



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA PAULA ALVES FAVARETO

**“IMUNOLocalização e Quantificação da Proteína
SP22 em Espermatozoides de Ovinos e sua Relação
com outros Parâmetros Espermáticos”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ana Paula Favareto
Wilma De Grava Kempinas
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

F277i	Favareto, Ana Paula Alves Imunolocalização e quantificação da proteína SP22 em espermatozoides de ovinos e sua relação com outros parâmetros espermáticos / Ana Paula Alves Favareto. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadora: Wilma De Grava Kempinas. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Proteína SP22. 2. Espermatozoides. 3. Carneiro. 4. Análise Computadorizada do Sêmen (CASA). I. Kempinas, Wilma De Grava. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/ib)
--------------	--

Título em inglês: Immunolocalization and quantification of the SP22 protein on ovine sperm and its relationship to other sperm parameters.

Palavras-chave em inglês: SP22 protein; Sperm; Ram; Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA).

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Wilma De Grava Kempinas, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Eliana Milanesi Rúbio.

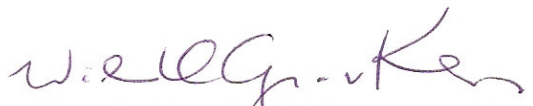
Data da defesa: 21/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 21 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Eliana Milanesi Rúbio


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira


Assinatura

Profª. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga


Assinatura

Profª. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Assinatura

“O pesquisador que quando colocado diante de um dever árduo não percebe seu entusiasmo crescer e sua alma inundada de uma emoção preconizadora de prazer, poderia abandonar a pesquisa científica. Porque a natureza não concede seus favores aos flegmáticos e outros céticos, sendo bastante freqüente tal tipo de frieza apenas um indubitável sinal de impotência”.

Santiago Ramon y Cajal

Dedicatória

Este trabalho é dedicado...

À minha mãe Dinalva, que por amor soube enfrentar os momentos difíceis e a distância, sempre preocupada e dando incentivo para que mais este passo de minha vida pudesse se tornar possível. Muito obrigada por toda a dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida...

Ao meu pai Valdeci, que mesmo distante, se preocupa e torce pela minha felicidade e pelo meu sucesso.

Ao Fernando, meu namorado e companheiro de tantos anos, de tantos momentos, de tantas alegrias e também ombro de tantas preocupações, tristezas e desapontamentos. Muito obrigada por me permitir compartilhar com você todas as minhas vitórias e dores e por me apoiar e incentivar em todas as empreitadas de forma incondicional. A você dedico este momento e todo o meu amor...

“Como poderia sentir-me infeliz se tenho ao meu redor ouvidos que escutam minhas lamúrias, lábios que dizem palavras de conforto, mãos que seguram minhas mãos e ombros que me permitem chorar.”

Autor desconhecido

Agradecimentos

A Deus.

“Você se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos. E, passo a passo pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir... Sua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e sinto que, em meu gesto, existe o seu gesto, e em minha voz, a sua voz”.

Vinícius de Moraes

À minha orientadora Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas pelos seus ensinamentos, dedicação, amizade e pela confiança em mim depositada. Muito obrigada por tudo!!!

“Não basta ensinar ao homem apenas uma especialidade, por que se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

Ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

À Lílíam A.S. Panagio, secretária da Pós-graduação do curso de Biologia Celular e Estrutural, IB, UNICAMP, por estar sempre pronta a ajudar no que for preciso.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP, por seus ensinamentos e pela contribuição em minha formação científica.

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu pela oportunidade oferecida para realização deste experimento.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu, pela colaboração.

À Luciana Cristina Montes secretária do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu.

Ao Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo da FMVZ, UNESP de Botucatu, pelas orientações, pela valiosíssima contribuição neste trabalho e por disponibilizar as dependências do seu laboratório para realização de parte deste experimento.

Ao Dr. Gary Robert Klinefelter por ceder os antígenos e anticorpos para o estudo da proteína SP22, pelas orientações nas análises dos imunoensaios e pela contribuição na interpretação dos resultados.

Ao Prof. César Augusto Taconeli do Departamento de Bioestatística, IB, UNESP de Botucatu, pelas orientações nas análises estatísticas.

Ao Leandro Rodello da FMVZ, UNESP de Botucatu, por toda a ajuda nas coletas e avaliação do sêmen.

À Cláudia Dias Monteiro da FMVZ, UNESP de Botucatu, pela ajuda nos dias de coleta de sêmen.

Ao Prof. Dr. Fausto Foreste do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu, por disponibilizar o microscópio de fluorescência.

Ao Prof. Dr. José Maurício Sforcine do Departamento de Imunologia, IB, UNESP de Botucatu, por disponibilizar o leitor de ELISA.

À Profa. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo, por todos os seus ensinamentos e por fazer nascer em mim o amor pela ciência.

Aos Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari e Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, por terem feito parte da minha banca de qualificação, me ajudando a crescer profissionalmente.

Aos Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Profa. Dra. Eliana Milanesi Rúbio e Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela avaliação prévia deste trabalho, colaborando para o enriquecimento do mesmo.

Ao José Eduardo Bozano, técnico do Laboratório ReproTox, pela amizade e pelo seu inabalável bom humor e disposição para ajudar.

A todos os amigos do Laboratório ReproTox: Ana Sílvia, Arielle, Carla Fernandez, Carla Teixeira, Davi, Denise, Fabíola, Fernanda Belentani, Flávia, Glaura, Gustavo, Juliana Perobelli, Juliana Umezaki, Luís, Marina, Thaiane e Wellerson, pela amizade, companheirismo e principalmente por serem a minha família de Botucatu. Amo todos vocês...

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, por meio da concessão de bolsa de estudo (Processo nº 06/54103-1).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro, por meio da concessão de bolsa de apoio técnico à pesquisa ao técnico de Laboratório José Eduardo Bozano (Processo nº 501306/2005-2006).

Aos criadores de ovinos pela gentileza de ceder os reprodutores para a realização deste experimento.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, colaborando para minha formação pessoal ou profissional e que, injustamente, me falta no momento a lembrança.

A todos vocês, que compartilharam os meus ideais, dedico a mais profunda gratidão e respeito.

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor”.

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. Ovinocultura.....	5
1.2. A espermatogênese.....	6
1.3. O espermatozóide.....	8
1.4. Maturação espermática.....	9
1.5. Capacitação espermática.....	11
1.6. O processo de fertilização.....	12
1.7. Proteínas espermáticas em animais domésticos.....	17
1.8. Proteína espermática SP22.....	20
1.9. Avaliação do sêmen.....	24
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA TEMÁTICA.....	29
3. OBJETIVOS.....	29
4. CAPÍTULO.....	30
Title.....	31
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	34
Results.....	41
Discussion.....	45
Acknowledgements.....	50
References.....	51
Legends of Figures	57
Tables.....	59
Figures.....	62
5. CONCLUSÕES FINAIS.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	68

7. ANEXO.....	82
---------------	----

RESUMO

Vários estudos têm demonstrado que a proteína espermática de membrana SP22 (22-28 kDa) é altamente correlacionada com a fertilidade. A localização desta proteína no segmento equatorial da cabeça espermática em várias espécies mamíferas, e a inibição de fertilização *in vivo* e *in vitro*, obtida com a incubação de espermatozóides com anticorpos anti-rSP22, sugerem sua participação na interação espermatozóide-oócito e sua importância para a capacidade reprodutiva masculina. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a presença da proteína SP22 em espermatozóides de carneiros adultos (raças Dorper e Santa Inês), identificando sua localização; quantificar os níveis desta proteína mediante as técnicas de ELISA e imunomarcção fluorescente utilizando anticorpo anti-rSP22; e correlacionar os seus níveis com os parâmetros espermáticos de morfologia, integridade de membrana avaliada por sondas fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio), e cinética obtida por sistema computadorizado (CASA). A SP22 foi especificamente localizada no segmento equatorial da cabeça e no colo do espermatozóide ovino. As técnicas de ELISA e imunomarcção fluorescente mostraram-se eficientes para a quantificação da SP22 nos espermatozóides ovinos e altamente correlacionadas ($R^2 = 0,70$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos níveis de SP22 obtidos por estes dois métodos entre as raças estudadas. Para o estudo da cinética espermática foi realizada análise estatística multivariada, considerando os valores individuais obtidos pelo sistema CASA (1 ejaculado por carneiro, $n = 3847$ espermatozóides). Através da análise de agrupamento foi possível estabelecer um número de 3 sub-populações espermáticas coexistentes no ejaculado dos carneiros. A sub-população 1 foi a mais ativa e progressiva. A subpopulação 3 teve movimento pouco progressivo e não-linear, e a sub-população 2 teve um padrão de cinética intermediário. Houve diferença significativa (qui-quadrado = 824,39; grau de liberdade = 34; $P < 0,0001$) na distribuição das 3 sub-populações nos carneiros. No entanto, não houve correlação significativa ($P > 0,05$) entre a proporção de cada sub-população nos carneiros e os níveis de SP22 avaliados por ELISA e imunomarcção fluorescente. A integridade de membrana espermática foi positivamente correlacionada ($R^2 = 0,48$; $P = 0,02$) com a proporção de espermatozóides da sub-

população 1 e negativamente correlacionada ($R^2 = 0,30$; $P = 0,02$) com a sub-população 3. Porém, este parâmetro espermático não foi correlacionado ($P > 0,05$) com a proporção de espermatozóides da sub-população 2. Além disso, a morfologia espermática não foi correlacionada ($P > 0,05$) às proporções das três sub-populações cinéticas encontradas. Os níveis de SP22 obtidos por ELISA foram negativa e positivamente correlacionados (R^2 para as 3 variáveis = 0,47) com as porcentagens de espermatozóides morfolologicamente anormais e de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, respectivamente. A quantificação de SP22 por análise de imunomarcação fluorescente não foi correlacionada com nenhum dos parâmetros espermáticos avaliados. Estes resultados demonstraram que o estudo da proteína SP22 em espermatozóides ovinos pode trazer importantes informações a respeito da capacidade reprodutiva destes animais. Entretanto, para a validação desta proteína como um biomarcador de fertilidade nesta espécie são necessários estudos que correlacionem os níveis da SP22 com as taxas de fertilidade obtidas *in vivo* e/ou *in vitro*.

Palavras-chave: Proteína SP22, espermatozóide, carneiro, análise computadorizada do movimento espermático (CASA).

ABSTRACT

Several studies have shown that the SP22 sperm membrane protein (22-28 kDa) is highly correlated with fertility. The location of this protein on the equatorial segment of the sperm head in several mammalian species, and the inhibition of *in vivo* and *in vitro* fertilization, obtained by the incubation of spermatozoa with anti-rSP22 antibodies, suggest its participation in spermatozoon-oocyte interaction and its importance for the male reproductive capacity. Thus, the goals of the present study were to evaluate the presence of the SP22 protein on spermatozoa from adult rams (Dorper and Santa Inês breeds), identifying its location; to quantify the levels of this protein by ELISA and FITC immunostaining analysis using anti-rSP22 Ig; and to correlate its levels with sperm parameters of morphology, membrane integrity evaluated by fluorescent probes (carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide) and kinetics by computer-assisted sperm analysis (CASA). The SP22 was specifically located on the equatorial segment of the head and neck of the ram spermatozoon. The ELISA and FITC immunostaining techniques appear to be efficient for the SP22 quantification in ovine spermatozoa and were significantly correlated ($R^2 = 0.70$). There was no significant difference ($P > 0.05$) in SP22 levels assessed by these two methods between the studied breeds. For the study of the sperm kinetics, multivariate statistical analysis was performed, considering the individual values obtained by CASA system (1 ejaculate per ram, $n = 3847$ spermatozoa). Through clustering analysis, it was possible to set up a number of 3 sperm subpopulations coexistent within ejaculate from rams. The subpopulation 1 was the most active and progressive. The subpopulation 3 had little progressive and non-linear movement and the subpopulation 2 had an intermediate kinetic pattern. There was significant difference (chi-square = 824.39; degrees of freedom = 34; $P < 0.0001$) in the distribution of the 3 subpopulations among the rams. However, there was no significant correlation ($P > 0.05$) between the proportion of each subpopulation in the rams and the SP22 levels evaluated by ELISA and FITC immunostaining analysis. The membrane integrity was positively correlated ($R^2 = 0.48$; $P = 0.02$) with the proportion of spermatozoa in subpopulation 1 and it was negatively correlated ($R^2 = 0.30$; $p = 0.02$) with subpopulation 3. However, this sperm parameter was

not significantly correlated ($P > 0.05$) with proportion of spermatozoa in subpopulation 2. Moreover, sperm morphology was not significantly correlated ($P > 0.05$) with the proportions of the three kinematics subpopulations found within ejaculate semen. The SP22 levels obtained by ELISA were negatively and positively correlated ($R^2 = 0.47$ for 3 variable) with percentages of spermatozoa morphologically abnormal and of spermatozoa with intact plasma membrane, respectively. The SP22 quantification by FITC immunostaining analysis was not correlated with any of the sperm parameters. These results showed that study of the SP22 protein in ram spermatozoa can bring important information about the reproductive capacity of these animals. Nevertheless, studies that correlate the SP22 levels with *in vivo* and/or *in vitro* fertility rate are necessary for validation of this protein as a fertility biomarker in this species.

Key-words: SP22 protein, spermatozoon, ram, computer-assisted semen analysis (CASA).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ovinocultura

A ovinocultura apresenta um ciclo de crescimento mundial, que se intensificou nas últimas décadas, especialmente em países em desenvolvimento, que são os detentores dos maiores rebanhos (Fonseca, 2005).

O Brasil destaca-se neste cenário de crescimento, tendo um rebanho de mais de 15,5 milhões de ovinos (IBGE, 2005), responsável pela produção de leite, carne, lã e pele, gerando renda e empregos na pecuária. As regiões nordeste e sul apresentam os maiores rebanhos, sendo esta responsável por aproximadamente 28% e aquela por 58% do rebanho nacional (IBGE, 2005).

A perspectiva de crescimento do rebanho nacional para 100 milhões de animais nos próximos 20 anos (Fonseca, 2005), decorrente da grande demanda por produtos de origem ovina e da abertura de mercado neste setor, cria a necessidade de investimentos em pesquisas, que contribuam para o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva destes animais e para a multiplicação mais eficiente de genótipos superiores.

Duas raças ovinas deslanadas destacam-se na pecuária nacional: a Santa Inês originada no nordeste brasileiro, como resultado de cruzamentos sucessivos das raças Bergamácia, Morada Nova, Somalis e outros ovinos sem raça definida (ARCO, 2007) e a Dorper, originada na África do Sul, do cruzamento de Blackhead Persian e Dorset Horn (Milne, 2000).

As raças Santa Inês e Dorper destacam-se pela prolificidade, habilidade materna e produção leiteira considerável (Barros et al., 2005) e pela ótima qualidade de carcaça, rápido crescimento e boa taxa de fertilidade (Cloete et al., 2000), respectivamente.

Uma das características mais importantes das raças Dorper e Santa Inês é a poliestria anual (ARCO, 2007), que permite que os animais sejam acasalados em qualquer época do ano, desde que em estado nutricional adequado (Freitas e Lopes, 2001). Além disso, estas apresentam grande resistência, rusticidade e fácil adaptação a diferentes condições climáticas de regiões tropicais e subtropicais, suportando manejo extensivo com

boa produtividade, sendo estes fatores importantes para a disseminação das raças em todo território nacional, inclusive em regiões semi-áridas (Cloete et al., 2000; Garcia et al., 2000; ARCO, 2007).

1.2. A espermatogênese

Os espermatozóides de mamíferos resultam de sucessivos e complexos eventos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de diferenciação celular, que ocorrem nos testículos durante o processo espermatogênico (Clermont, 1972).

A espermatogênese representa um processo contínuo e elaborado de proliferação, desenvolvimento e diferenciação das células germinativas, composto por três fases distintas: mitótica (espermatogonial ou proliferativa), meiótica e espermiogênica (diferenciação) (Clermont, 1972; Russel et al., 1990), que são especificamente reguladas (Sharpe, 1994).

Durante a fase mitótica, as espermatogônias-tronco (espermatogônias tipo A isolada - A_s) sofrem proliferação para expandir a população espermatogonial, formando as diferentes classes de espermatogônias [tipo A proliferativa (A pareada - A_{pr} e A alinhada - A_{al}), tipo A diferenciada (A₁, A₂, A₃, A₄), tipo intermediário e tipo B]. As espermatogônias em estado diferenciado se comprometem com a formação dos espermátócitos primários, diferenciando-se neste tipo celular (Russel et al., 1990).

Na fase meiótica, os espermátócitos primários entram em meiose I, dando origem aos espermátócitos secundários, que passam pela meiose II transformando-se em espermátides. Na fase pós-meioótica, as espermátides sofrem uma série de modificações citológicas como, condensação da cromatina, formação do acrossomo, perda de citoplasma, reposicionamento de mitocôndrias e formação do flagelo; dando origem aos espermatozóides, células altamente organizadas e especializadas (Clermont, 1972; Russel et al., 1990).

O gameta masculino apresenta formato específico, que varia de acordo com a espécie (Eddy, 2006), e é constituído pela cabeça, onde estão localizados o núcleo (bastante condensado e “inativo”) e o acrossomo, e pelo aparelho flagelar, responsável pela

motilidade espermática (Clermont, 1972; Eddy, 2006).

Em mamíferos, a duração total da espermatogênese baseada em 4,5 ciclos espermatogênicos é de aproximadamente 30 a 75 dias (Sharpe, 1994). Esta duração está sob regulação do genótipo das células germinativas (França et al., 1998), sendo geralmente constante dentro de uma espécie (França et al., 2005).

A espermatogênese em ovinos consiste em ciclos de 10,6 dias e tem duração de 47,7 dias, sendo que 52,7% deste período correspondem à fase pré-meiótica, 7,2% à meioótica e 40,1% à pós-meiótica (França et al., 2005).

As células de Sertoli desempenham várias funções importantes no processo espermatogênico. Dentre estas funções destacam-se a nutrição e o suporte das células germinativas; a compartimentalização dos túbulos seminíferos, através de suas junções intercelulares, que criam um microambiente específico para o desenvolvimento das células germinativas, protegendo os tipos celulares em estágios mais avançados de diferenciação (Hess e França, 2005; Skinner, 2005a); a produção e secreção de fluido, proteínas e fatores de crescimento (Skinner, 2005b); e a fagocitose de células em degeneração ou de restos citoplasmáticos resultantes da espermiogênese (Hess e França, 2005).

