 20, 255-266.

SUAREZ, S. S. (2001). Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. **Cells Tissues Organs**, 168, 105-112.

TAKAYAMA, T.; MATSUBARA, S.; SHIBAHARA, H.; MINAKAMI, H.; TAKIZAWA, T.; SATO, I. (2000). Ultracytochemical localization of 5'-nucleotidase activity in human ejaculated spermatozoa. **Int J Androl**, 23, 106-108.

TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. (2000). Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **Eur J Biochem**, 267, 6175-6179.

TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. (2000). Oocyte-sperm interactions. **Anim Reprod Sci**, 60, 653-662.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol Reprod**, 59, 1-6.

WASSARMAN, P. M. (1998). Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. **Cell**, 96, 175-183.

WILSON, M. R.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. (2000). Clusterin is a secreted mammalian chaperone. **TIBS**, 25, 95-98.

WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G. J.; CIERESZKO, A. (2005). Transferrin and antiproteinases are major proteins of common carp seminal plasma. **Fish and Shellfish Immunology**, 19, 387-391.

YUAN, Y. Y.; CHEN, W. C.; SHI, Q. X.; MAO, L. M.; YU, Q.; FANG, X.; ROLDAN, E. R. S. (2003). Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biol Reprod**, 68, 904-913.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; ROSSANO, R.; STORELLI, C. VILELLA, S. (2005). Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. **Biol Reprod**, 72, 1262-1267.