O processo espermatogênico é diretamente regulado pelo eixo neuroendócrino hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A hipófise, por influência hipotalâmica, secreta dois hormônios sexuais que exercem o controle da função testicular, o LH (hormônio luteinizante) e o FSH (hormônio folículo-estimulante) (Russel et al., 1990). Este hormônio atua sobre as células de Sertoli, estimulando suas funções sobre a espermatogênese, e aquele sobre as células de Leydig, estimulando a produção de andrógenos, principalmente a testosterona (Christensen e Mason, 1965; Lipsett, 1976).

Em ratos, o FSH apresenta atuação específica sobre o estágio inicial de desenvolvimento espermatogonial (Meachem et al., 1999), enquanto a testosterona regula a espermiogênese (Kerr et al., 1992). Estes hormônios atuam em cooperação nos demais estágios da espermatogênese, estimulando o início do processo meioótico e promovendo o desenvolvimento de espermátócitos e a produção de espermátides arredondadas (Kerr et al., 1992).

1.3. O espermatozóide

Os espermatozóides dos mamíferos são compostos pelas mesmas estruturas básicas, a cabeça e o flagelo, e apresentam formatos variados de acordo com a espécie (Eddy, 2006).

A cabeça espermática contém o conjunto haplóide de cromossomos característico da espécie, e o flagelo é responsável pela motilidade, que permite o movimento do espermatozóide no trato reprodutor feminino e a sua aproximação ao oócito a ser fertilizado (Eddy, 2006).

A membrana plasmática da cabeça da maioria dos espermatozóides de mamíferos apresenta-se subdividida em região acrossomal (porção anterior) e pós-acrossomal (porção posterior). A região acrossomal pode ainda ser subdividida em segmento marginal (domínio apical), segmento principal (domínio acrossomal anterior) e segmento equatorial (domínio acrossomal posterior) (Eddy, 2006; Jones et al., 2007).

Análise dos espermatozóides de ovinos, suínos e bovinos mediante microscopia de força atômica revelou significativas diferenças na superfície da membrana plasmática, entre região acrossomal anterior, segmento equatorial e região pós-acrossomal. Nestas três espécies, a membrana plasmática da região pós-acrossomal apresenta uma superfície irregular, assim como a região acrossomal. No entanto, no limite com o segmento equatorial existe uma mudança abrupta formando uma linha claramente definida em bovinos e suínos ou um colar de depressões retangulares (em ovinos) entre estes dois domínios (Ellis et al., 2002).

O segmento equatorial apresenta superfície relativamente homogênea, com exceção de uma região semicircular específica, chamada sub-segmento equatorial (Ellis et al., 2002). Esta região se desenvolve durante a maturação espermática e apresenta lipídios e proteínas, principalmente fosforiladas, específicas. Assim, seu papel como mediadora da fusão com o oolema tem sido discutido (Ellis et al., 2002; Jones et al., 2007).

O flagelo tem formato de um longo cilindro e é constituído pela peça intermediária, peça principal e peça terminal. Sua estrutura vista sob microscopia eletrônica revela que este é constituído pelo axonema (Russel et al., 1990; Cosson, 1996; Eddy, 2006). Esta

estrutura está presente em toda a extensão do flagelo e é composta por dois microtúbulos centrais conectados e envolvidos por uma bainha de fibras e por nove microtúbulos duplos, que rodeiam o componente central, formando a estrutura “9 + 2”. Cada microtúbulo duplo é constituído por uma subunidade A completa e por uma subunidade B em forma de C, que se anexa à subunidade A. Animais de fertilização interna, ainda apresentam nove fibras densas externas e uma bainha fibrosa, que envolve toda a estrutura “9 + 2” (Cosson, 1996).

A partir da subunidade A, partem braços de dineína, uma subunidade do complexo ATPase, que transforma energia química (ATP) em cinética, permitindo o deslizamento relativo de duplas de microtúbulos adjacentes, com conseqüente encurvamento do axonema e movimento flagelar. Este processo ocorre em ciclos de ligamento e desligamento entre a dineína e a dupla de microtúbulos adjacentes. As duplas de microtúbulos adjacentes são conectadas por ligações de nexinas entre as subunidades A e B. Além disso, raios protéicos se projetam a partir das subunidades A em direção à bainha central, estruturando o axonema (Cosson, 1996; Eddy, 2006).

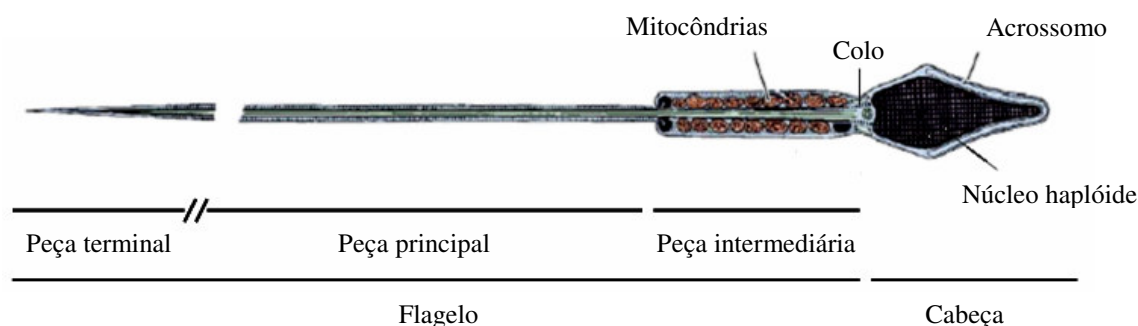


Figura 1. O espermatozóide. [Adaptada de Junqueira L.C., Carneiro J. Aparelho reprodutor masculino. In: Junqueira L.C., Carneiro J. (Eds). Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004: 420p].

1.4. Maturação espermática

Quando os espermatozoides saem dos testículos em direção à rede testicular já apresentam morfologia especializada, no entanto, ainda não apresentam atividade móvel e

não são capazes de fecundar o oócito (Gatti et al., 2004). Estas características são adquiridas somente nas diferentes porções do túbulo epididimário, que está fisiologicamente adaptado a gerar mudanças seqüenciais no espermatozóide durante a sua progressão pelo órgão (Dacheux et al., 2003).

O tempo de trânsito dos espermatozóides ovinos pelo epidídimo é de 10,4 a 16,4 dias, sendo que de 2,1 a 3,6 dias são necessários para o trajeto ao longo do segmento cabeça/corpo e de 8,3 a 12,8 dias para a passagem ao longo da cauda epididimária (França et al., 2005).

Segundo Hammerstedt et al. (1982) o epidídimo de carneiros pode ser subdividido em 7 regiões, de 1 a 3 (cabeça), 4 e 5 (corpo) e 6 e 7 (cauda), sendo cada uma delas responsável por eventos específicos da maturação espermática.

As principais modificações espermáticas ocorrem a partir da região 5, na qual ocorre mudança do glicocálice, translocação da gota citoplasmática, mudanças na estrutura espermática que permitem atividade flagelar, dentre outras modificações. Na região 6, ocorre a aquisição de capacidade de auto-sustentação da motilidade progressiva e mudanças na bicamada lipídica da membrana, que reduzem a susceptibilidade a danos causados por procedimentos de resfriamento e congelação do sêmen, ou seja, ao *cold-shock* (Hammerstedt et al., 1982).

As modificações espermáticas que levam à maturação do espermatozóide ovino estão principalmente relacionadas à composição e localização de proteínas e de outros componentes na membrana plasmática do gameta (Dacheux e Voglmayr, 1983).

Durante a passagem dos espermatozóides ovinos pelos ductos eferentes e pela cabeça epididimária ocorre uma rápida redução e/ou remoção de proteínas de membrana de origem testicular (Dacheux e Voglmayr, 1983), através do mecanismo de proteólise (Lum e Blobel, 1997) e aparecimento de componentes transitórios ou permanentes de membrana (Dacheux e Voglmayr, 1983). Após este processamento inicial, os gametas passam por um período de relativa quiescência no corpo do epidídimo e de aparecimento e reaparecimento de alguns componentes de superfície (Dacheux e Voglmayr, 1983).

Todos os eventos ocorridos durante a passagem do espermatozóide pelas diferentes regiões do epidídimo resultam no processo de maturação fisiológica, que permite que este

adquirir capacidade de se tornar móvel e fértil, possibilitando a sua chegada até o sítio de fertilização, o reconhecimento e ligação com a zona pelúcida e a fusão com a membrana do oócito, resultando em embriões viáveis (Hammerstedt et al., 1982).

1.5. Capacitação espermática

Quando os espermatozóides saem do epidídimo são capazes de moverem-se ativamente, entretanto ainda não completaram a sua maturação fisiológica, iniciada no epidídimo, e precisam sofrer alterações que os tornem realmente capazes de fertilizar o oócito (Yanagimachi, 2006).

O término deste processo ocorre no trato reprodutor feminino, onde os espermatozóides passam por inúmeras modificações bioquímicas e fisiológicas, que coletivamente compreendem o processo de capacitação espermática (Rathi et al, 2001).

Estas mudanças ocorrem principalmente na membrana plasmática e incluem a reorganização de proteínas; a alteração de propriedades de membrana, como potencial, composição e assimetria fosfolipídica; difusão lateral de lipídeos e proteínas; alteração no metabolismo de fosfolipídeos, redução dos níveis de colesterol e modificações no fluxo de íons e do pH intracelular (Yanagimachi, 2006).

Algumas destas mudanças na distribuição e composição dos fosfolipídios de membrana (Pérez et al., 1996; Gillan et al., 1997), bem como a fosforilação de resíduos de tirosina de certas proteínas na membrana plasmática do flagelo e da cabeça espermática contribuem para o aumento da afinidade espermática em relação à zona pelúcida (Pukazhenthil et al., 1998), para a hiperatividade (Nassar et al., 1999) e para a indução da reação acrossomal (Benoff, 1998), um pré-requisito para o processo de fertilização.

No plasma seminal bovino foi identificada uma família de proteínas denominada BSP (*Bovine Seminal Plasma*; PDC-109 – BSP-A1/-A2, BSP-A3 e BSP-30 kDa), que apresenta-se amplamente distribuída através das espécies mamíferas (Fan et al., 2006) e com funções importantes na capacitação espermática e no efluxo de fosfolipídeos e colesterol da membrana do gameta durante o trânsito pelo epidídimo (Thérien et al., 1998; 1999).

Após a ejaculação, estas proteínas recobrem a membrana do espermatozóide, interagem com lipoproteínas de alta densidade (HDL) e conseqüentemente levam ao seqüestro de fosfolipídeos e colesterol desta membrana, estimulando o primeiro efluxo de colesterol, necessário para o processo de capacitação. No trato reprodutor feminino, as HDL juntamente com fatores semelhantes à insulina induzem um segundo efluxo de colesterol, resultando nas modificações que completam a capacitação espermática (Thérien et al., 1998; 1999).

Outros componentes que participam ativamente da indução da capacitação espermática são íons cálcio, cujos níveis extracelulares elevados aceleram este processo (DasGupta et al., 1993); bicarbonato de sódio, que induz a redistribuição lateral do colesterol (Visconti et al., 1999); e albumina, que atua na extração dos lipídeos da membrana espermática (Flesch et al., 2001).

Além da capacitação espermática tornar o espermatozóide capaz de interagir e fertilizar o oócito, devido às diversas modificações de membrana ocorridas na cabeça espermática, resulta na hiperativação do espermatozóide. Espermatozóides hiperativados apresentam aumento da velocidade e redução da motilidade progressiva linear, com conseqüente aumento do deslocamento lateral de cabeça e encurtamento do comprimento de onda flagelar (Yanagimachi, 2006). Estas alterações da dinâmica flagelar, juntamente com a quimiotaxia espermática em resposta ao oócito e ao fluido folicular (Ralt et al., 1991) permitem a movimentação do espermatozóide ao longo do oviduto, a aproximação ao oócito e a conseqüente penetração através da zona pelúcida (Rathi et al., 2001).

1.6. O processo de fertilização

O processo de fertilização é o mecanismo celular pelo qual o material genético é passado, mediante os gametas, de uma geração para a outra, dando início ao desenvolvimento de um novo indivíduo (Primakoff e Myles, 2002).

Durante a fertilização, que tipicamente ocorre na ampola do oviduto, a cabeça do espermatozóide interage com três estruturas associadas ao oócito; a camada de células do *cumulus*, a zona pelúcida e o oolema. Estas interações são mediadas por proteínas

espermáticas de superfície e pelo acrossomo (Yanagimachi, 2006).

Em muitas espécies mamíferas, a penetração do espermatozóide através das camadas celulares do *cumulus oophorus*, que circundam o oócito, ocorre por ação mecânica, mediada pela hiperativação da motilidade e pela atividade hialuronidase da superfície do espermatozóide (Talbot et al., 2003). Esta atividade é principalmente exercida pela proteína PH-20, que está ancorada à superfície espermática por glicosilfosfatidilinositol (GPI) e permite a digestão parcial das células do *cumulus* (Lin et al., 1994).

A zona pelúcida é uma matriz extracelular especializada, sendo sintetizada e secretada pelo oócito. Ela é composta por três glicoproteínas, chamadas ZP1 (um dímero de 200 kDa), ZP2 (120 kDa) e ZP3 (83 kDa) (Bleil e Wassarman, 1980; Wassarman, 1988). A ligação do espermatozóide com esta matriz ocorre através da região anterior da cabeça espermática, onde está localizado o receptor para zona pelúcida, o receptor para ZP3 (Bleil e Wassarman, 1986).

A ligação espécie-específica que ocorre entre o espermatozóide e a zona pelúcida é mediada pela porção oligossacarídica da ZP3 (Chen et al., 1998; Kinloch et al., 1995). Esta glicoproteína estimula a transdução de sinais internos no espermatozóide, via proteína G, levando ao início da reação acrossomal (Ward et al., 1994).

O estímulo causado pela ZP3 resulta na despolarização da membrana espermática, com conseqüente ativação dos canais de cálcio e elevação intracelular deste íon, e ainda leva ao aumento do pH intracelular (Florman et al., 1998), necessário para a ocorrência da reação acrossomal.

O acrossomo é uma grande vesícula secretória que recobre o núcleo na região apical da cabeça do espermatozóide (Eddy, 2006; Yanagimachi, 2006). A membrana acrossomal é dividida em duas regiões distintas, a membrana interna que recobre o núcleo e a externa que faz contato com a membrana plasmática (Yanagimachi, 2006).

A reação acrossomal é caracterizada pela fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática que a recobre, resultando na formação de vesículas híbridas originárias de ambas as membranas (Abou-Haila e Tulsiani, 2000). Esta fusão de membranas resulta na perda do conteúdo acrossomal e na exposição da membrana

acrossomal interna (Cardullo e Florman, 1993; Abou-Haila e Tulsiani, 2000).

A exocitose de enzimas acrossomais, como serino-protease e acrosina, contribui para a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida e para a sua entrada no espaço perivitelino (Gadella et al., 2001).

Após o espermatozóide ter penetrado a zona pelúcida, ocorre o processo de ligação e fusão entre as membranas plasmáticas do espermatozóide e do oócito. O início desta fusão ocorre em regiões específicas de cada gameta, que contêm a maquinaria molecular relacionada a este evento (Yanagimachi, 2006).

A superfície do oócito é totalmente recoberta por microvilosidades, exceto na região próxima ao fuso meiótico. O processo de fusão é iniciado pelo pareamento do segmento equatorial da cabeça espermática (Yanagimachi, 2006) com a região de microvilosidades da membrana do oócito (Ebensperger e Barros, 1984), sendo este mediado pela interação entre proteínas específicas dos gametas, ou seja, entre os ligantes e seus receptores (Cho et al., 1998).

Várias proteínas espermáticas, principalmente as localizadas no segmento equatorial da cabeça do gameta, são candidatas a participarem na fusão espermatozóide-oócito.

A proteína DE (CRISP1) é uma das proteínas espermáticas de membrana mais estudadas. Ela pertence à família CRISP, que apresenta proteínas secretórias ricas em cisteína (Da Ros et al., 2004).

Esta proteína é produzida e secretada pelo epidídimo, sendo adsorvida à superfície dorsal da membrana espermática durante o trânsito pelo órgão (Kohane et al., 1980). Durante o processo de capacitação, ela migra para o segmento equatorial da cabeça do espermatozóide, local onde exercerá sua função na interação entre os gametas (Rochwerger e Cuasnicu, 1992).

Anticorpos anti-DE inibem a fusão da membrana do espermatozóide com o oolema (Cuasnicu et al., 1984). Além disso, estudo recente mostra outras funções desta proteína, como a participação nos estágios iniciais de interação do espermatozóide com a zona pelúcida (Busso et al., 2007).

Proteínas da família ADAM, que contém proteínas de membrana testículo-específicas, com um domínio desintegrina e metaloprotease estão envolvidas na adesão

celular e atividade protease (Yuan et al., 1997; Primakoff e Myles, 2000).

Alguns estudos demonstraram que anticorpos para proteína fertilina β (ADAM 2; Primakoff et al., 1987) e peptídeos do domínio desintegrina da proteína ciritestina (ADAM 3; Yuan et al., 1997) bloqueiam a adesão e fusão entre os gametas, mostrando que estas podem estar envolvidas nos estágios finais do processo de fertilização.

Outra evidência da participação de proteínas ADAM na fertilização foi obtida através da produção de camundongos *knockout* para fertilina β , que apresentam uma redução de 50% da capacidade de fusão dos seus espermatozóides com oócitos desprovidos de zona pelúcida (Cho et al., 1998).

A proteína fertilina β está localizada na região posterior da cabeça espermática e não no segmento equatorial (Hunnicut et al., 1997), como outras proteínas envolvidas na fertilização.

Outra proteína espermática recentemente descoberta é a IZUMO, uma proteína específica do testículo e do espermatozóide, da superfamília das imunoglobulinas. Esta proteína somente é exposta na superfície espermática após a reação acrossomal e sua localização não está limitada ao segmento equatorial (Inoue et al., 2005).

Camundongos *knockout* para a proteína IZUMO apresentam comportamento sexual e ejaculação normais, no entanto, produzem espermatozóides, que apesar de serem capazes de se ligarem e penetrarem a zona pelúcida, são incapazes de fundirem-se com o oócito. Esta proteína também foi identificada em espermatozóides humanos, que quando incubados com anticorpo anti-IZUMO passam a perder também a capacidade de penetrar a zona pelúcida (Inoue et al., 2005).

Apesar da proteína IZUMO estar correlacionada com a fusão espermatozóide-oócito, Hayasaka et al. (2007) encontraram, mediante análise imunocitoquímica, expressão positiva desta proteína em homens com infertilidade grave. Segundo estes pesquisadores, isto indica a dificuldade de prever a fertilidade através da avaliação isolada de fatores como motilidade, proteínas espermáticas de fusão ou outras moléculas, que participem no processo de fertilização.

A proteína espermática SP22 (Klinefelter et al., 1997), alvo do presente estudo, também tem se mostrado uma importante candidata na participação da interação

espermatozóide-oócito, devido à sua localização no segmento equatorial da cabeça espermática em diversas espécies mamíferas (Welch et al., 1998) e à inibição da fertilização *in vivo* e *in vitro* causada pela incubação de espermatozoides de rato e hamster com anticorpos anti-SP22 (Klinefelter et al., 2002b).

As principais proteínas presentes na superfície do oócito, que têm se mostrado essenciais para a interação entre os gametas são CD9 e CD81, membros da família tetraspanina e proteínas ancoradas à GPI (Coonrod et al., 1999).

As proteínas da família tetraspanina estão presentes em muitas espécies e têm importante papel na organização da membrana do oócito (Hemler, 2003; Rubinstein et al., 2006ab).

O papel da proteína CD9 na fusão espermatozóide-oócito tem sido estabelecido através da produção de camundongos *knockout* para este gene e da constatação de que estes animais geneticamente modificados apresentam fertilidade severamente reduzida (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000). Estudos *in vitro* mostram que o duplo *knockout* para as duas proteínas tetraspanina (CD9 e CD81) causa infertilidade, com mais de 95% de inibição da fertilização (Rubinstein et al., 2006b).

As integrinas presentes no oolema, especialmente integrina $\alpha_6\beta_1$, possível receptor para fertilina β , também vêm sendo investigadas quanto à participação no processo de fusão dos gametas (He et al., 2003; Miller et al., 2000).

Os estudos foram inicialmente encorajadores, devido à presença do domínio desintegrina nas proteínas da família ADAM da membrana espermática (Yuan et al., 1997). No entanto, não foram encontradas evidências convincentes do papel destes receptores na fusão dos gametas (He et al., 2003; Miller et al., 2000), já que estudos *in vitro* mostram que oócitos podem ser normalmente fertilizados na ausência da subunidade α_6 da integrina $\alpha_6\beta$ (Miller et al., 2000).

As reais interações moleculares entre as proteínas da membrana espermática e as proteínas do oolema, ainda estão longe de serem totalmente elucidadas. Os estudos têm sido focados principalmente na caracterização molecular destas proteínas e nas suas associações com proteínas vizinhas de membrana, bem como na descoberta da etapa de participação destas proteínas na fertilização (reconhecimento, interação inicial, ligação ou

fusão), para poder se chegar à identificação dos conjuntos ligantes-receptores na membrana de cada gameta (Evans, 2002; Rubinstein et al., 2006a).

Logo após o início da fusão dos gametas, grânulos de secreção presentes na região cortical do oócito são liberados no espaço perivitelino, modificando as características da zona pelúcida para prevenir a penetração de outros espermatozóides nesta matriz. A interação espermatozóide-oócito leva ao aumento intracelular da concentração de íons cálcio e à polimerização de filamentos de actina, tornando a membrana do oócito refratária a um segundo evento de fusão, ou seja, ocorre o bloqueio da poliespermia (Maleszewski et al., 1996; McAvey et al., 2002). A descondensação da cromatina paterna também ocorre neste estágio inicial da fusão (Yanagimachi, 2006).

Os eventos tardios deste processo compreendem a finalização da meiose materna (que estava parada na fase de metáfase II), levando à formação do óvulo e à liberação do segundo corpúsculo polar; a descondensação da cromatina materna e a formação dos pró-núcleos masculino e feminino, que se fundem, dando origem ao zigoto, que inicia o processo de clivagem (Yanagimachi, 2006).

1.7. Proteínas espermáticas em animais domésticos

O plasma seminal e a membrana do espermatozóide apresentam proteínas específicas que influenciam a fisiologia espermática e conseqüentemente a capacidade de fertilização. Estas proteínas podem ter origem testicular ou serem secretadas pelo epidídimo e posteriormente adsorvidas à membrana plasmática do espermatozóide durante o trânsito epididimário (Lin et al., 1994; Boué e Sullivan, 1996; Klinefelter et al., 1997; Da Ros et al., 2004; Barrios et al., 2005).

A presença de algumas proteínas espermáticas pode estar positiva ou negativamente correlacionada à fertilidade (Roncoletta et al., 2006). Estas proteínas influenciam diretamente o metabolismo espermático podendo afetar o controle dos mecanismos moleculares do transporte do gameta no trato reprodutor feminino, estabilizar componentes de membrana e suprimir a resposta imunológica contra o gameta, por mascarar antígenos expostos na superfície celular (Parrila et al., 2004; Strzezek et al.,

2005). Além disso, algumas destas proteínas participam da interação espermatozóide-oócito durante a fertilização (Cuasnicu et al., 1984; Inoue et al., 2005), previnem reação acrossomal precoce (Parrila et al., 2004; Strzezek et al., 2005) e protegem contra danos causados pelo *cold-shock* (Barrios et al., 2000; 2005).

Proteínas espermáticas relacionadas à fertilidade, vêm sendo estudadas em várias espécies domésticas, especialmente em bovinos, eqüinos e ovinos (Jobim et al., 2004; Sullivan, 2004; Jobim et al., 2005; Bergeron et al., 2005; Cardozo et al., 2006; Roncoletta et al., 2006). Estes estudos visam principalmente a identificação de marcadores que demonstrem o grau de viabilidade do sêmen e que indiquem possíveis danos causados ao potencial de fertilização pelos processos de resfriamento e congelamento. Entretanto, estudos sobre proteínas de membrana com conhecida participação no processo de interação espermatozóide-oócito em animais domésticos, especialmente em ovinos, são inexistentes.

Tem sido relatado que a identificação de proteínas espermáticas em eqüinos e bovinos leva à caracterização de sub-fertilidade e infertilidade do animal, bem como pode indicar melhores estratégias de criopreservação, visando manter a viabilidade seminal após o congelamento e descongelamento (Brandon et al., 1999; Sullivan, 2004).

Nos últimos anos, o perfil protéico do sêmen bovino vem sendo alvo de investigações, a fim de identificar e caracterizar proteínas espermáticas com potencial preditivo de fertilidade (Killian et al., 1993; Manjunath et al., 1993; Manjunath et al., 2002; Jobim et al., 2004; Sullivan, 2004; Roncoletta et al., 2006). Dentre as proteínas do plasma seminal bovino, destacam-se as pertencentes à família BSPs, uma família amplamente distribuída através das espécies mamíferas (Fan et al., 2006).

Quatro proteínas do plasma seminal, relacionadas à fertilidade, foram identificadas em bovinos Holstein por Killian et al. (1993). As proteínas, BSP26 e BSP55 (26 kDa, pI 6,2; 55 kDa, pI 4,5), foram predominantes em animais de alta fertilidade, enquanto duas proteínas com peso molecular de 16kDa e pontos isoelétricos distintos (6,7 e 4,1) ocorreram com maior frequência em animais de baixa fertilidade. A sequência de aminoácidos da proteína BSP55 revelou que esta apresenta 75% da sua constituição idêntica à glicoproteína prostaglandina D sintase tipo-lipocalina, que pode estar envolvida nos processos de desenvolvimento e maturação espermática (Gerena et al., 1998).

Análises realizadas por Roncoletta et al. (2006), em bovinos da raça Nelore, indicaram a presença predominante de uma proteína de membrana denominada SM239 em animais com alta fertilidade. Esta proteína apresenta 93% de homologia com a proteína aSFP, que inibe atividade mitocondrial e metabolismo do espermatozóide, reduzindo a produção de radicais livres e o processo oxidativo na célula, mantendo sua viabilidade (Schöneck et al., 1996). Nos animais de fertilidade reduzida foi identificada a proteína SM244 homóloga (89%) a proteína BSP-A3, que em altas concentrações desestabiliza a membrana do espermatozóide por induzir o efluxo de colesterol e fosfolípidos de membrana durante a capacitação (Thérien et al., 1998; Thérien et al., 1999; Manjunath et al., 2002), reduzindo a capacidade fertilizante e a resistência ao resfriamento (Manjunath et al., 2002).

Segundo Bergeron et al. (2005), as principais proteínas do plasma seminal ovino são espermadensina (15,5 kDa), relacionada à interação do espermatozóide com o epitélio do oviduto e com a zona pelúcida, e as proteínas da família BSP (RSP - 15kDa, RSP - 16kDa, RSP - 22kDa), que apresentam importante papel na capacitação espermática (Thérien et al., 1998, 1999).

A análise do perfil protéico do plasma seminal de carneiros Rasa aragonesa realizada por Cardozo et al. (2006) através de eletroforese bidimensional, detectou a presença de 252 proteínas, com pontos isoelétricos entre 4,2 e 7,6 e pesos moleculares entre 12,5 e 83,9 kDa. A comparação da expressão destas proteínas com parâmetros seminais durante as estações do ano mostrou que existem proteínas positiva e negativamente correlacionadas com a motilidade, concentração e integridade da membrana espermática.

Trabalho de Jobim et al. (2005) analisou o perfil protéico do plasma seminal de carneiros (Hampshire Down, Corriedale x Texel) e constatou a presença de 21 proteínas com peso molecular entre 15 e 115 kDa e ponto isoelétrico entre 3,2 e 8,7. Destas, duas apresentaram similaridade com as proteínas BSP-A1/A2, que potencializam a capacitação espermática (Thérien et al., 1998, 1999).

Estudos realizados por Barrios et al. (2000, 2005) demonstraram que a adsorção de proteínas do plasma seminal à membrana plasmática do espermatozóide ovino reduz os danos normalmente causados à membrana do gameta, pelo processo de resfriamento,

promovendo um efeito protetor altamente específico (García-López et al., 1996). Este efeito protetor é extremamente importante, visto que o espermatozóide ovino é muito sensível ao estresse causado pelo congelamento e sua membrana é mais vulnerável à desestabilização e conseqüentemente a alterações funcionais que a de gametas de outras espécies (Holt e North, 1984; Fiser e Fairfull, 1989).

Barrios et al. (2005) demonstraram que as proteínas P14 e P20, do sêmen de carneiros Rasa aragonesa, estabilizam a membrana espermática, contribuem para a regulação do processo de capacitação no trato reprodutor feminino, da reação acrossomal e da motilidade, tendo uma participação importante na capacidade de fertilização e na proteção contra os danos causados por *cold-shock*.

1.8. Proteína espermática SP22

Vários autores (Killian et al., 1993; Klinefelter et al., 1997; Brandon et al., 1999; Welch et al., 1998; Klinefelter et al., 2002b; Jobim et al., 2005; Roncoletta et al., 2006) têm demonstrado o potencial de proteínas espermáticas de membrana ou pertencentes ao plasma seminal como biomarcadores de fertilidade masculina em mamíferos.

Uma dessas proteínas é a SP22, uma proteína de membrana espermática, que foi primeiramente identificada em tecido reprodutivo de ratos por Klinefelter et al. (1997), em um estudo de toxicologia.

Neste estudo foi avaliado o potencial de toxicidade epididimária dos agentes, etano dimetanosulfonato, cloroetilmetanosulfonato e epícloridrin. Vários parâmetros de qualidade espermática foram avaliados, no entanto, somente dois foram significativamente correlacionados com a fertilidade dos animais, os níveis de testosterona no segmento cabeça/corpo do epidídimo e uma proteína de membrana dos espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo. Esta proteína foi então, nomeada SP22 (*Sperm Protein*, 22 kDa; Klinefelter et al., 1997).

A partir desta descoberta (Klinefelter et al., 1997), foram realizados vários estudos a fim de caracterizar a molécula da SP22 e de identificar a função da nova proteína (Welch et al., 1998; Klinefelter e Welch, 1999; Klinefelter et al., 2002b; Kaydos et al., 2004).

A proteína SP22 é ácida, apresenta um ponto isoelétrico de 5,5 e um peso molecular de 22 kDa em gel de acrilamida a 11% (Klinefelter et al., 1997) e de 28 kDa em gel com 14% de concentração (Welch et al., 1998).

O seqüenciamento dos aminoácidos da proteína e a análise de degradação de Edman indicaram que ela é constituída por cinco seqüências peptídicas. Além disso, o seqüenciamento de nucleotídeos revelou que o gene da SP22 apresenta três seqüências de cDNA (SP22A, SP22B e SP22C), com regiões 5' não-traduzidas diferentes. Enquanto, SP22A e SP22B codificam a mesma seqüência de aminoácidos (189 resíduos), o cDNA SP22C codifica pelo menos uma seqüência adicional de 13 aminoácidos na região amino-terminal (202 resíduos) (Welch et al., 1998).

As seqüências peptídicas e de cDNA da SP22 indicam que ela é membro de uma família de genes altamente conservada e amplamente expressa em diferentes organismos, já que apresenta 90% de similaridade com a proteína humana DJ-1 e 40% com a proteína thiJ presente em *Escherichia coli* (Welch et al. 1998).

A seqüência de aminoácidos da SP22 (Klinefelter e Welch, 1999) revelou que ela é idêntica a proteína associada à contracepção CAP1 (23-25 kDa, pI 5,8) identificada por Wagenfeld et al. (1998) e homóloga à proteína associada a microtúbulos RS (20 kDa) identificada por Hod et al. (1999). CAP1 e RS são proteínas encontradas em vários tecidos e apresentam uma alta expressão em espermatozóides. Esta é encontrada predominantemente no flagelo ou na cabeça do gameta dependendo da espécie (Whyard et al., 2000), enquanto aquela é especificamente localizada no segmento equatorial da cabeça do espermatozóide e na gota citoplasmática (Wagenfeld et al., 2000).

Foi detectado em ratos a presença de mRNA da SP22 de 1,0 kb em diferentes órgãos como coração, cérebro, fígado, rim e vesícula seminal. No entanto, nos testículos foi também identificado um transcrito adicional de 1,5 kb, além de maior abundância de mRNA de 1,0 kb em comparação aos demais tecidos somáticos, indicando uma maior expressão da proteína no tecido gonadal. Em ratos jovens ocorre um aumento do transcrito de 1,0 kb entre os dias 6 e 33 do ciclo espermato gênico, enquanto o mRNA de 1,5 kb é detectado nos testículos a partir do dia 23 (Welch et al., 1998).

O gene da SP22 é inicialmente transcrito em espermatócitos em paquíteno (Welch et

al., 1998) e a tradução do mRNA da SP22 iniciada em espermátides em estágio VI (Klinefelter et al., 2002b), indicando a origem testicular da proteína.

Análise de imunomarcação da SP22 com anticorpos anti-rSP22 em testículo de rato demonstrou que a expressão da proteína é dependente do estágio do ciclo espermatogênico (Klinefelter et al., 2002b). Nos estágios I - V e VIII, a expressão é heterogênea em espermátides arredondadas e homogênea em espermátides alongadas. Já nos estágios VI e VII, a expressão é homogênea em ambas, espermátides arredondadas e alongadas, e nos estágios IX – XIV há expressão homogênea em espermátides em alongamento (Klinefelter et al., 2002b).

Segundo Klinefelter et al. (2002b), durante o desenvolvimento e maturação dos espermatozóides de rato ocorrem modificações na localização da proteína SP22, entretanto os mecanismos desta mudança de expressão são ainda desconhecidos.

Em espermátides alongadas a proteína SP22 encontra-se distribuída por toda a região da cabeça, porém com a aproximação da espermição ela migra predominantemente para a gota citoplasmática e em menor proporção para o flagelo, onde permanece até os espermatozóides chegarem à rede testicular. Ao passarem para a cabeça do epidídimo, os espermatozóides apresentam SP22 distribuída pela cabeça e ocasionalmente no colo. Somente quando os espermatozóides terminam a sua maturação e chegam à cauda epididimária, a SP22 adquire sua localização característica (Klinefelter et al., 2002b) no segmento equatorial da cabeça espermática (Welch et al., 1998; Klinefelter et al., 2002b).

Esta localização apresenta uniformidade entre diversas espécies como rato, hamster, coelho, bovinos, humanos (Klinefelter et al., 2002b) e eqüinos (dado não publicado) e sugere a participação da proteína na interação espermatozóide-oócito durante o processo de fertilização, sendo provavelmente um fator facilitador da ação enzimática da proteína.

Resultados preliminares do nosso laboratório indicaram que a proteína SP22 está localizada na cabeça e na peça intermediária de espermatozóides de codorna japonesa (*Coturnix japonica*). Esta foi a primeira identificação da proteína em aves (Yamato et al., 2007).

Durante o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo, além de ocorrer translocação da proteína SP22, ocorre um aumento da sua expressão, provavelmente devido

à estabilidade promovida pela interação da proteína com as secreções do epitélio epididimário (Klinefelter et al., 2002b). Por isso, agentes tóxicos ao epidídimo levam à redução nos níveis da proteína (Klinefelter et al., 1997).

A localização celular da proteína SP22 também é específica no epidídimo, sendo evidenciada no lúmen, devido aos espermatozóides presentes; nas células claras e nos lisossomos do citoplasma supranuclear de células principais (Klinefelter et al., 2002b). A presença de SP22 nas células claras e nos lisossomos de células principais provavelmente é decorrente da absorção de SP22 luminal pelo epitélio do epidídimo (Klinefelter et al., 2002b), já que este órgão não secreta esta proteína (Wagenfeld et al., 1998). Além disso, a presença de SP22 nas células claras pode ser explicada pela fagocitose de restos da gota citoplasmática, que representa um reservatório para a SP22 (Klinefelter et al., 2002b).

Foi demonstrado que anticorpos para a proteína SP22 inibem significativamente a capacidade de fertilização de espermatozóides, *in vivo* e *in vitro*. A inibição da fertilização *in vitro* ocorre usando-se oócitos com zona pelúcida intacta e também na ausência de zona pelúcida, sugerindo a participação da SP22 em ambos os estágios de fertilização, penetração da zona pelúcida e fusão com o oolema (Klinefelter et al., 2002b).

Várias investigações têm constatado a alta capacidade da proteína SP22 como biomarcador de fertilidade, visto que esta proteína tem sido altamente correlacionada com a fertilidade avaliada *in vivo* e *in vitro* (Welch et al., 1998; Klinefelter e Welch, 1999; Klinefelter et al., 2002a; Klinefelter et al., 2002b; Klinefelter et al., 2004; Kaydos et al., 2004; Veeramachaneni et al., 2007).

Além de detectar alterações causadas à maturação espermática pela exposição a agentes tóxicos (Klinefelter et al., 1997), a quantificação da proteína SP22, também traz informações importantes a respeito do processo espermatogênico (Kaydos et al., 2004), devido a sua origem testicular (Welch et al., 1998).

Haloácidos, como os ácidos dibromoacético (DBA) e bromocloroacético (BCA), formados durante o processo de desinfecção da água, além de afetarem a espermatogênese do rato, causando principalmente alterações na espermiogênese com conseqüente atraso da espermiacção (Klinefelter et al., 2002a), reduzem os níveis de SP22 no parênquima testicular e nos espermatozóides (Kaydos et al., 2004). Esta redução detectada por imunomarcacção da

proteína, eletroforese bidimensional e ELISA é significativamente correlacionada com a taxa de fertilidade obtida por inseminação *in utero* dos animais tratados (Kaydos et al., 2004).

Em coelhos foi demonstrado que a exposição crônica a baixas doses de DBA leva à redução significativa das taxas de fertilidade avaliadas por inseminação artificial e dos níveis de SP22 analisados por ELISA (Veeramachaneni et al., 2007).

Até o momento, somente um estudo foi realizado tentando correlacionar a SP22 com a fertilidade de animais domésticos. Neste estudo foi demonstrado que bovinos com alto potencial de fertilidade tendem a ter maiores níveis de expressão da proteína SP22, na análise de imunomarcagem de espermatozóides usando anticorpo anti-rSP22, do que aqueles com menor capacidade fértil (Klinefelter e Welch, 1999). No entanto, não existem estudos que correlacionem a quantidade da proteína com parâmetros espermáticos normalmente utilizados para avaliação de fertilidade em animais domésticos.

1.9. Avaliação do sêmen

Predizer a qualidade do sêmen de animais domésticos, especialmente animais de produção, como os ovinos, é extremamente importante para a seleção de reprodutores em programas de inseminação artificial e de monta natural ou controlada, garantindo um eficiente manejo reprodutivo, com conseqüente melhoria de produção do rebanho.

Existem diversos fatores estruturais, moleculares e funcionais envolvidos no processo de fertilização, bem como a necessidade de vários atributos aos espermatozóides, para que consigam fertilizar o oócito, dando início ao desenvolvimento embrionário (Graham et al., 1990; Yanagimachi, 2006).

A análise seminal clássica continua sendo fundamental para a avaliação da qualidade do sêmen (Amann e Hammerstedt, 1993; Guzick et al., 2001). Entretanto, se os parâmetros forem avaliados isoladamente podem apresentar uma capacidade limitada de indicação do potencial reprodutivo e levar a resultados, que embora auxiliem na avaliação do sêmen, podem não apresentar alta correlação com os índices de fertilidade observados *in vivo* (Amann e Hammerstedt, 1993; Popwell e Flowers, 2004).

Assim, para se obter uma avaliação mais eficiente do potencial de fertilidade, é necessária a associação de vários parâmetros seminais clássicos, bem como a avaliação de parâmetros funcionais (Amann e Hammerstedt, 1993; Holt et al., 1997; Söderquist et al., 1997; Zhang et al., 1998; Colenbrander et al., 2003; Hallap et al., 2006).

A dificuldade de prever a capacidade de fertilização dos espermatozoides torna fundamental a descoberta de novas técnicas de avaliação *in vitro*, como por exemplo, a análise de proteínas biomarcadoras de fertilidade, que complementem os métodos já utilizados, obtendo-se um diagnóstico do potencial de fertilidade mais apurado e eficiente, que consiga se aproximar ao máximo dos resultados obtidos *in vivo*.

Na análise padrão do sêmen, em animais domésticos, normalmente são avaliados, concentração (Bielsa et al., 1994), morfologia (Rogers et al., 1983), motilidade (Kjaestad et al., 1993; Holt et al., 1997), presença de acrossomo intacto e integridade de membrana espermática (Pérez et al., 1997). No entanto, diversos outros métodos têm sido utilizados para avaliar o sêmen, como análise computadorizada das características da cinética espermática (Hallap et al., 2006), teste hiposmótico, teste de capacitação e reação acrossomal, avaliação da exposição de receptores de progesterona (Colenbrander et al., 2003), avaliação da estrutura da cromatina (Januskauskas et al., 2003), teste de ligação espermatozoide-zona pelúcida (Zhang et al., 1998) e avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial através de sondas fluorescentes (Söderquist et al., 1997; Sousa, 2007).

Além da análise seminal, características físicas dos órgãos reprodutores são necessárias para avaliação da fertilidade de um animal. A análise biométrica testicular é extremamente importante para a avaliação da fertilidade de reprodutores, já que este parâmetro é significativamente correlacionado com a atividade reprodutiva do macho (El-Wishy e El-Sawaf, 1971).

A circunferência escrotal pode estar correlacionada à qualidade seminal e produção espermática. Em ovinos, este parâmetro pode estar geneticamente correlacionado ao volume ejaculado, motilidade massal, motilidade individual, concentração espermática e proporção de espermatozoides morfologicamente anormais, sendo esta correlação idade-dependente (Rege et al., 2000).

Apesar do exame morfológico ser rotineiramente utilizado para avaliar o potencial de fertilidade do sêmen, juntamente com outros parâmetros andrológicos, sua correlação com a capacidade fertilizante do gameta é espécie-dependente e algumas vezes controversa (Jasko et al., 1992; Rodríguez-Martínez et al., 1997; Guzick et al., 2001; Lavara et al., 2005; Kuisma et al., 2006).

Em humanos, a morfologia espermática é o parâmetro mais correlacionado à fertilidade, provendo importantes informações para o diagnóstico de infertilidade masculina (Guzick et al., 2001).

Em bovinos e eqüinos, o aumento de formas patológicas no ejaculado pode estar associado à redução do potencial de fertilidade (Jasko et al., 1990; 1992; Correa et al., 1997). No entanto, alguns estudos mostram que a morfologia espermática não está significativamente correlacionada à fertilidade nestas espécies (Rodríguez-Martínez et al., 1997; Kuisma et al., 2006) e que somente percentagem de espermatozóides anormais acima de 20% pode influenciar a capacidade reprodutiva de um animal (Ax et al., 2004).

A integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da funcionalidade espermática e um requisito fundamental para a capacitação, reação acrossomal e interação espermatozóide-oócito, exercendo importante papel no sucesso do processo de fertilização (Cardozo et al., 2006).

A viabilidade da célula espermática, expressa pelo número de espermatozóides vivos e a porcentagem de gametas com membrana plasmática íntegra, tem se mostrado significativamente correlacionada com a fertilidade, sendo que distúrbios na espermatogênese que afetem a estrutura cromatínica, também podem comprometer a membrana plasmática do gameta, levando ao seu rompimento (Januskauskas et al., 2003).

Diversas sondas fluorescentes têm sido empregadas para acessar a integridade das membranas espermáticas, tais como diacetato de carboxifluoresceína/iodeto de propídio (CFDA/PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), rodamina 123 e JC-1 (Söderquist et al., 1997; Celeghini, 2005; Kuisma et al., 2006; Sousa, 2007).

Segundo Haugland (1996) a análise da integridade de membrana por sondas fluorescentes traz informações importantes a respeito das mudanças metabólicas do

espermatozóide, podendo ser um indicador sensível e específico de oxidação/redução, ionização e estado de ligação de moléculas da membrana plasmática.

A motilidade espermática é considerada uma manifestação da estrutura e funcionalidade do espermatozóide, e a motilidade progressiva é geralmente correlacionada com a integridade de membrana e com a morfologia espermática normal (Peña, 2004). No entanto, estudos mostram que os resultados obtidos através da análise subjetiva da motilidade podem apresentar grande variabilidade, (Rijsselaere et al., 2003) e em algumas espécies, não serem altamente correlacionados à fertilidade (Januskauskas et al., 1996).

Isto ocorre principalmente na análise de amostras com alta concentração espermática, na qual há a tendência de se subestimar a porcentagem de espermatozoides móveis, obtendo-se uma estimativa comparativa ao invés de uma mensuração absoluta (Garner et al., 1997).

Para tentar minimizar estes problemas encontrados na avaliação convencional da motilidade, diversos sistemas de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) têm sido propostos e aplicados para o incremento do estudo andrológico (Verstegen et al., 2002; Hallap et al., 2006).

A avaliação da cinética espermática através de sistemas computadorizados tem sido reportada como um eficiente método de análise laboratorial do potencial relativo de fertilidade de espermatozoides em várias espécies (Budworth et al., 1988; Jasko et al., 1992; Zhang et al., 1998; Hallap et al., 2006). Isto devido ao seu alto grau de precisão e reprodutibilidade, que leva ao estudo detalhado e rápido da motilidade total, progressiva e das trajetórias espermáticas individuais (Sousa, 2007).

Dentre os parâmetros cinético-espermáticos avaliados por sistemas computadorizados destacam-se (Mortimer, 1997; Verstegen et al., 2002; Amann et al., 2006; Sousa, 2007): TMOT (Motilidade total, %), MP (Motilidade progressiva, %), VAP (Velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática ou velocidade de trajeto, $\mu\text{m/s}$), VSL (Velocidade retilínea considerando-se a trajetória espermática como uma reta ou velocidade progressiva, $\mu\text{m/s}$), VCL (Velocidade de deslocamento real dos espermatozoides ou velocidade curvilinear, $\mu\text{m/s}$), ALH (Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, μm), BCF (Frequência de

batimento flagelar, Hz), STR (Retilinearidade, %) e LIN (Linearidade, %).

Hallap et al. (2006) mostraram que os parâmetros cinéticos VAP, TMOT e LIN estão significativamente correlacionados com a fertilidade de espermatozóides bovinos selecionados por *swim-up*. Porém, Januskauskas et al. (2003) observaram em sêmen bovino criopreservado correlação significativa da fertilidade somente com a porcentagem total de células móveis, mas não com outras características cinéticas analisadas.

Devido à alta heterogeneidade do sêmen ejaculado de mamíferos (Amann e Hammerstedt, 1993), recentemente tem sido proposta uma nova forma de avaliar os parâmetros cinético-espermáticos obtidos por sistemas computadorizados (Abaigar et al., 2001; Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2004; Núñez-Martínez et al., 2006).

A avaliação clássica da cinética espermática considera somente as médias de cada parâmetro obtido pelos sistemas computadorizados. No entanto, tem sido relatado que esta forma de avaliação gera pouca informação biológica sobre a real qualidade móvel de um ejaculado, já que as médias obtidas são acompanhadas por altos desvios-padrão, devido à coexistência de sub-populações de espermatozóides no sêmen (Mortimer, 1997; Verstegen et al., 2002; Núñez-Martínez et al., 2006).

A análise dos valores médios dos parâmetros de motilidade pode mascarar o real efeito dos procedimentos de congelação e descongelação do sêmen. Estes podem afetar sub-populações espermáticas específicas, sem que haja alteração na média dos parâmetros de motilidade (Núñez-Martínez et al., 2006).

Este problema pode ser solucionado através da análise da motilidade e da trajetória de cada espermatozóide avaliado pelo sistema CASA. A partir destes valores individuais e da utilização de análise estatística multivariada é possível identificar as diferentes sub-populações existentes no sêmen de um animal. Esta avaliação permite um alto grau de sofisticação dos dados obtidos, gerando informações mais apuradas a respeito da qualidade cinética do ejaculado (Abaigar et al., 2001; Quintero-Moreno et al., 2003; Quintero-Moreno et al., 2004; Núñez-Martínez et al., 2006; Sousa, 2007).

Vários estudos têm sido baseados nesta nova forma de avaliação do movimento espermático, levando à identificação de sub-populações no sêmen de várias espécies como,

gazelas (Abaigar et al., 2001), garanhões (Quintero-Moreno et al., 2003), cachacos (Quintero-Moreno et al., 2004), cães (Núñez-Martínez et al., 2006) e carneiros (Sousa, 2007).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA TEMÁTICA

Vários estudos com a proteína SP22 têm demonstrado o seu alto potencial como biomarcador de fertilidade e por isso pesquisas, que visem o aprimoramento e a validação de técnicas de identificação e quantificação desta proteína nas várias espécies animais, contribuem para um maior conhecimento a respeito do marcador e conseqüentemente para seu estabelecimento como um método diagnóstico de fertilidade masculina complementar, relativamente rápido, fácil e com alta reprodutibilidade.

Apesar de terem sido encontrados vários estudos relacionados à identificação e caracterização de marcadores de fertilidade em animais domésticos, foram poucos aqueles realizados com a espécie ovina. Destes, a grande maioria está relacionada à identificação de proteínas homólogas ou idênticas a proteínas bem estudadas do plasma seminal bovino (BSPs), que já apresentam sua capacidade como biomarcadores de fertilidade testada, assim como, alguns de seus aspectos funcionais conhecidos. Estes trabalhos limitam-se à identificação de marcadores conhecidos, não havendo estudos quantitativos, que correlacionem os níveis protéicos com os diferentes graus de fertilidade, ou seja, com diferentes parâmetros espermáticos, o que levaria a um diagnóstico mais detalhado da capacidade reprodutiva. Além disso, este é o primeiro trabalho que investiga a presença e a quantificação da proteína espermática SP22 na espécie ovina.

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram identificar e imunolocalizar a proteína espermática SP22 em espermatozóide ovino e verificar a eficiência das técnicas de ELISA

e imunocitoquímica para quantificação desta proteína nos espermatozóides de carneiros. Além disso, o estudo pretendeu correlacionar os níveis de SP22 com parâmetros espermáticos de cinética, analisada por sistema computadorizado (CASA), morfologia e integridade de membrana avaliada por sondas fluorescentes, visando verificar a atuação da proteína como um possível biomarcador de fertilidade nesta espécie.

4. CAPÍTULO

O presente estudo deu origem ao artigo “Immunolocalization and quantification of the SP22 protein on ovine sperm and its relationship to other sperm parameters”, que deverá ser submetido ao periódico “Theriogenology”.

**Immunolocalization and quantification of the SP22 protein on ovine sperm and its
relationship to other sperm parameters**

Running title: SP22 on ram sperm

Ana Paula A. Favareto¹, Leandro Rodello², César A. Taconeli³, Sony D. Bicudo², Gary R. Klinefelter⁴ and Wilma G. Kempinas^{5*}

¹Program of Cellular and Structural Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. ²Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Zootechny, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil. ³Department of Biostatistics, São Paulo State University (UNESP), Bioscience Institute, Botucatu, SP, Brazil. ⁴US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Reproductive Toxicology Division, Research Triangle Park, North Carolina, United States. ⁵Department of Morphology, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Caixa Postal 510, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 14 3811 6264; fax: +55 14 3811 6264. *E-mail address:* kempinas@ibb.unesp.br (W.G. Kempinas).

Abstract

The goals of this study were to identify and to quantify the SP22 protein on spermatozoa from adult rams (Dorper and Santa Inês breeds), and to correlate its levels to morphological and kinematics parameters. SP22 was specifically located on the equatorial segment of the head and neck of the ram spermatozoon. SP22 on ram sperm were effectively quantified by both ELISA and FITC immunostaining and the two methods were significantly correlated ($R^2 = 0.70$). There was no significant difference in SP22 levels assessed by these two methods between the studied breeds. Clustering analysis of motility parameters obtained by CASA system was used to establish that 3 distinct kinematics subpopulations with different vigor and progressiveness coexistent within ejaculate. While there were significant differences in the distribution of the 3 subpopulations in the rams, there was no significant correlation between the proportion of each subpopulation in the rams and the SP22 levels. Quantification of SP22 immunostaining intensity was not correlated with any of the sperm parameters. However, SP22 levels obtained by ELISA were negatively correlated with morphological abnormalities and positively correlated with membrane integrity (3 variable $R^2 = 0.47$). These results show that study of SP22 on ram sperm can bring important information about the reproductive capacity of these animals. Nevertheless, studies that correlate the SP22 levels with in vivo and/or in vitro fertility rate are necessary for validation of this protein as a fertility biomarker in this species.

Keywords: SP22 protein, spermatozoon, ram, computer-assisted semen analysis (CASA).

Introduction

The prediction of the fertility potential of semen in domestic animals is extremely important to attain an efficient reproductive handling. Clinical examinations and standard semen analysis assays including sperm concentration, morphology and motility are routinely used for fertility evaluation of breeders [1-4]. However, although these parameters provide information about testicular function [5], they have limited predictive capacity of the reproductive status, with modest or no significant correlations to *in vivo* fertility rate [6-9]

The physiological complexity of the spermatozoon and the consequential difficulty to predict its fertilizing ability [6] have encouraged the development and use of predictive assays based on sperm function. These include: computer-assisted semen analysis (CASA) [10-12], membrane integrity assessed by fluorescent probes [13], sperm chromatin structure assay [14,15], evaluation of oxidative stress biomarkers [15] and analysis of specific sperm proteins [16-18].

Sperm membrane and semen plasma proteins play a pivotal role in the spermatozoal metabolism and function. These proteins are involved in the capacitation process, preventing early acrosomal reaction [17] and cold-shock damage [16,17], and spermatozoon-oocyte interaction during the fertilization process [19,20]. As such, several sperm proteins have been investigated and significantly correlated with fertility potential in domestic animals [18,21-23].

The sperm membrane protein referred to as SP22 has been highly correlated with the fertility, specially in reproductive toxicology studies [24-29]. This protein has testicular origin [30] and undergoes translocation to the equatorial segment of the head, and increases

in expression during the epididymal transit, probably due to the interaction of the spermatozoa with proteins secreted by this organ [26].

The location of the SP22 protein on the spermatozoon, and the inhibition of *in vivo* and *in vitro* fertilization following incubation of cauda epididymal sperm with anti-SP22 antibodies suggest participation of this protein in spermatozoon-oocyte interaction [26].

Thereby, the goals of the current study were as follows: 1) to investigate the presence and the location of SP22 in ram spermatozoa; 2) to quantify SP22 on ram spermatozoa by ELISA and FITC immunostaining analyses using affinity-purified anti-rSP22 antibody, and; 3) to correlate SP22 concentration with sperm morphology, plasma membrane integrity, and sperm kinematics subpopulations.

Materials and Methods

Semen collection

Multiple-farm source purebred rams (*Ovis aries*) Dorper ($n = 08$) and Santa Inês ($n = 10$), ranging from 11 to 34 months of age, were maintained at the Laboratory of the Studies in Applied Biotechnology to Ovine and Caprine Reproduction of the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil (22° 53'S; 48° 29'W) under uniform nutritional conditions.

Rams were subjected to a physical examination and palpation of the scrotum and its contents, and their scrotal circumferences were measured.

Semen was collected by an artificial vagina between January and July 2007. The study was approved by the Ethics in Animal Experimentation Committee of the Bioscience Institute of Botucatu, São Paulo State University, Brazil (45/06-CEEA).

Semen processing

Immediately after semen collection, semen volume was evaluated. An aliquot of semen was used to measure concentration, motility, morphological characteristics of spermatozoa and for membrane integrity determination.

Semen samples were processed for ELISA assay. For this, 400 µL of fresh semen, was added to a 15 mL centrifuge tube and 1 mL of Sperm Isolation Buffer [SIB = 95mL/L 10X Hanks Balanced Salts Solution (HBSS), 0.35g/L NaHCO₃, 4.2g/L HEPES, 0.9g/L glucose, 10mL/L Na pyruvate and 25mg/L trypsin inhibitor from soybean, pH 7.4] was put gently on top. After 10 minutes, the sperm that swam out into the overlay buffer were removed, transferred to another centrifuge tube and were centrifuged (145 x g, 4°C, 5 min). The sperm pellet was washed twice more (145 x g, 4°C, 5min), completing the volume to 12 mL of SIB. Sperm membrane proteins were extracted for 1h at room temperature with 1 mL of 80 mM n-octyl-B-glucopyranoside (Calbiochem, Inc., B69413, La Jolla, Ca) in 10 mM Tris, pH 7.2, containing freshly-added 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 35 mg/mL DMSO; Sigma-Aldrich, Inc., P7626, St Louis, USA). Following final centrifugation (380 x g, 4°C, 5 min), the supernatant was removed, frozen in liquid nitrogen and held at -80°C until ELISA analysis.

Semen parameters

Sperm motility characteristics were evaluated by manual and computer-assisted methods. Subjective sperm motility (MOT, range 0-100%) and vigor (scored on a scale of 0-5) were performed by the same person throughout the study and were assessed by visual estimation under a phase-contrast microscope at 200X magnification. For this, the fresh

semen was diluted in X-Cell® (IMV, France) and was put on a warmed slide (37°C), and a coverslip was applied. A computer assisted sperm analyzer (HTM-IVOS, version 12, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) was used to assess other sperm motility parameters. The sperm analyzer was set-up (Technical Guide, Hamilton Thorne Biosciences, chapter 2: Starting parameters for various species - ram, 2005) as follows: phase contrast; frame rate – 60 Hz; minimum contrast – 60; minimum cell size – 5 pixels; path velocity – 75 μ /s; straightness – 80%; default cell size – 5 pixels; default cell intensity – 55; VAP cutoff – 21.9 μ /s; VSL cutoff – 6 μ /s; magnification – 1.89. Warmed Makler counting chamber (Sefi-Medical, Haifa, Israel) was loaded with approximately 6 μ L of diluted semen (48×10^6 sperm mL^{-1}) [31] and was observed at 400X magnification at 37°C. Sperm motility parameters were estimated from 3 fields per animal, selected automatically. Results were expressed by mean of analyzed fields. Sperm motility parameters evaluated were TMOT – Total Motility (%); PROG – Progressive Motility (%); VAP – Average Path Velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL – Straight Line Velocity ($\mu\text{m/s}$); VCL – Curvilinear Velocity ($\mu\text{m/s}$); ALH – Amplitude of Lateral Head Displacement (μm); BCF – Beat Cross Frequency (Hz); STR – Straightness ($\text{VSL/VAP} \times 100, \%$); LIN – Linearity ($\text{VSL/VCL} \times 100, \%$); ELONG – Elongation; SIZE (μm^2); RAPID – Rapid Cells (%); MEDIUM – Medium Velocity Cells (%); SLOW – Slow Cells (%). The individual trajectories (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR and LIN) of each spermatozoon from 18 rams (1 ejaculate per animal, 3847 cells) also were evaluated to identify subpopulations of sperm based on cluster analyses of individual motion parameters that constituted the semen samples. For this, only the kinematics trajectories analyzed in the last field were considered.

Sperm concentration (10^9 sperm mL^{-1}) was analyzed using Neubauer chamber in phase-contrast microscopy (Olympus BX-40, Tokyo, Japan), in duplicate, after semen dilution in distilled water (1:400). Sperm production (10^9 sperm) was calculated as the product of sperm concentration and ejaculated volume.

Sperm morphology evaluation was performed in humid preparations. Semen aliquot (10 μL) was added to PBS + 0.2% glutaraldehyde [32], and analyzed in phase-contrast microscopy, according to Blom [33] at 1000X magnification under oil immersion. Two hundred cells were examined to determine percentages of major, minor and total defects.

Sperm plasma membrane integrity was assessed using carboxyfluorescein diacetate (CFDA; Sigma-Aldrich, Inc., P4170, St Louis, USA) and propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, Inc., C5041, St Louis, USA) fluorescent probes according to the method Harrison and Vickers [34] adapted to Zúccari (C.E.S.N. Zúccari, Doctoral thesis, São Paulo State University, Botucatu, 1998). Work solution consisting of 20 μL of CFDA stock solution (0.46 mg CFDA in 1 mL of DMSO), 10 μL of PI stock solution (0.5 mg PI in 1 mL of 0.9% NaCl solution), 10 μL of buffered saline formol and 960 μL Na citrate stock solution (3 mg Na citrate in 1 mL of 0.9% NaCl solution) was added to 10 μL of fresh semen, and incubated in the dark for 30 minutes at room temperature. A 5 μL drop was placed on a slide and overlaid with a coverslip. One hundred spermatozoa per animal were counted in fluorescence microscope (Leica DM LB, Germany) equipped with epifluorescence UV illumination (excitation filter set 450-490 nm, dichromatic mirror 510 nm and suppression filter set 515 nm) at 400X magnification using a fluorescein filter set. Spermatozoa were considered intact when stained green by CFDA throughout their length and unstained with PI, and were classified as damaged when only partly or not stained with CFDA and stained

red with PI. The proportion of intact cells was determined by the % of sperm stained green and without red staining. The proportion of damaged cells was determined by the % of sperm stained red.

Immunocytochemistry

An aliquot of 400 μ L of fresh semen was added to a 15 mL centrifuge tube and 1 mL of SIB was put gently on top. After 10 minutes, the sperm that swum out into the overlay buffer were removed and fixed (4% paraformaldehyde in Sorenson phosphate buffer) for 5 minutes. After an initial wash (145 x g, 5min, 4°C) in Dubecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma-Aldrich, Inc., D1283, St Louis, USA) the pellet was resuspended and sperm were incubated 1 h at room temperature in affinity-purified antibody to full length rat recombinant SP22 (anti-rSP22 Ig; 1:200). After another wash with DPBS, the sperm were incubated for 1 h at room temperature with FITC conjugated rabbit anti-sheep Ig (Vector Laboratories, Inc., R0219, Burlingame, CA), diluted 1:50 in DPBS. After last centrifugation (380 x g, 5min, 4°C), a small aliquot of the sperm pellet was put on a slide and coverslipped with Vector's fade retardant mounting medium (Vector Laboratories, Inc., R1107, Burlingame, CA).

Images were analyzed and captured by fluorescent microscope (excitation filter set 450-480 nm, dichromatic mirror 500 nm and suppression filter set 520 nm; Olympus BX6 1, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera and Image-Pro Plus[®] (version 6.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) software. The subjective evaluations showed that there were no differences in the % of sperm stained over the equatorial segment, so only staining intensity was quantified. One hundred spermatozoa per animal were randomly

chosen to determine the mean intensity of FITC staining of the equatorial segment of the sperm head. This analysis was performed at 1000X magnification under oil immersion (Immersol 518N, Carl Zeiss, D-73446, Oberkochen), using Image-Pro Plus[®] software. Images to SP22 quantification were captured in light, contrast and shine standard conditions. Results were expressed by optical density (OD).

Quantification of SP22 by ELISA

Prior to ELISA, samples were thawed, and each extract was concentrated with 1mM Tris buffer, pH 7.2, by two centrifugations (3,000 x g, 30 min, 4°C) in Ultrafree-4 centrifugation filter units (Millipore). Protein concentration was determined using Bradford reagent (BioAgency, São Paulo, SP, Brazil) and sample volumes containing 30µg protein were lyophilized.

The SP22 ELISA was performed as described by Kaydos et al. [28] with adaptations. For this, 96-well tissue culture plates (Costar 3595 96-well cell culture; Corning Inc., Corning, NY) were used. A standard curve was generated using serial dilutions of antigen (rSP22) [24], 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5, and 10 ng in 50 µl/well; all dilutions were in Phosphate Buffered Saline Packs (BupH; Pierce, 28372, Rockford, IL), pH 7.4. For each sperm extract, 30 µg of lyophilized protein was diluted in BupH and plated at 50 µL/well. Duplicate wells were used for both the SP22 standards and each sperm extract. The plates were stored overnight at 4°C to maximize antigen absorption. The following day, unbound antigen was removed by inverting the plate and shaking gently. A blocking step consisted of addition of 150 µL/well of milk protein in DPBS followed by incubation for 1 h at 37°C. Sheep anti-rSP22 diluted 1:1000 in DPBS + 0.5% BSA was

added (50 μ L /well) and allowed to bind during incubation for 1 h at 37°C. After three washes with DPBS + 0.5% BSA (200 μ L/well), peroxidase conjugated rabbit anti-sheep antibody (Pierce Immunopure 31480, Rockford, IL) diluted 1:500 in DPBS + 0.5% BSA was added (50 μ L/well) and allowed to incubate for 1 h at 37°C. After four washes with DPBS + 0.5% BSA (200 μ L/well), the peroxidase substrate ABTS (Pierce, 37615) was added (100 μ L /well). The reaction was allowed to develop over a 20 min period. Reaction blocking step consisted of 1% SDS in ultra-pure water (100 μ L /well).

Absorbance was read (Original Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finland) at 405 nm. Sample values were always found to fall within the range of the standard curve. The results were expressed in ng of SP22/ μ g of sperm membrane protein total.

Statistical Analyses

For comparison of sperm parameters between the breeds, it was performed the Student t test or the non-parametric Mann Whitney test, according to the characteristics of each variable, using Instat 3.0 software.

Due to semen heterogeneity it was chosen to identify sperm subpopulations using the kinematics data of the total number of motile spermatozoa obtained in evaluations by CASA system from 18 rams (1 ejaculate per animal, $n = 3847$) by clustering analyses. For this, the first step was standardizing the data using Mahalanobis distances. The second step was specifying the number of clusters using analysis of hierarchical dendrogram constructed on individual ejaculates using the Ward method. After this, a multivariate non-hierarchical k -means cluster analysis was carried out to classify the 3847 spermatozoa into a reduced number of subpopulations according to their patterns of movement, so that every

spermatozoon belonged to one and only one cluster. Spermatozoa that were very close to each other were assigned to the same cluster, whereas spermatozoa that were far apart were put into different clusters. For the distribution of observations (individual spermatozoa) within rams and subpopulations, ANOVA with the “a posteriori” Tukey test and chi-square test were used. The percentage of sperm within each subpopulation was compared to other parameters (i.e. sperm morphology, plasma membrane integrity, SP22 level) across the rams in this study.

For correlation analysis among sperm morphology, membrane integrity, kinematics subpopulations and SP22 quantification methods multiple regression models were built with selection procedure of stepwise models. Multivariate statistics were performed using R Development Core Team (2007) software. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Semen parameters

Semen characteristics and scrotal circumference results of Dorper and Santa Inês rams are shown in Table 1. Dorper rams had scrotal circumference significantly higher than Santa Inês rams ($P = 0.0004$). However, there were no significant differences ($P > 0.05$) in ejaculate volume, sperm concentration and sperm production between the breeds.

The parameters of motility (MOT) and vigor analyzed subjectively were not significantly different ($P > 0.05$) between Dorper and Santa Inês rams. TMOT, VCL, ALH, LIN, STR, ELONG, RAPID, MEDIUM, SLOW and SIZE analyzed by CASA system were not different. However, PROG ($P = 0.023$), VAP ($P = 0.028$) and VSL ($P = 0.015$) were

significantly higher and BCF was significantly lower ($P = 0.011$) for Santa Inês rams.

The morphological analysis revealed that there was no significant difference ($P > 0.05$) in the percentage of sperm major defects between the ram breeds. However, the percentages of total ($P = 0.029$) and minor ($P = 0.0007$) defects were significantly higher in Dorper rams. Pyriform and underdeveloped head and strongly coiled tail were predominant among the major defects found, while isolated, folded or coiled tails and distal cytoplasmatic droplet stand out among the minor defects.

Furthermore, there was no significant difference ($P > 0.05$) between the breeds in the percentage of spermatozoa with intact plasma membrane evaluated via fluorescent probes (CFDA/PI).

Identification of sperm kinematics subpopulations

Three kinematics subpopulations were identified after the application of hierarchical clustering and non-hierarchical k -means cluster analyses. Means of each motion characteristic for these subpopulations are shown in Table 2 and qualitative interpretations of these data are as follows.

Subpopulation 1: This sperm subpopulation was highly active (high VAP and VCL values) and the most progressive (high VSL, STR and LIN values). ALH value was significantly higher ($P < 0.05$) than subpopulation 3 and significantly lower ($P < 0.05$) than subpopulation 2. In spite of the higher activity of these spermatozoa; they had BCF significantly lower ($P < 0.05$) than subpopulation 3 and similar to subpopulation 2.

Subpopulation 2: The spermatozoa included in this subpopulation had intermediate values of VAP and VSL, and VCL value similar to subpopulation 1, indicating their high

kinetic activity. However, these spermatozoa had lower progressiveness and linearity than subpopulation 1, mainly evidenced for high ALH value. Moreover, this subpopulation showed lower ($P < 0.05$) values of STR and LIN than subpopulation 1.

Subpopulation 3: Despite these spermatozoa show higher ($P < 0.05$) flagellar beat values (higher BCF), they had lower ($P < 0.05$) movement of progression and linearity (lower VSL and STR values) than others subpopulations. Moreover, the VAP value was relatively low compared with VCL. These results indicate the complexity of the kinetic trajectories within an ejaculate.

The distribution of the total number of motile spermatozoa evaluated in subpopulations 1, 2 and 3 was relatively uniform (36.57%, 32.46% and 30.95%, respectively; Table 2).

There were significant differences in the distribution of the three kinematics subpopulations across the 18 rams ($\chi^2 = 824.39$; d.f. = 34; $P < 0.0001$; Table 3). The percentage of spermatozoa included in the subpopulation 1 in each individual ram ranged from 07.6 to 70.6%, in the subpopulation 2 from 15.1 to 42.8% and in the subpopulation 3 from 0.95 to 49.6% among the rams (Table 3). The percentage of sperm within each subpopulation for each ram was used in the correlation analyses which follow.

SP22 protein analysis

The sperm membrane protein SP22 was identified on ram spermatozoa by immunocytochemistry assay. The immunolocalization was specific to the equatorial segment of the sperm head and neck (Figure 1). There were no individual differences or difference between Dorper and Santa Inês breeds in this location.

The SP22 levels analyzed by ELISA were significantly correlated ($R^2 = 0.70$) with the SP22 levels determined by analysis of FITC intensity following immunostaining (Figure 2). This correlation was explained by a parabola, whose equation for the regression line is:

$$y = 1.07 - 12.45 x + 182.74 x^2$$

$$P < 0.09 \quad P < 0.02$$

Where y is equal to the intensity of SP22 immunostaining and x corresponds to values of SP22 via ELISA.

The levels of SP22 protein, assessed by both ELISA (Figure 3A) and FITC immunostaining analysis (Figure 3B) were not significantly different ($P > 0.05$) between Dorper and Santa Inês breeds.

Relationships between sperm parameters and SP22 levels

The SP22 values obtained by ELISA were significantly correlated with integrity membrane ($R^2 = 0.30$, $P = 0.02$), but they were not significantly correlated ($P > 0.05$) with morphological abnormalities, when these two variables were correlated to SP22 quantification separately. However, the building of multiple regression models including the three variables showed that the SP22 levels determined by ELISA were negatively correlated with the percentages of sperm that were morphologically abnormal and positively correlated with the percentage of sperm with an intact plasma membrane, (R^2 for these 3 variables = 0.47; Figure 4). The linear regression equation for these correlations was:

$$y = 0.0029 - 0.0015 x_1 + 0.0010 x_2$$

$$P < 0.047 \quad P < 0.003$$

Where y is equal to SP22 levels by ELISA analysis, x_1 corresponds to morphological abnormalities and x_2 to membrane integrity.

This correlation between SP22, morphological abnormalities, and membrane integrity did not apply when SP22 levels determined by FITC intensity following immunostaining were used in the analysis. The same occurred when the percentage of sperm that were morphologically abnormal and the percentage of sperm with an intact plasma membrane were separately correlated with SP22 levels determined by FITC immunostaining analysis.

The number of spermatozoa with intact plasma membrane was positively correlated ($R^2 = 0.48$, $P = 0.02$; Figure 5A) with the percentage of spermatozoa in subpopulation 1 (the most active and progressive) and it was negatively correlated ($R^2 = 0.30$, $P = 0.02$; Figure 5B) with subpopulation 3 (with lower progressiveness and linearity). However, this sperm parameter was not significantly correlated ($P > 0.05$) with percentage of spermatozoa in subpopulation 2. Furthermore, the percentages of morphologically abnormal spermatozoa were not significantly correlated ($P > 0.05$) with the percentages of sperm within the three kinematics subpopulations found within semen samples.

Finally, there was no significant correlation ($P > 0.05$) between the percentages of sperm within the three kinematics subpopulations and SP22 values obtained by both ELISA and FITC immunostaining analysis.

Discussion

In the present study, the SP22 sperm protein was identified for the first time in ram spermatozoa. The immunocytochemistry analysis using anti-rSP22 antibody revealed that

this protein is specifically located on the equatorial segment of the ram sperm head, such as rats, hamster, rabbits, bulls, humans [26] and stallions (unpublished data). Moreover, the SP22 protein was found over the neck of the ovine spermatozoa.

The equatorial segment of the sperm head contain the molecular machinery related to the interaction and fusion with oolemma [35], including epididymal protein DE (CRISP 1) [36] and IZUMO protein [20]. Thus, the expression of the SP22 protein in this region of the ovine sperm suggests its involvement on spermatozoon-oocyte interaction during the fertilization process like in the different mammalian species analyzed by Klinefelter et al. [26].

In rats, the SP22 protein undergoes translocation on sperm surface during epididymal transit. When the spermatozoa leave the testis the protein is situated mainly in the cytoplasmatic droplet at the base of the sperm head, and upon entering the cauda epididymis the SP22 acquires its characteristic location in the equatorial segment of the sperm head [26]. The SP22 expression found over the neck of ram ejaculate sperm can indicate difference in migration pattern of the protein in this specie and/or vestiges proceeding from cytoplasmatic droplet. The function of the SP22 protein in this sperm region is still unknown.

Both methods of SP22 quantification, ELISA and immunostaining appeared to be highly correlated ($R^2 = 0.70$) and efficient for the study of the SP22 expression in rams. Nevertheless, the correlation analyses of these quantification assays with sperm parameters indicated that ELISA is the most accurate method, since the SP22 values determined by FITC immunostaining analysis were not significantly correlated with any of the sperm parameters analyzed in this study, and SP22 ELISA values were positively correlated with

the percentage of sperm with intact plasma membranes and negatively correlated with the percentage of sperm with morphological abnormalities (3 variable $R^2 = 0.47$).

SP22 levels can be an important indicator of the sperm maturation status [24] and of disturbances in the spermatogenesis [25,27,28], reflecting directly the fertility potential of an animal. Thus, the fact that SP22 levels assessed by ELISA and FITC immunostaining analysis did not significantly differ between Dorper and Santa Inês rams indicates that the fertilizing capacities of the sperm from these animals were similar.

Dorper and Santa Inês breeds were similar in the majority of the evaluated sperm parameters. The higher scrotal circumference in Dorper rams was expected, since the post-natal testicular development of rams is correlated with body weight, as well as with the breed of the animal [37]. The significant differences in the MP, VAP, VSL and BCF values between Dorper and Santa Inês rams did not reflect differences in the sperm motile quality of these animals, since the average values of these kinetic parameters were high in both breeds, indicating highly active spermatozoa and with high progression movement. The same happened with the percentage of sperm abnormalities. Both breeds had percentage of morphologically abnormal sperm within the expected range for rams.

Studies of correlation between sperm morphology and fertility are controversial. Several researches demonstrated that the sperm morphologic characteristics are not significantly correlated with the fertility rates [9,38]. However, some authors showed that the increase of the abnormal spermatozoa within ejaculate is associated with a reduction in the fertility potential in stallion [39], bulls [40] and rabbits [41]. In spite of this controversy, the negative correlation between the percentage of morphologically abnormal sperm and SP22 levels determined by ELISA might indicate indirectly the relationship of the SP22

protein with fertility.

In the same way, the positive correlation between SP22 levels obtained by ELISA and the percentage of spermatozoa with intact plasma membrane indicate also the importance of the protein for the ram reproductive capacity. This correlation agrees with the possible function of the SP22 protein for the spermatozoon-oocyte interaction. Since the sperm membrane integrity is a fundamental requirement for the sperm survival in the female reproductive tract, and for the process of sperm capacitation, acrossome reaction and specially for spermatozoon-oocyte interaction [42,43].

In fact, these significant correlations are not very surprising. Disturbances in sperm structure and function originated during spermatogenesis can also compromise the SP22 expression [25,27-29]. Moreover, modifications in sperm size, shape and/or integrity can decrease the sperm membrane surface and consequently the area for SP22 protein expression.

The co-existence of sperm morphometric and kinematics subpopulations within an ejaculate of mammalian species has been widely accepted by the researchers [10-12,44-46]. Due to this semen heterogeneity, the evaluation of the variables obtained by CASA system through of their average values is limited and it can produce a little useful biological information about the real motile quality of an animal [45]. This was confirmed by results of Núñez-Martínez, et al. [12]. These authors related that effects of treatment of biotechnological procedure such as freezing-thawing can be masked due to the existence of non-responsive subpopulations [12]. Thus, the identification of kinematics subpopulations within a ram ejaculate can allow detection with higher accuracy of possible relationships between motile characteristics and SP22 expression.

Through cluster analyses of the trajectories of each spermatozoon, defined by their VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR and LIN parameters [45,46], three separate subpopulations of spermatozoa with different motility characteristics in ram ejaculate were identified. A number of three to four semen motile subpopulations has been observed within ejaculate of different species [10,11,45,46].

The spermatozoa allocated in subpopulation 1 were the most active and progressive. The subpopulation 3 was characterized by a vigorous flagellar beat. Moreover, the spermatozoa of this subgroup had little progressive and non-linear movement, indicating uncoordinated motility. The subpopulation 2 had an intermediate activity and progression pattern in relation to other kinematics subpopulations. The identification of these three kinematics subpopulations might be attributable to variability of gene combinations resultant of the meiotic process during the spermatogenesis [46,47].

The distribution of the total number motile spermatozoa across the subpopulations was very homogenous, implying an evident difference in the motile subpopulation structure among semen sample.

The proportion of spermatozoa in subpopulation 1 in each ram was positively correlated ($R^2 = 0.48$) with membrane integrity. While the subpopulation 3 was negatively correlated ($R^2 = 0.30$) with this parameter. These results suggest that clusters are able to express not only difference in motile quality but also in other functional characteristics of the spermatozoa.

In addition to the kinematic distinctions subpopulations represent spermatozoa in different physiological states [10,11,46] that may be related to the semen genotypic heterogeneity [47]. The lack of significant correlation between spermatozoa in the three

subpopulations across the rams and SP22 levels might derive from the wide ranges of the percentage of spermatozoa included in the kinematic subpopulations in each individual ram. This absence of correlation was consistent with the results of Quintero-Moreno et al. [11] that did not observe clear relationship between motile subpopulations and conception rates in boar. This underscores the difficulty in predicting the reproductive fitness of a breeder through isolated evaluation of the motility. Indeed, SP22 was originally identified as a biomarker of fertility that was more sensitive to toxic insult than other more routine parameters such as epididymal sperm reserves, sperm motility, sperm morphology and endocrine status [26].

In conclusion, the results from this work demonstrated that quantification of SP22 protein by ELISA can bring important information about fertility potential of ovine sperm. However, additional studies should be undertaken to correlate the SP22 expression with fertility rates assessed by artificial insemination or in vitro fertilization. Thus, it will be possible to evaluate the participation of the SP22 in spermatozoon-oocyte interaction in ovine and consequently its role as a fertility biomarker in this specie.

Acknowledgements

This work was supported by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, 06/54103-1) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 501306/2005-6). The authors are grateful to José Eduardo Bozano, from the Department of Morphology of the São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, for the excellent technical assistance, and to Cláudia Dias Monteiro from the Department of Radiology and Animal Reproduction of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of UNESP,

Botucatu, SP, for the assistance in semen collection.

References

- [1] Rogers B, Bentwood B, Campen H, Helmbrecht G, Soderdahl D, Hale R. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J Androl* 1983;4:119-125.
- [2] Kjaestad H, Ropstad E, Berg KA. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand* 1993;34:299-303.
- [3] Bielsa MA, Andolz P, Grtis JM. Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples? *Hum Reprod* 1994;9:1887-1890.
- [4] Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 1997;18:312-323.
- [5] Amann UP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 1989;89-98.
- [6] Amann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 1993;14:397-406.
- [7] Januskauskas A, Soderquist L, Haard MG, Haard MC, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish red and white A.I. bulls. *Acta Vet Scand* 1996;37:461-470.
- [8] Popwell JM, Flowers WL. Viability in relationships between semen quality and estimates of *in vivo* and *in vitro* fertility in boars. *Anim Reprod Sci* 2004;81:97-113.
- [9] Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. Fertility of frozen-thawed stallion

- semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand* 2006;48(14). In Press. doi:10.1186/1751-0147-48-14.
- [10] Quintero-Moreno A, Miró J, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003;59:1973-1990.
- [11] Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 2004;61:673-690.
- [12] Nuñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematics subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 2006;41:408-415.
- [13] Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodríguez-Martínez H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 1997;48:1115-1125.
- [14] Januskauskas A, Johanimsson A, Rodriguez-Martinez, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 2003;60:743-758.
- [15] Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology* 2006;65:1407-1421.
- [16] Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*

2000;63:1531-1537.

- [17] Barrios B, Fernández-Juan M, Muiño-Blanco T. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl* 2005;26:539-549.
- [18] Roncoletta M, Morani ESC, Esper CR, Barnabé VH, Franceschini PH. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci* 2006;91:77-87.
- [19] Cuasnicu PS, Gonzalez-Echeverria F, Piazza AD, Cameo MS, Blaquier JA. Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J Reprod Fertil* 1984;72:467-471.
- [20] Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005;434:234-238.
- [21] Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1993;49:1202-1207.
- [22] Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 1998;76:2032–2039.
- [23] Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 1999;52:863-873.
- [24] Klinefelter GR, Laskey JW, Ferrell J, Suarez JD, Roberts NL. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *J Androl* 1997;18:139-150.

- [25] Klinefelter GR, Strader LF, Suarez JD, Roberts NL. Bromochloroacetic acid exerts qualitative effects on rat sperm: implications for a novel biomarker. *Toxicol Sci* 2002a;68:164-173.
- [26] Klinefelter GR, Welch JE, Perreault SD, Moore HD, Zucker RM, Suarez JD, Roberts NL, Bobseine K, Jeffay S. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility *in vivo* and *in vitro*. *J Androl* 2002b;23:48-63.
- [27] Klinefelter GR, Strader LF, Suarez JD, Roberts NL, Goldman JM, Murr A. Continuous exposure to dibromoacetic acid delay pubertal development and compromises sperm quality in the rat. *Toxicol Sci* 2004;81:419-429.
- [28] Kaydos EH, Suarez JD, Roberts NL, Bobseine K, Zucker R, Laskey J, Klinefelter GR. Haloacid induced alterations in fertility and the sperm biomarker SP22 in the rat are additive: validation of an ELISA. *Toxicol Sci* 2004;81:430-442.
- [29] Veeramachaneni DNR, Palmer JS, Klinefelter GR. Chronic exposure to low levels of dibromoacetic acid, a water disinfection by-product, adversely affects reproductive function in male rabbits. *J Androl* 2007;28(4):565-577.
- [30] Welch JE, Barbee RR, Roberts NL, Suarez JD, Klinefelter GR. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family. *J Androl* 1998;19:385-92.
- [31] Davis RO, Rothmann, SA, Overstreet, MD. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril* 1992;57(3):648-653.
- [32] Barth Ad, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University Press/AMES, 1989, 265p.
- [33] Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med* 1973;25:382-391.

- [34] Harrison, RAP, Vickers, SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 1990;88:343-352.
- [35] Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*, Knobil E., Neil J.D. (Eds), 3ed. vol. 1, San Diego: Elsevier Academic Press, 2006, pp. 55-112.
- [36] Da Ros VG, Munuce MJ, Cohen DJ, Marín-Briggiler CI, Busso D, Viscinti PE, Cuasnicu PS. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein D (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biol Reprod* 2004;70:1325-1332.
- [37] Braun WF. Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology* 1980;13:221-229.
- [38] Rodríguez-Martínez H, Larson, B, Zhang BR, Soderquist L. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J Reprod Dev* 1997;43:1-11.
- [39] Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1992;200(7):979-985.
- [40] Correa JR, Pace MM, Zavos PM. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 1997;48:721-731.
- [41] Lavara R, Moce E, Lavara F, Castro MPV, Vicente JS. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* 2005;64:1130-1141.

- [42] Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992;38:209-222.
- [43] Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006;66:841-850.
- [44] Peña FJ, Saravia F, García-Herreros M, Núñez-Martínez I, Tapia JA, Johanimsson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J Androl* 2005;26(6):716-723.
- [45] Abaigar T, Holt WV, Harrison RAP, Barrio G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol Reprod* 1999;60:32-41.
- [46] Abaigar T, Cano M, Pickard AR, Holt WV. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. *Reprod* 2001;122:265-273.
- [47] Olds-Clarke P, Wivell W. Impaired transport and fertilization *in vivo* of calcium-treated spermatozoa from +/+ or congenic tw^{32/+} mice. *Biol Reprod* 1992;47:621-628.

Legends of Figures

Figure 1. Immunolocalization of the SP22 protein in ram sperm (FITC immunostaining) using anti-rSP22 Ig. SP22 staining is specific on the equatorial segment of the sperm head (arrow) and neck (*). Scale bar = 10 μ m.

Figure 2. Scatter plot depicting the correlation between the SP22 levels quantified by ELISA (ng SP22/ μ g of sperm proteins total) and SP22 staining of the equatorial segment of the sperm head analysis (OD) in Dorper and Santa Inês rams; $R^2 = 0.70$, $n = 18$. The nonlinear equation for the graph was $y = 1,07 - 12.45 x + 182.74 x^2$, where y is equal to SP22 values by FITC immunostaining analysis and x corresponds to SP22 levels by ELISA analysis.

Figure 3. SP22 levels in Dorper ($n = 8$) and Santa Inês ($n = 10$) rams. (A) SP22 values assessed by ELISA (ng SP22/ μ g of sperm proteins). (B) SP22 levels determined by FITC immunostaining analysis (OD). Values expressed by mean $\pm$ S.E.M. $P > 0.05$.

Figure 4. Graph depicting the correlation among the SP22 levels quantified by ELISA (ng SP22/ μ g of sperm proteins), morphological abnormalities (%) and membrane integrity (%) in Dorper and Santa Inês rams; $R^2 = 0.47$, $n = 18$. The regression equation for the graph was $y = 0.0029 - 0.0015x_1 + 0.0010x_2$, where y is equal to SP22 levels by ELISA analysis, x_1 corresponds to morphological abnormalities and x_2 to membrane integrity. The gray intensity scale corresponds to SP22 levels obtained by ELISA analysis.

Figure 5. Correlations between the percentages of sperm within kinematic subpopulations and membrane integrity (%) across the Dorper and Santa Inês rams used in this study ($n = 18$). (A) Percentage of spermatozoa within subpopulation 1 versus percentage of spermatozoa with intact plasma membrane ($R^2 = 0.48$, $P = 0.02$). (B) Percentage of spermatozoa within subpopulation 3 versus membrane integrity ($R^2 = 0.30$, $P = 0.02$). The dotted lines represent the 95% confidence limits of the regression lines.

Table 1. Sperm parameters and scrotal circumference of Dorper and Santa Inês rams.

Parameters	Dorper (<i>n</i> = 08)	Santa Inês (<i>n</i> = 10)
Scrotal circumference (cm)	33.95 ± 1.09	28.83 ± 0.56**
Volume (mL)	1.57 ± 0.13	1.25 ± 0.12
Concentration (10 ⁹ sperm mL ⁻¹)	2.24 ± 0.28	2.69 ± 0.25
Production (10 ⁹ sperm per ejaculate)	3.55 ± 0.52	3.47 ± 0.39
¹ <i>Morphological Parameters</i>		
Total defects (%)	10.5 (9.50–13.50)	6 (4.50–7.75)*
Major defects (%)	1.5 (0–2.25)	3.5 (1.00–4.75)
Minor defects (%)	8 (8.00–11.50)	2 (1.00–4.50)**
<i>Kinematics Parameters</i>		
¹ Vigor (0-5)	3 (3–3)	3 (3-3)
¹ MOT (%)	80 (70–80)	80 (80–80)
¹ TMOT (%)	82.00 (73.25–89.00)	88.50 (82.75–92.00)
¹ PROG (%)	36.50 (29.00–43.25)	47.50 (41.50–59.25)*
VAP (µm s ⁻¹)	120.87 ± 16.57	160.85 ± 6.80*
VSL (µm s ⁻¹)	95.17 ± 13.37	133.44 ± 6.79*
VCL (µm s ⁻¹)	192.31 ± 24.23	220.50 ± 5.60
ALH (µm)	6.95 ± 1.02	7.09 ± 0.11
BCF (Hz)	36.75 ± 1.67	30.49 ± 1.41*
¹ LIN (%)	54.50 (49.25–66.25)	58.5 (52.25–62.00)
¹ STR (%)	68.87 (63.75–76.25)	78.00 (74.25–81.50)
ELONG	38.25 ± 2.70	37.80 ± 1.27
SIZE (µm ²)	16.85 ± 2.61	20.19 ± 0.85
¹ RAPID (%)	57.00 (52.00–75.25)	77.5 (61.00–85.75)
¹ MEDIUM (%)	15.50 (11.75–20.75)	12.00 (6.00–17.25)
¹ SLOW (%)	5.00 (2.50–7.00)	2.50 (2.00–6.25)
¹ Membrane integrity (%)	68.00 (65.25–70.25)	60.50(41.25–68.25)

Values expressed by mean ± S.E.M; t Student test. ¹Values expressed in median (Q1–Q3); Mann Whitney test. * *P* < 0.05; ** *P* < 0.001.

Table 2. Kinematics characteristics for three sperm kinematics subpopulations in rams.

Kinematics parameters	Sperm subpopulations		
	1	2	3
<i>n</i>	1407	1249	1191
(%)	36.57	32.46	30.95
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	193.59 ± 47.31^a	137.81 ± 38.32^b	53.62 ± 29.57^c
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	182.17 ± 47.55^a	84.41 ± 38.49^b	32.62 ± 27.69^c
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	242.76 ± 61.44^a	242.16 ± 57.22^a	110.76 ± 46.50^b
ALH (μm)	6.93 ± 3.12^a	11.82 ± 3.63^b	5.80 ± 2.96^c
BCF (Hz)	29.34 ± 19.25^a	31.02 ± 17.65^a	37.95 ± 20.12^b
STR (%)	94.03 ± 7.38^a	61.29 ± 22.85^b	58.39 ± 26.54^c
LIN (%)	71.59 ± 20.16^a	36.01 ± 19.41^b	35.38 ± 22.60^b

Values expressed by mean $\pm$ SD. The total number of motile spermatozoa analyzed was 3847 from 18 ejaculates. Different superscripts within a row indicate significant differences ($P < 0.05$) by ANOVA with the “a posteriori” Tukey test.

Table 3. Relative percentage of spermatozoa in each sperm kinematics subpopulation within rams.

Kinematics subpopulations	Rams																	
	SI1	SI2	SI3	SI4	SI5	SI6	SI7	SI8	SI9	SI10	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
<i>N</i>	194	86	111	119	193	74	202	213	232	182	230	910	160	217	242	36	238	199
1	40.9	07.6 ⁻	39.4 ⁻	28.6 ⁻	12.0 ⁻	47.3	39.9	57.3	42.8	65.4 ⁺	60.5 ⁺	50.5	70.6 ⁺	50.3	68.9 ⁺	58.4	37.6 ⁻	53.0
2	38.2 ⁺	42.8 ⁺	20.6	32.2	40.9 ⁺	19.4	37.0 ⁺	30.2	30.4	23.6	15.1 ⁻	18.0 ⁻	16.0 ⁻	18.6	20.3	29.2	28.2	37.5 ⁺
3	20.9	49.6 ⁺	40.0	39.2 ⁺	47.1 ⁺	33.3	23.1	12.5 ⁻	26.8	11.0 ⁻	24.4	31.5 ⁺	13.4 ⁻	31.1	10.8 ⁻	12.4	34.2 ⁺	09.5 ⁻

Results express the percentages of all of the spermatozoa evaluated in each ram which were included in the different subpopulations. Superscripts signals correspond to the standardized residuals of the chi-square analysis and the contribution of each ram to the constitution of the kinematics subpopulations. SI = Santa Inês rams; D = Dorper rams; *N* = total number of motile spermatozoa analyzed by CASA in each ram.

Figure 1

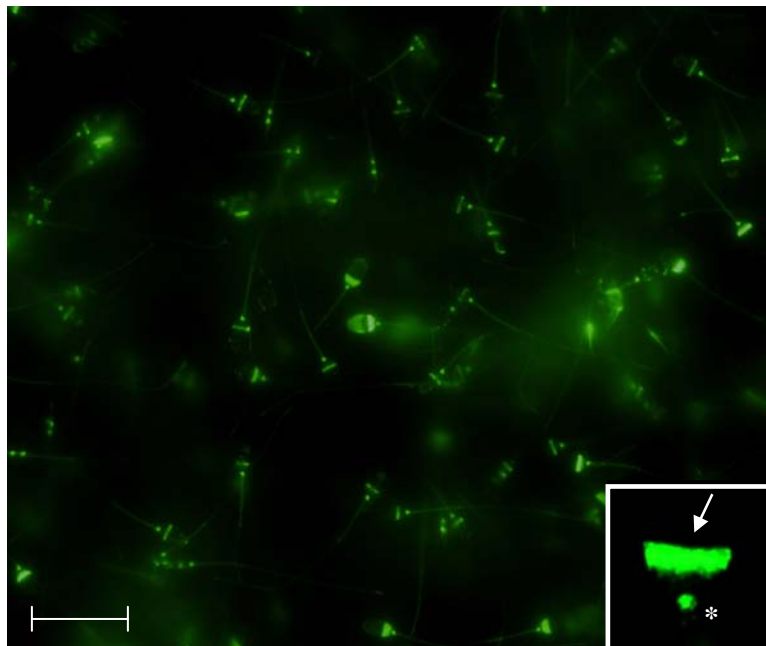


Figure 2

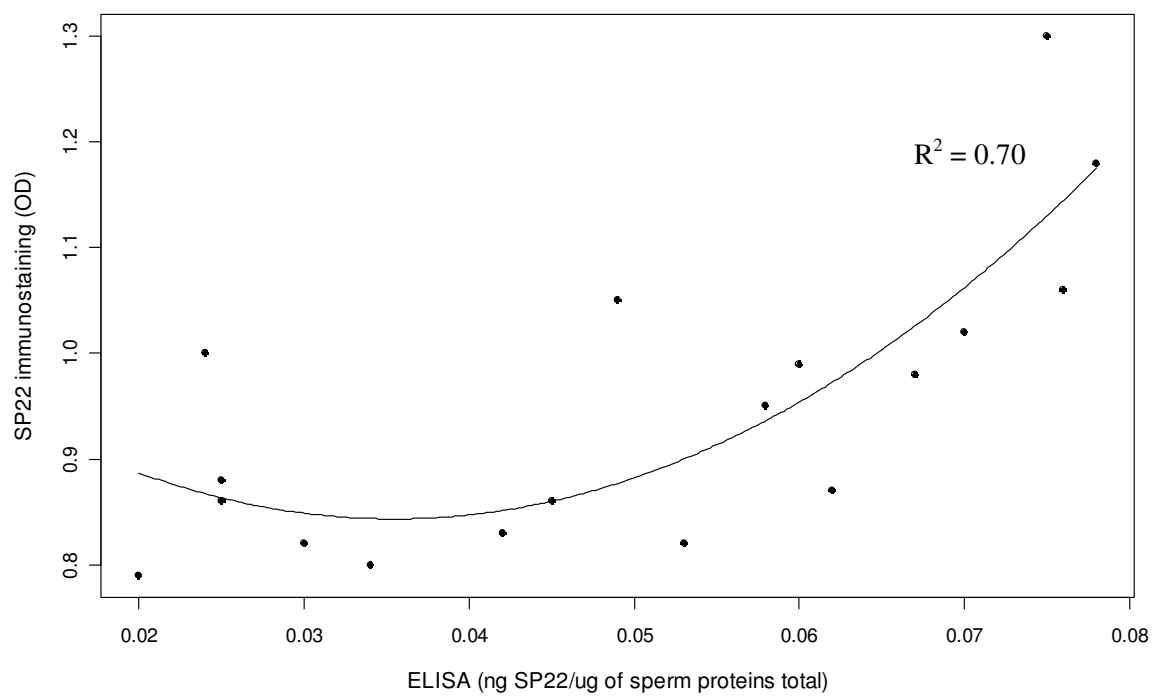


Figure 3

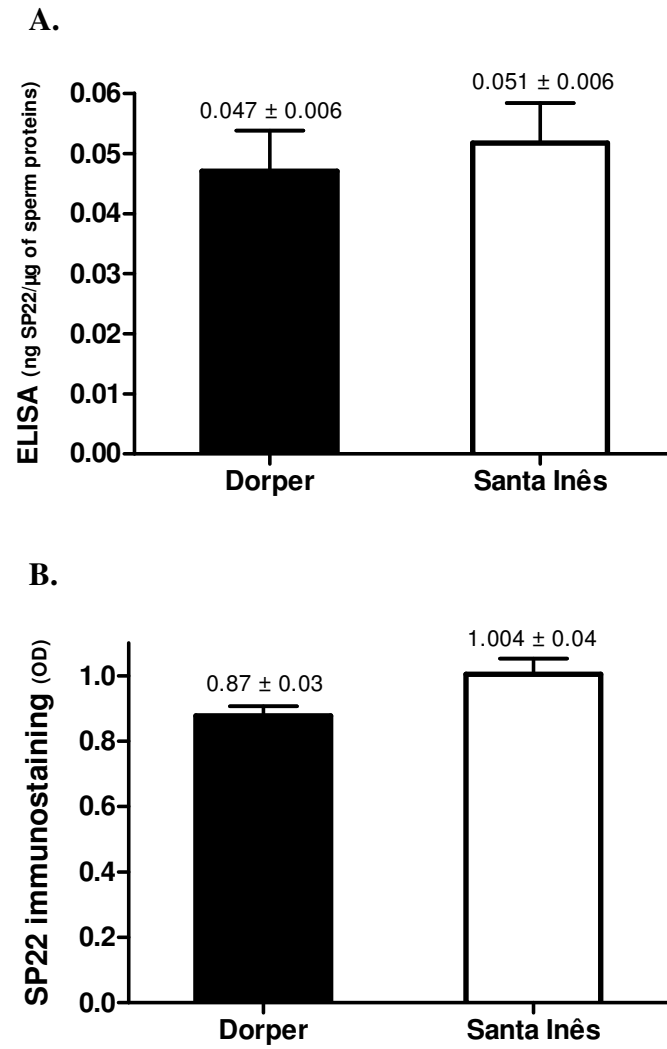


Figure 4

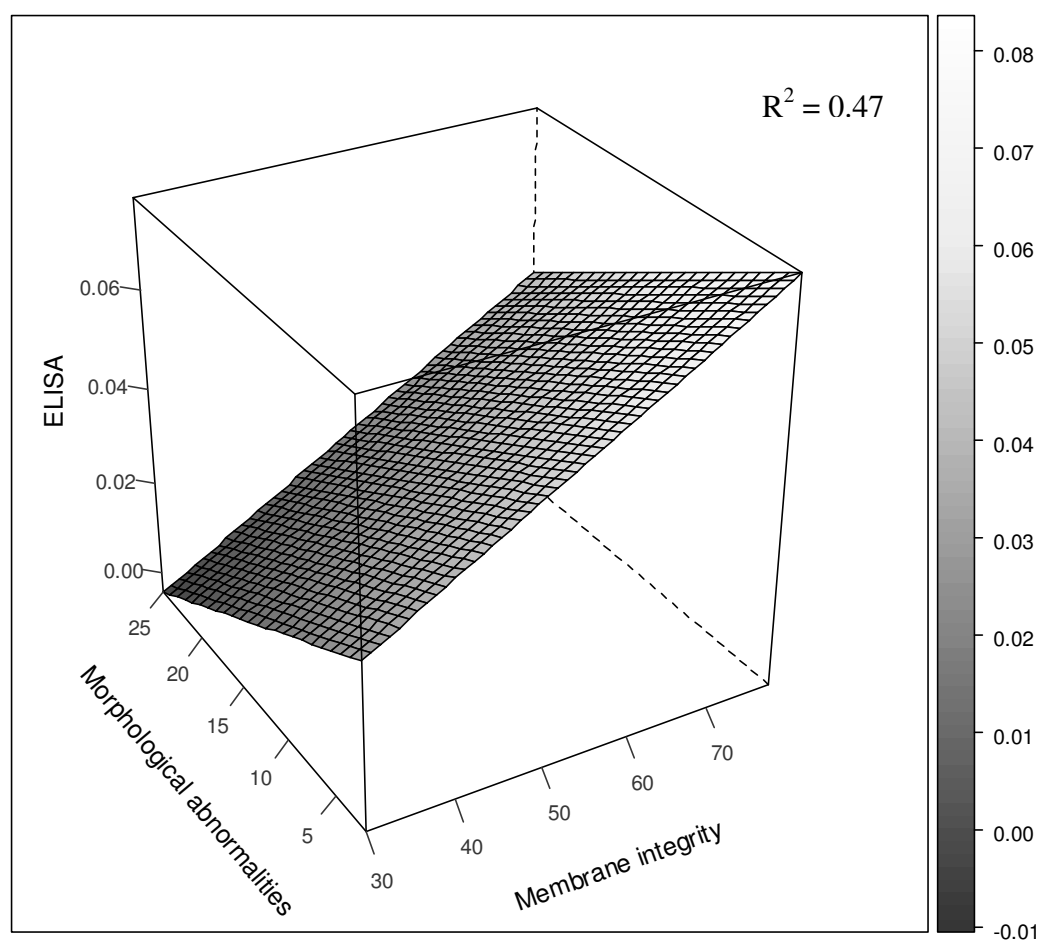
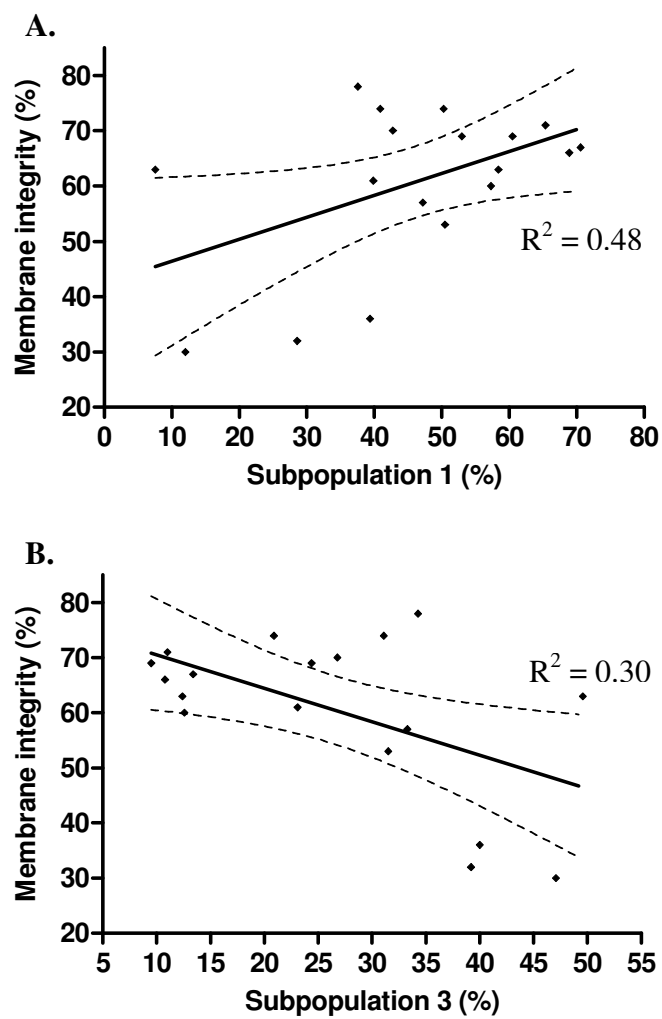


Figure 5



5. CONCLUSÕES FINAIS

A proteína SP22 foi identificada no segmento equatorial da cabeça e no colo dos espermatozóides ovinos. Os níveis de SP22 determinados por ELISA foram significativamente correlacionados com a integridade de membrana e a morfologia espermática. No entanto, os níveis de SP22 obtidos por análise de imunomarcção fluorescente não foram significativamente correlacionados com estes parâmetros espermáticos. Três sub-populações cinético-espermáticas foram encontradas no ejaculado dos carneiros, porém não foram correlacionadas com as concentrações de SP22. O estudo da proteína SP22 em espermatozóides ovinos trouxe importantes informações a respeito da capacidade reprodutiva destes animais. Entretanto, para a validação desta proteína como um biomarcador de fertilidade nesta espécie são necessários estudos que correlacionem os níveis de SP22 com as taxas de fertilidade obtidas *in vivo* e/ou *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- Abaigar T., Cano M., Pickard A.R., Holt W.V., 2001. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, eletroejaculation technique and short-term semen storage. *Reprod.*, 122, 265-73.
- Abou-Haila A., Tulsiani D.R., 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch. Biochem. Biophys.*, 379 173-82.
- Amann R.P., Hammerstedt R.H., 1993. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl.*, 14, 397-406.
- Amann C., Quinatana-Casares P.I., Sanchez-Partida L.G., Setchell B.P., 2006. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. *Asian J. Androl.*, 8(4), 411-8.
- ARCO – Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. Padrões raciais. Disponível em: http://www.arcoovinos.com.br/lin/santa_ines.htm Acesso em: 25 jul 2007.
- Ax R.L., Dally M., Didion B.A., Lenz R.W. Love C.C., Varner D.D., Hafez, B., Dellin M.E. Avaliação do sêmen. In: Hafez, E.S.E., Hafez, B. Reprodução Animal. 7ed., Barueri: Manole, 2004: 375p.
- Barrios B., Pérez-Pé R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muiño-Blanco T., 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 63, 1531-7.
- Barrios B., Fernández-Juan M., Muiño-Blanco T., 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl.*, 26(4), 539-49.
- Barros N.N., Vasconcelos V.R., Wander A.E., Araújo M.R.A., 2005. Eficiência bioeconômica de cordeiros F₁ Dorper x Santa Inês para produção de carne. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40(8), 825-31.
- Benoff S., 1998. Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 453-71.
- Bergeron A., Le Villemure M., Lazure C., Manjunath P., 2005. Isolation and

- characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.*, 71, 461-70.
- Bielsa M.A., Andolz P., Grtis J.M., 1994. Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples? *Hum. Reprod.*, 9, 1887-90.
- Bleil J.D., Wassarman P.M., 1980. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocytes's zona pellucida. *Dev. Biol.*, 76, 185-202.
- Bleil J. D., Wassarman P. M., 1986. Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.*, 102, 1363-71.
- Boué F., Sullivan R., 1996. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an epididymal sperm antigen. *Biol. Reprod.*, 54, 1018-24.
- Brandon C.I., Heusner G.L., Caudle A.B., Fayrer-Hosken R.A., 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, 52, 863-73.
- Budworth P.R., Amann R.P., Chapman P.L., 1988. Relationships between computerized measurements of motion and frozen-thawed bull sperm and fertility. *J. Androl.*, 9, 41-54.
- Busso D., Cohen D.J., Maldera J.A., Dematteis A., Cuasnicu P.S., 2007. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol. Reprod.* In Press. doi:10.1095/biolreprod.107.061788.
- 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*, 66, 841-50.
- Cardullo R.A., Florman H.M., 1993. Strategies and methods for evaluating the acrosome reaction. *Methods Enzymol.*, 225, 136-53.
- Celeghini E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. São Paulo: USP, FMVZ, 2005, 186p. (Tese, Doutorado).
- Chen J., Litscher E.S., Wassarman P., 1998. Inactivation of the mouse sperm receptor,

- mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 6193-7.
- Cho C., Bunch D.O., Faure J.E., Goulding E.H., Eddy E.M., Primakoff P., et al., 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. Science, 281, 1857-9.
- Christensen A.K., Mason N.R., 1965. Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-¹⁴C *in vitro*. Endocrinology, 76, 646-56.
- Clermont Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev., 52, 198-238.
- Cloete S.W.P., Snyman M.A., Herselman M.J., 2000. Productive performance of Dorper sheep. Small Rumin. Res., 36, 119-35.
- Colenbrander B., Gadella B.M., Stout T.A.E., 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. Reprod. Dom. Anim., 38, 305-11.
- Coonrod S.A., Naaby-Hansen S., Shetty J., Shibahara H., Chen M., White J.M., Herr J.C., 1999. Treatment of mouse oocytes with PIPLC releases 70-kDa (pI 5) and 35- to 45-kDa (pI 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. Dev. Biol., 207, 334-49.
- Correa J.R., Pace M.M., Zavos P.M., 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. Theriogenology, 48, 721-31.
- Cosson J., 1996. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. Cell Biol. Int., 20(2), 83-94.
- Cuasnicu P.S., Gonzalez-Echeverria F., Piazza A.D., Cameo M.S., Blaquier J.A., 1984. Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. J. Reprod. Fertil., 72, 467-71.
- Da Ros V.G., Munuce M.J., Cohen D.J., Marín-Briggiler C.I., Busso D., Viscinti P.E., Cuasnicu P.S., 2004. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein D (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. Biol. Reprod., 70, 1325-32.
- DasGupta S., Mills C. L., Fraser L. R., 1993. Ca²⁺ related changes in the capacitation state

- of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.*, 99, 135-43.
- Dacheux J.L., Voglmayr K., 1983. Sequences of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol. Reprod.*, 29, 1033-1046.
- Dacheux J.L., Gatti J.L., Dacheux F., 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.*, 61, 7-17.
- Ebensperger C., Barros C., 1984. Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gamete Res.*, 9, 387-97.
- Eddy E.M. The spermatozoon. In: Knobil E., Neill J. D. (Eds). *The physiology of reproduction*. 3ed. Vol. 1, San Diego: Elsevier Academic Press, 2006: 3-54p.
- Ellis D.J., Shadan S., James P.S., Henderson R.M., Edwardson J.M., Hutchings A., Jones R., 2002. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.*, 138, 187-98.
- El-Wishy A.B., El-Sawaf S.A., 1971. Development of sexual activity in male Damascus goats. *Indian J. Anim. Sci.*, 41, 350-6.
- Evans J.P., 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum. Reprod. Update*, 8(4), 297-311.
- Fan J., Lefebvre J., Manjunath P., 2006. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene*, 375, 63-74.
- Fiser P.S., Fairfull R.W., 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiol.*, 26, 64-9.
- Flesch F. M., Brouwers J. F. H. M., Nievelstein P. F. E. M., Verkleij A. J., Van Golde L. M. G., Colenbrander B., Gadella B.M., 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell Sci.*, 114, 3543-55.
- Florman H.M., Arnoult C., Kazam I.G., Li C., O'Toole C.M.B., 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 59, 12-16.

- Fonseca J.F., Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. Anais eletrônico Goiânia: CBRA, 2005. Meio divulgação: CD-Room.
- França L.R., Ogawa T., Avarbock M.R., Brinster R.L., Russell L.D., 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.*, 59, 1371-7.
- França L.R., Avelar G.F., Almeida F.F.L., 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63, 300-18.
- Freitas V.J.F., Lopes E.S.J. Controle do estro e da ovulação em caprinos. In: Gonsalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. (Eds). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001: 57-7p.
- Gadella B.M., Rath R., Brouwers J.F.H.M., Stout T.A.E., Colenbrander B., 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 249-65.
- Garcia I.F.F., Perez J.R.O., Teixeira J.C., 2000. Desempenho de cordeiros Texel x Bergamácia, Texel x Santa Inês e Santa Inês puros, terminados em confinamento, alimentados com casca de café como parte da dieta. *Rev. Bras. Zootec.*, 29(2), 564-72.
- García-López N., Ollero M., Muñio-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., 1996. A dextran swin-up procedure for the separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*, 46, 141-51.
- Garner D.L., Thomas C.A., Joerg H.W., Dejarnette J.M., Marshall C.E., 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57, 1401-6.
- Gatti J.L., Catella F., Dacheux F., Ecroyd H., Métayer S., Thimon V., Dacheux J.L., 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-3, 321-39.
- Gerena R.L., Irikura D., Urade Y., Eguchi N., Chapman D.A., Killian G.J., 1998. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.*, 58, 826-33.

- Gillan L., Evans G., Maxwell W. M. C., 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 9, 481-7.
- Graham J.K., Kunze E., Hammerstedt R.H., 1990. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43, 55-64.
- Guzick D.S. Overstreet J.W., Factor-Litvak P., Brazil C.K., Nakajima S.T., Coutifaris C., 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med.*, 345(19), 1388-93.
- Hallap H., Jaakma U., Rodriguez-Martinez H., 2006. Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reprod. Dom. Anim.*, 41, 214-8.
- Hammerstedt R.H., Hay S.R., Amann R.P., 1982. Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol. Reprod.*, 27, 745-54.
- Hayasaka S., Terada Y., Inoue N., Okabe M., Yagashi N., 2007. Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertil. Steril.*, 88(1), 214-6.
- Haugland R. *Molecular probes handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6ed, 1996, 14p.
- He Z. Y., Brakebusch C., Fassler R., Kreidberg J. A., Primakoff P., Myles D. G., 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev. Biol.*, 254, 226-37.
- Hemler M. E., 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19, 397-422.
- Hess R.A., França L.R. Structure of the Sertoli cell. In: Skinner M.K., Giswold M.D. (Eds). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005:19-40p.
- Hod Y., Pentiyala S.N., Whyard T.C., El-Maghrabi M.R., 1999. Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction. *J. Cell Biochem.*, 72, 435-44.
- Holt W.V., North R.D., 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.*,

230, 473-83.

- Holt C., Holt W.V., Moore H.D.M., Reed H.C.B., Curnock R.M., 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.*, 18, 312-23.
- Hunnicut G.R., Koppel D.E., Myles D.G., 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev. Biol.*, 91, 146-59.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2005/default.shtm> Acesso em: 25 out 2007.
- Inoue N., Ikawa M., Isotani A., Okabe M., 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434, 234-8.
- Januskauskas A., Soderquist L., Haard M.G., Haard M.C., Lundeheim N., Rodríguez-Martínez H., 1996. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish red and white A.I. bulls. *Acta Vet. Scand.*, 37(4), 461-70.
- Januskauskas A., Johanimsson A., Rodriguez-Martinez, H., 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60, 743-58.
- Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H., 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 197(3), 389-94.
- Jasko D.J., Little T.V., Lein D.H., Foote R.H., 1992. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 200 (7), 979-85.
- 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, 255-66.

- Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Wald V.B., Horn A.P., Mattos R.C., 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 63, 2053-62.
- Jones R., James P.S, Howes L., Bruckbauer A., Klenerman D., 2007. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J. Androl.*, 9 (4), 438-44.
- Kaydos E.H., Suarez J.D., Roberts N.L., Bobseine K., Zucker R., Laskey J., Klinefelter G.R., 2004. Haloacid induced alterations in fertility and the sperm biomarker SP22 in the rat are additive: validation of an ELISA. *Toxicol. Sci.*, 81(2), 430-42.
- Kerr J.B., Maddocks S., Sharpe R.M., 1992. Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res.*, 268, 179-89.
- Killian G.J., Chapman D.A., Rogowski L.A., 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 49, 1202-7.
- Kinloch R. A., Sakai Y., Wassarman P.M., 1995. Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 263-7.
- Kjaestad H., Ropstad E., Berg K.A., 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 34, 299-303.
- Klinefelter G.R., Laskey J.W., Ferrell J., Suarez J.D., Roberts N.L., 1997. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *J. Androl.*, 18, 139-150.
- Klinefelter G.R., Welch J.E., 1999. The saga of a male fertility protein (SP22). *Annu. Rev. Biomed. Sci.*, 1, 145-84.
- Klinefelter G.R., Strader L.F., Suarez J.D., Roberts N.L., 2002a. Bromochloroacetic acid exerts qualitative effects on rat sperm: implications for a novel biomarker. *Toxicol. Sci.*, 68, 164-73.
- Klinefelter G.R., Welch J.E., Perreault S.D., Moore H.D., Zucker R.M., Suarez J.D., Roberts N.L., Bobseine K., Jeffay S., 2002b. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility *in vivo* and *in vitro*. *J. Androl.*, 23, 48-63.
- Klinefelter G.R., Strader L.F., Suarez J.D., Roberts N.L., Goldman J.M., Murr A., 2004.

- Continuous exposure to dibromoacetic acid delay pubertal development and compromises sperm quality in the rat. *Toxicol. Sci.*, 81, 419-29.
- Kohane A.C., Gonzalez -Echeverria F.M., Pineiro L., Blaquier J.A., 1980. Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 23, 737-42.
- Kuisma P., Andersson M., Koskinen E., Katila T., 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet. Scand.*, 48(14) doi:10.1186/1751-0147-48-14.
- Lavara R., Moce E., Lavara F., Castro M.P.V., Vicente J.S., 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits. *Theriogenology*, 64, 1130-41.
- Le Naour F., Rubinstein E., Jasmin C., Prenant M., Boucheix C., 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 287, 319–21.
- Lin Y., Mahan K., Lathrop W.E., Myles D.G., Primakoff P., 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein ph-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.*, 125(5), 1157-63.
- Lipsett M.B., 1976. Regulation of testicular functions. *Andrologia*, 8, 43-60.
- Lum L., Blobel C.P., 1997. Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev. Biol.*, 191, 131-45.
- Maleszewski M., Kimura Y., Yanagimachi R., 1996. Sperm membrane incorporation into oolemma contributes to the oolemma block to sperm penetration: evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.*, 44, 256-9.
- Manjunath P., Chandonnet L., Leblond E., Desnoyers L., 1993. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 49, 27-37.
- Manjunath P., Nauc V., Bergeron A., Ménard M., 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, 67, 1250-8.
- McAvey B. A., Wortzman G. B., Williams C. J., Evans J. P., 2002. Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol. Reprod.*, 67, 1342-52.

- Meachem S.J., McLachlam R.I., Stanton P.G., Robertson D.M., Wreford N.G., 1999. FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J. Androl.*, 20, 756-62.
- Miller B. J., Georges-Labouesse E., Primakoff P., Myles D. G., 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6 \beta 1$ and is CD9-dependent. *J. Cell Biol.*, 149, 1289-96.
- Milne C., 2000. The history of the Dorper sheep. *Small Rumin. Res.*, 36, 99-102.
- Mortimer S.T., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3, 403-39.
- Miyado K., Yamada G., Yamada S., Hasuwa H., Nakamura Y., Ryu F., et al., 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 287, 321-4.
- Nassar A., Mahony M., Morshedi M., Lin M.H., Srisombut C., Oehninger S., 1999. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil. Steril.*, 71, 919-923.
- Núñez-Martínez I., Moran J.M., Peña F.J., 2006. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 41, 408-15.
- Parrila I., Vazquez J.M., Gil M.A., Caballero I., Alminana C., Roca J., Martinez E.A., 2004. Presence of seminal plasma improves penetration rates of flow sorted boar spermatozoa. *Reprod. Domestic Anim.*, 39, 278.
- Peña A.I., 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83, 209-24.
- Pérez L. J., Valcárcel A., De Las Heras M. A., Moses D., Baldassarre H., 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 46, 131-40.
- Pérez L.J., Valcárcel A., De las Heras M.A., Baldassarre H., 1997. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in bovine and bovine frozen-thawed samples. *Reprod. Dom. Anim.*, 32, 157-60.
- Popwell J.M., Flowers W.L., 2004. Viability in relationships between semen quality and

- estimates of *in vivo* and *in vitro* fertility in boars. Anim. Reprod. Sci., 81, 97-113.
- Primakoff P., Hyatt H., Tredick-Kline J., 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. J. Cell Biol., 104, 141-49.
- Primakoff P., Myles D.G., 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. Trends Genet. 16, 83-7.
- Primakoff P., Myles D.G., 2002. Sperm-egg interaction penetration, adhesion, and fusion in mammalian. Science, 296, 2183.
- Pukazhenthil B.S., Wildt D.E., Ottinger M.A., Howard J., 1998. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. Mol. Reprod. Dev., 49, 48-57.
- Quintero-Moreno A., Miró J., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. Theriogenology, 59, 1973-90.
- Quintero-Moreno A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. Theriogenology, 61, 673-90.
- Ralt D., Goldenberg M., Fetterolf P., Thompson D., Dor J., Mashlach S., Garbens D.L., Eisenbach M., 1991. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 2840-4.
- Rathi R., Colenbrander B., Bevers M.M., Gadella B.M., 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. Biol. Reprod., 65, 462-470.
- Rege J.E.O., Toe F., Mukasa-Mugerwa E., Tembely S., Anindo D., Baker R.L., Lahlou-Kassi A., 2000. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. Small Rumin. Res., 37, 173-87.
- Rijsselaere T., Soom A.V., Maes D., Kruif A., 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology, 60, 1553-68.
- Rochwerger L., Cuasnicu P.S., 1992. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein

- after *in vitro* and *in vivo* capacitation. Mol. Reprod. Dev., 31, 34-41.
- Rodríguez-Martínez H., Larson B., Zhang B.R., Soderquist L., 1997. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. J. Reprod. Dev., 43, 1-11.
- Rogers B., Bentwood B., Campen H., Helmbrecht G., Soderdahl D., Hale R., 1983. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. J. Androl., 4, 119-25.
- Roncoletta M., Morani E.S.C., Esper C.R., Barnabé V.H., Franceschini P.H., 2006. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. Anim. Reprod. Sci., 91, 77-87.
- Rubinstein E., Ziyat A., Wolf J.P., Le Naour F., Boucheix C., 2006a. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. Semin. Cell Dev. Biol., 17, 254-63.
- Rubinstein E., Ziyat A., Prenant M., Wrobel E., Wolf J.P., Levy S., Le Naour F., Boucheix C., 2006b. Reduced fertility of female mice lacking CD81. Dev. Biol., 290, 351-358.
- Russel L.D., Ettlin R., Hikim A.P.S., Clegg E.D. Mammalian spermatogenesis. In: Russel L.D., Ettlin R., Hikim A.P.S., Clegg E.D. (Eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, 1990: 1-40p.
- Sharpe R.M., Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill J.D. (Eds). The physiology of reproduction. 2ed. Vol.2, New York: Raven Press; 1994:1363-434p.
- 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, 633-42.
- Skinner M.K. Sertoli cell-somatic cell interactions. In: Skinner M.K., Giswold M.D. (Eds). Sertoli cell biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005a: 317-28p.
- Skinner M.K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: Skinner M.K., Giswold M.D. (Eds). Sertoli cell biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005b:107-20p.
- Söderquist L., Madrid-Bury N., Rodríguez-Martínez H., 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. Theriogenology, 48, 1115-25.
- Sousa D.B. Variabilidade das sub-populações de espermatozoides avaliadas pela cinética

- em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos. Botucatu: UNESP, FMVZ, 2007, 123p. (Tese, Doutorado).
- Strzezek J., Wysocki P., Kordan W., Kuklinska M., 2005. Proteomics of boar seminal plasma current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod. Biol.*, 5(3), 279-90.
- Sullivan R., 2004. Male fertility markers, myth or reality. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83, 341-7.
- Talbot P., Shur B.D., Myles D.G., 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.*, 68, 1-9.
- Thérien I., Moreau R., Manjunath P., 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, 59, 768-76.
- Thérien I., Moreau R., Manjunath P., 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, 61, 590-8.
- Veeramachaneni D.N.R., Palmer J.S., Klinefelter G.R., 2007. Chronic exposure to low levels of dibromoacetic acid, a water disinfection by-product, adversely affects reproductive function in male rabbits. *J. Androl.*, 28(4), 565-77.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-79.
- Visconti P.E., Stewart-Savage J., Blasco A., Battaglia L., Miranda P., Kopf G.S., Tezo J.G., 1999. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol. Reprod.*, 61, 76-84.
- Yamato F.N., Favareto A.P.A., Nishida S.M., Klinefelter G.R., Kempinas W.G. Immunolocalization of the SP22 sperm protein in Japanese quail (*Coturnix japonica*) - Preliminary data. *In: I Workshop on Male Reproductive Biology*, 2007.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *In: Knobil E., Neil J.D. (Eds). The physiology of*

- reproduction. 3ed. Vol. 1, San Diego: Elsevier Academic Press, 2006: 55-112p.
- Yuan R., Primakoff P., Myles D.G., 1997. A role for desintegrin domain of cyristestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J. Cell Biol.*, 137(1), 105-12.
- Wagenfeld A., Ching-Hei Y., Strupat K., Cooper T.G., 1998. Shedding of a rat epididymal sperm protein associated with infertility induced by ornidazole and α -chlorohydrin. *Biol. Reprod.*, 58, 1257-65.
- Wagenfeld A., Ching-Hei Y., Shivaji S., Vetaikorumagan R., Sundareswaran H.A., Cooper T.G., 2000. Expression and cellular localization of contraception-associated protein 1. *J. Androl.*, 21, 954-63.
- Ward C.R., Storey B.T., Kopf G.S., 1994. Selective activation of G_{i1} and G_{i2} in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 269, 13254-58.
- Wassarman P.M., 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 415-42.
- Welch J.E., Barbee R.R., Roberts N.L., Suarez J.D., Klinefelter G.R., 1998. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family. *J. Androl.*, 19, 385-92.
- Whyard T.C., Cheung W., Sheynkin Y., Waltzer W.C., Hod Y., 2000. Identification of RS as a flagellar and head sperm protein. *Mol. Reprod. Dev.*, 55(2), 189-96.
- Zhang B.R., Larsson B., Lundeheim N., Rodríguez-Martínez H., 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl.*, 21, 207-16.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada Imunolocalização e quantificação da proteína SP22 em espermatozóides de ovinos e sua relação com outros parâmetros espermáticos:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 45/06-CEEA).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



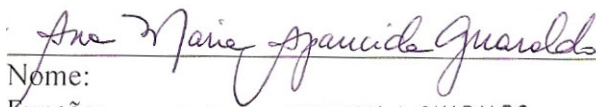
Aluno(a): Ana Paula Alves Favareto



Orientador(a): Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP



Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências

**CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 45/06-CEEA, sobre *“Validação de um biomarcador de fertilidade em carneiros”*, sob a responsabilidade de WILMA DE GRAVA KEMPINAS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de 28/09/06.

Botucatu, 28 de setembro de 2006.

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS GANEO DE MELLO
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA