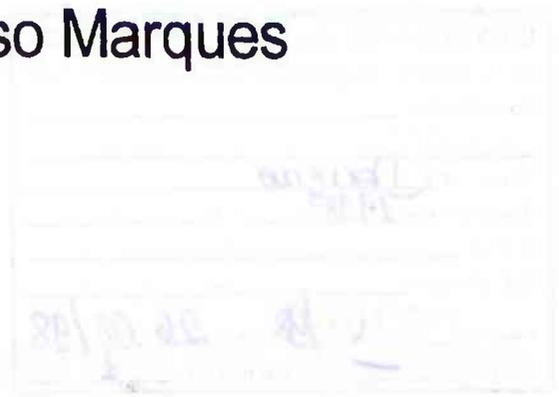


Vivian Alonso Marques



**Análises Bioquímicas do Sêmen
Congelado Bovino e Interações com
a Reação Acrossômica**

Uberlândia - MG

Março - 1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
DIRETORIA DO SISTEMA DE BIBLIOTECAS
Procedência : _____
Valor \$: 10000
Recebido em: 1998 / ____ / ____ N.F. ____ / ____
O. P. D. ____ / ____ / ____
N.F. / Fatura: ____ de ____ / ____ / ____
Registro: 06300/98 Data: 26/08/98
Volume: — Exemplar: 1

FU-00009273-1

Universidade Federal de Uberlândia
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

MON
636-2.082.1
M 357 a
TES/MEH

Análises Bioquímicas do Sêmen Congelado Bovino e Interações com a Reação Acrossômica

Vivian Alonso Marques

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Genética e
Bioquímica, área de concentração Genética.

Uberlândia - MG
Março - 1998

DIRBI/UFU



1000162996

M357a Marques, Vivian Alonso, 1969 -

Análises bioquímicas do sêmen congelado bovino e interações com a reação acrossômica / Vivian Alonso Marques -- Uberlândia, 1998.

65f.: il.

Orientador: : Luiz Ricardo Goulart Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Uberlândia.

Centro de Ciências Biomédicas.

Bibliografia: f. 49 -- 65.

1. Animais -- Melhoramento genético. 2. Bovino -- Melhoramento genético. 3. Genética animal. I. Universidade Federal de Uberlândia.

II. Título.

CDU: 636.082.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 24

38400-902. UBERLÂNDIA – MG

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1- **TÍTULO DA TESE:** Análises bioquímicas do sêmen congelado bovino e interações com a reação acrossômica

2- **ALUNA:** Vivian Alonso Marques

3- **PROFESSOR ORIENTADOR:** Luiz Ricardo Goulart Filho

4- **DATA:** 24-04-98

5- **BANCA EXAMINADORA:**

Titular: Luiz Ricardo Goulart Filho

Titular: Antônio Emídeo Dias Feliciano Silva

Titular: Isabel Regina Scheid

Suplente: Amélia Amagachi

Suplente: Maria Inês Homsí Brandeburgo

Ao meu marido *Luiz Carlos* e aos meus pais *Vanderlei e Adelaide*,

Com muito amor, dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado durante os anos de 1996 e 1997 no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Pós-Graduação de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. Eu gostaria de agradecer aos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos e de modo especial agradeço:

- ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho pelo apoio, otimismo e inspiração que obtive durante todo o meu trabalho e onde foi o exemplo de pesquisador e professor;
- ao professor Dr. Warwick Estevan Kerr por nos mostrar como é bom e gratificante ser um pesquisador;
- ao companheirismo, auxílio e otimismo de todos os meus colegas dos laboratórios de Genética e Bioquímica;
- à Dra. Lúcia Helena da Lagoa da Serra, Inseminação Artificial, ao Sr. Sérgio Nogueira e Dr. Fernando Vieira Vilela da Pecplan ABS pelo fornecimento de sêmen, sem o qual não seria possível realizar este trabalho;
- aos professores e técnicos do Departamento de Produção Animal (Setor de Reprodução Animal) e Departamento de Agronomia (Laboratório de análise foliar e fertilizantes) da Universidade Federal de Uberlândia;
- ao Dr. Antônio Emídio Feliciano Silva do Cenargen (Centro Nacional de Recursos Genéticos), Embrapa de Brasília, pela disponibilidade e ensinamentos;
- ao apoio e estímulo de meu querido marido Luiz Carlos, meus pais Vanderlei e Adelaide e minhas irmãs Valquiria, Iara e Tânia.

SUMÁRIO

ABREVIACÕES	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Proteínas do sêmen	03
2.1.1. Proteínas totais do espermatozóide	03
2.1.2. Proteínas de membrana do espermatozóide	04
2.1.3. Proteínas do plasma seminal	08
2.1.4. Fosfolipase A ₂	09
2.1.4.1. Nomenclatura das fosfolipases	09
2.1.4.2. Classificação das fosfolipases	09
2.1.4.3. Fosfolipase A ₂ no sistema reprodutivo masculino	10
2.1.4.4. Papel da fosfolipase A ₂ na reprodução masculina	10
2.1.4.5. Regulação da atividade da fosfolipase A ₂ ..	11
2.2. Fluxo de cálcio no sêmen	13
2.2.1. Canais de cálcio	13
2.2.2. Modelos de alterações do fluxo de cálcio no sêmen	14
2.2.3. Variação do fluxo de cálcio em sêmen congelado ..	16
2.2.4. Papel do fluxo de cálcio no sêmen	16
2.3. Reação acrossômica	17
2.3.1. Estrutura do espermatozóide	17

2.3.2. Morfologia da reação acrossômica	18
2.3.3. Indutores da reação acrossômica	19
2.3.4. Moduladores da reação acrossômica	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Material biológico	22
3.2. Extração de proteínas totais do espermatozóide	22
3.3. Extração de proteínas de membrana do espermatozóide	23
3.4. Extração de proteínas do plasma seminal	23
3.5. Quantificação de proteínas	23
3.6. Estudos eletroforéticos	24
3.7. Atividade fosfolipásica	25
3.8. Dosagem de cálcio no plasma seminal bovino	26
3.9. Reação Acrossômica	26
3.10. Análises dos géis	28
3.11. Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Perfil eletroforético das proteínas do sêmen	29
4.2. Análise da atividade da enzima fosfolipase A ₂	34
4.3. Análise da concentração de cálcio no plasma seminal bovino	39
4.4. Análise da reação acrossômica	42
4.5. Correlação das proteínas dos espermatozóides, do plasma seminal, atividade da enzima fosfolipase A ₂ , cálcio do plasma seminal e reação acrossômica	44
5. CONCLUSÕES	47
6. BIBLIOGRAFIA	49

ABREVIações

Universidade Federal de Uberlândia
BIBLIOTECA

AC	adenil ciclase
BSA	soro albumina bovina
BSP	plasma seminal bovino
°C	graus Celsius
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CICR	cálcio induzido, cálcio liberado
cm	centímetro
DAG	diacilglicerol
GTP	guanosina trifosfato
IP3	inositol trifosfato
IP3R	receptor inositol trifosfato
kDa	kiloDaltons
M	Molar
ml	mililitros
mm	milímetros
ul	microlitros
nm	nanômetro
P	progesterona
PBA	tampão fosfato salino
PI	fosfatidilinositol
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PKC	proteína Kinase C
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
RA	reação acrossômica
RPM	rotações por minuto
RYR	receptor rhyrodine
SDS	sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	eletroforese de gel desnaturante
ZP	zona pelúcida
ZP1	glicoproteína da zona pelúcida 1
ZP2	glicoproteína da zona pelúcida 2
ZP3	glicoproteína da zona pelúcida 3
ZRK	receptor tirosina quinase

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama esquemático da ligação do espermatozóide ao óvulo e indução da reação acrossômica.....	06
2	Representação esquemática modificada do mecanismo de regulação da atividade PLA ₂ (Chang et al., 1987).....	12
3	Representação esquemática de dois modelos de indução da reação acrossômica pelo fluxo de cálcio. 1º modelo em verde (albumina deestabiliza a membrana plasmática aumentando a permeabilidade para o cálcio); 2º modelo em azul (ativação de receptores G1 pela ZP3 ativam a PLC que hidrolisa fostatidilcolina em IP ₃ e DAG. IP ₃ se liga ao seu receptor e libera cálcio);	15
4	Eletroforese em SDS-PAGE 14% de proteínas totais dos espermatozóides bovino. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-6H. (1) Guzerá; (2) Holandesa; (3) Holandesa; (4) Holandesa; (5) Gir; (6) Holandesa ; (7) Simental ; (8) Limousin; (9) Gir; (10) Nelore; (11) Nelore	31

- 5 Eletroforese em SDS-PAGE 14% de proteínas da membrana dos espermatozóides bovino. (PM) Padrão de Peso Molecular SDS-6H. (1) Nelore ; (2) Nelore ; (3) Limousin; (4) Simental; (5) Nelore; (6) Gir; (7) Holandês; (8) Limousin..... 32
- 6 Eletroforese em SDS-PAGE 14% de proteínas do plasma seminal bovino. (PM1) Padrão de Peso Molecular SDS-6H e (PM2) Dalton Mark. (1)Gir; (2) Gir; (3) Gir; (4) Nelore; (5) Simental; (6) Holandesa; (7) Holandesa; (8) Diluente do sêmen..... 33
- 7 Determinação do comprimento de onda para medir a atividade da fosfolipase A_2 por meio de espectrofotometria..... 35
- 8 Curva padrão da atividade enzimática da fosfolipase A_2 de veneno de serpente..... 36
- 9 Foto com aumento 1.000x de espermatozóide bovino. Espermatozóide com acrossoma reagido (RA positivo) e espermatozóide com acrossoma não reagido (RA negativo)..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Análise de variância para a atividade da enzima fosfolipase A ₂ do espermatozóide bovino.....	37
2	Comparação de médias da atividade da fosfolipase A ₂ em sêmen de 31 touros.....	38
3	Análise de variância para a concentração de cálcio do plasma seminal bovino.....	40
4	Comparação de médias das concentrações de cálcio no plasma seminal bovino de 37 amostras.....	41
5	Motilidade e vigor do sêmen durante a reação acrossômica <i>in vitro</i>	42
6	Índice de reação acrossômica do sêmen de 14 amostras.....	44
7	Correlação entre proteínas do sêmen bovino e concentração do cálcio do plasma seminal bovino.....	45
8	Correlação entre proteínas do sêmen bovino, atividade PLA ₂ , concentração de ions cálcio do plasma seminal e reação acrossômica.....	46

RESUMO

ALONSO-MARQUES, Vivian. Análises Bioquímicas do Sêmen Congelado Bovino e Interações com a Reação Acrossômica .

Proteínas e íons têm um papel importante na ligação do espermatozóide ao óvulo no início da fertilização. Alterações de algumas proteínas e íons no espermatozóide podem contribuir para a deficiência da reação acrossômica e ter consequências na fertilidade. O cálcio tem um papel integral na capacitação e reação acrossômica e várias proteínas que constituem os espermatozóides já foram citadas como sendo proteínas de ligação ao óvulo, dentre elas a D-manosidase, HIS-50 e HIS-100, galactosiltransferase, receptor tirosina quinase (ZRK), receptor galactosil, PH20, sp56 e PLA₂. Em vista destes aspectos, este estudo teve por objetivo analisar e correlacionar as proteínas do sêmen congelado bovino de várias raças, a concentração de íons cálcio do plasma seminal e a atividade da fosfolipase A₂ do espermatozóide com a reação acrossômica para encontrar fatores que influenciem no processo de fertilização bovina. A análise dos perfis eletroforéticos das proteínas (totais e de membrana) do espermatozóide e do plasma seminal bovino revelou variabilidade proteica entre touros, onde foram identificadas diferenças qualitativas e quantitativas de proteínas que podem ser proteínas de grande importância na ligação do espermatozóide ao óvulo e na indução da reação acrossômica. A técnica desenvolvida por espectrofotometria com o uso de Rodamina 6G e lecitina de ovo detectou atividade da fosfolipase A₂ de 0,001 à 2,8 unidades/minuto/microlitro. Sua quantificação revelou diversidade genética entre indivíduos. A concentração de cálcio do plasma seminal bovino revelou diferenças significativas entre touros, indicando que deve existir um controle genético para a liberação de cálcio extracelular. O coeficiente de correlação entre concentração de cálcio do plasma seminal bovino e proteínas do sêmen com massas moleculares de aproximadamente 31, 27, 20, 18 e 16 kDa do espermatozóide, bem como as proteínas de 29, 18 e 16 kDa do plasma seminal foram significativos, podendo estar atuando na ativação do fluxo de

cálcio extracelular ou inibição, como é o caso das proteínas de 31 kDa do espermatozóide e 16 kDa do plasma seminal que apresentaram um coeficiente de correlação negativo. A proteína de membrana de 15,7 kDa apresentou correlação positiva significativa (0,71) com a reação acrossômica, sendo provavelmente uma ZRK que é uma proteína importante na ligação do espermatozóide ao óvulo. A proteína de 31,1 kDa apresentou um coeficiente de correlação negativo (0,61). A proteína de 15,7 kDa deve ser um fator de maior importância podendo ser utilizada como um marcador molecular para a fertilidade na análise de sêmen bovino. Como já descrito, a PLA_2 e o cálcio possuem grande importância na reação acrossômica, mas de acordo com os resultados obtidos não existiu correlação significativa entre eles, sugerindo que as quantidades de cálcio e PLA_2 , mesmo significativamente diferentes entre touros, podem ser suficientes para induzir a RA, tornando-se então fatores secundários para o processo de fertilização bovina. Com base nestes resultados observou-se que a fertilização bovina é um processo complexo multifatorial, onde seu estudo não se limita somente a um controle genético, mas também a um controle ambiental.

SUMMARY

ALONSO-MARQUES, Vivian. Biochemical analysis of the Bovine Frozen Semen and Interactions with the Acrosome Reaction.

Proteins and ions have an important role in the binding of the spermatozoa to the ovum in the beginning of the fertilization. Alterations of some proteins and ions in the spermatozoa can contribute to the deficiency of the acrosome reaction and consequently to the fertility. The calcium has an integral role in the capacitation and acrosome reaction. Several proteins that constitute the spermatozoa were already mentioned as being binding proteins to the ovum, such as: D-mannosidase, HIS-50 and HIS-100, galactosyltransferase, receptor tyrosine kinase (ZRK), receptor galactosyl, PH20, sp56 and PLA₂. In view of these aspects, the objective of this study was to analyze and to correlate the proteins of the bovine frozen semen of several breeds, the concentration of calcium ions of the seminal plasma and the activity of the enzyme phospholipase A₂ of the spermatozoa with the acrosome reaction to find factors that influence in the process of bovine fertilization. The analysis of the electrophoretic profiles of the proteins (total and membrane) of the spermatozoa and of the bovine seminal plasma revealed protein variability among bulls, qualitative and quantitative differences of proteins were identified in agreement with its molecular masses of 66 kDa (ZRK or HIS-50), 30-36 kDa (dimeric form of ZRK), 20 kDa (PH20) and 14-18 kDa (ZRK or PLA₂) they can be proteins of great importance in the binding of the spermatozoa to the ovum and in the induction of the acrosome reaction. The technique developed by spectrophotometry with the use of Rhodamine 6G and egg lecithin detected activity of the phospholipase A₂ from 0,001 to 2,8 unit/min/ul. Its quantification revealed diversity among individuals. The concentration of calcium of the bovine seminal plasma revealed significant differences among bulls, indicating that genetic control should exist for the release of extracellular calcium. The correlation coefficient between concentration of calcium of the bovine seminal plasma and proteins of the semen with molecular masses of approximately 31, 27, 20, 18 and 16 kDa of the

spermatozoa, as well as the proteins of 29, 18 and 16 kDa of the seminal plasma were significant, and could be acting in the activation of the extracellular calcium flow or inhibition, as it is the case of the proteins of 31 kDa of the spermatozoa and 16 kDa of the seminal plasma that presented negative correlation coefficients. The membrane protein of 15,7 kDa presented significant positive correlation (0,71) with the acrosome reaction, and this could probably be a ZRK an important protein in the binding of the spermatozoa to the ovum. The protein of 31,1 kDa presented a negative correlation coefficient (0,61). The protein of 15,7 kDa should be a factor of great importance, and could be used as a molecular marker for the fertility in the analysis of bovine semen. As already described, the PLA₂ and the calcium possess great importance in the acrosome reaction; however, there was no significant correlation among them and the acrosome reaction, suggesting that the amounts of calcium and PLA₂, although significantly different among bulls, were enough to induce the acrosome reaction, becoming secondary factors of the process of bovine fertilization. These results indicate that the bovine fertilization is a complex multifactorial process, to which the fertilization can not be limited to a genetic control, but also to the environment.

1- INTRODUÇÃO

Fertilização é uma das mais meticulosas interações célula-célula reguladas no organismo animal. Neste trabalho procurou-se estudar os mecanismos que originam alterações na capacidade de fertilização do espermatozóide, como a constituição de suas proteínas, dando ênfase a fosfolipase A_2 , a concentração de íons cálcio e suas interações com a reação acrossômica (RA), que segundo FELICIANO SILVA et al. (1996) tem relação com a fertilidade. As informações derivadas deste estudo é diretamente importante na genética e bioquímica do melhoramento animal. A Inseminação Artificial, Transferência de Embriões e Fecundação *in vitro* são técnicas que estão sendo mais e mais utilizadas em reprodução bovina para o melhoramento genético animal. As vantagens da utilização destas técnicas para produção animal são aumentadas pelo sucesso do congelamento do sêmen (RENARD, 1984). Este processo pode causar uma perda da motilidade do espermatozóide e uma morfologia anormal acrossômica, que podem parcialmente reduzir o sucesso da fertilização, sendo assim importante determinar quais os outros fatores envolvidos nas alterações do sêmen bovino que diminuem a taxa de fertilidade (KARABINUS et al., 1991).

Proteínas e íons têm um papel importante na ligação do espermatozóide e do óvulo para iniciar a fertilização. Alterações de algumas proteínas e íons no espermatozóide podem contribuir para a deficiência da reação acrossômica e conseqüentemente para a fertilidade bovina. Segundo YANAGIMACHI (1988) o cálcio tem um papel integral na capacitação e RA. Várias proteínas que constituem o espermatozóide já foram citadas como sendo proteínas de ligação do óvulo: D-manosidase (TULSIANI et al., 1990), HIS-50 E HIS-100 (DYSON e ORGEBIN-CRIST, 1973), galactosiltransferase (SHUR e NEELY, 1988), (ZRK) receptor tirosina quinase (LEYTON e SALING, 1989), receptor galactosil

(ABDULLAH et al., 1991), PH20 (LIN et al., 1995), sp56 (BOOKBINDER et al., 1995) e PLA₂ (WEINMAN et al., 1986).

Durante milhões de anos, a evolução tem lentamente alterado o código de genes de proteínas da zona pelúcida e do sêmen. Raposas e gatos por exemplo, herdaram o mesmo grupo básico de genes de um ancestral carnívoro, no qual estes genes são ainda similares em seu código de DNA (ácido desoxirribonucléico) e performam funções similares, que lentamente, ao acaso, acumularam mutações durante milhões de anos produzindo diferenças entre proteínas em cada espécie.

Os objetivos deste estudo foram:

- analisar o perfil eletroforético de proteínas totais e de membrana do espermatozóide;
- analisar o perfil eletroforético de proteínas do plasma seminal;
- quantificar íons cálcio presentes no plasma seminal e analisar diferenças significativas entre touros;
- quantificar a atividade fosfolipásica dos espermatozóides e analisar diferenças significativas entre touros;
- analisar a capacidade de sofrer reação acrossômica em sêmen de diferentes touros;
- correlacionar proteínas do sêmen, concentração de cálcio no plasma seminal, atividade fosfolipásica do espermatozóide e reação acrossômica.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROTEÍNAS DO SÊMEN

2.1.1. Proteínas totais do espermatozóide

A camada externa do óvulo maduro, esperando que a fertilização no trato reprodutivo feminino aconteça, é composto por um complexo de glicoproteínas chamado de zona pelúcida (ZP). Estas proteínas têm uma grande interação bioquímica com as proteínas da cabeça do espermatozóide, onde sem esta interação o espermatozóide não poderia penetrar a zona pelúcida para fertilizar o óvulo.

Somente limitadas informações existem sobre identidades moleculares e características bioquímicas dos componentes da superfície do espermatozóide envolvidos na ligação da zona pelúcida. Segundo WASSARMAN (1988) resultados do clone de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) dos genes da zona pelúcida e análises de sua composição em várias espécies, indicam que ela é constituída de três glicoproteínas (EPIFANO e DEAN, 1994). A zona pelúcida de óvulo de rato, uma das mais estudadas, é composta por glicoproteínas chamadas ZP1, ZP2 e ZP3 (WASSARMAN, 1988 e 1990). No entanto, a molécula na superfície do óvulo responsável por ligar e ativar o espermatozóide é a maior glicoproteína que constitui a zona pelúcida, a ZP3 (FLORMAN e WASSARMAN, 1985; ROSIERE e WASSARMAN, 1992).

Entretanto, a natureza da complementariedade de receptores na superfície que liga a ZP3 e os eventos bioquímicos de um subsequente sinal de transdução, são ainda desconhecidos. É possível que múltiplos receptores proteicos de ligação do espermatozóide possam estar envolvidos em mediar ações biológicas da ZP3, a ligação primária do espermatozóide e indução da reação acrossômica.

Esta múltipla interação da capacidade de se ligar, pode ser devido a diferentes domínios especializados em ZP3, que estão na superfície da cabeça do espermatozóide. Cada um destes domínios pode ser estruturalmente adequado ou especializado para interagir e/ou ativar uma proteína receptora de ligação do espermatozóide, permitindo a ligação do espermatozóide à ZP3, e subsequentemente induzindo a produção do segundo mensageiro intracelular que dispara a reação acrossômica. É também possível que ZP3 interaja e ative um tipo de receptor do espermatozóide com uma subsequente ativação de receptores. Diferentes proteínas receptoras podem juntas, constituir um complexo funcional receptor sinal-transdução que é capaz de traduzir sinais intracelulares para modular a reação acrossômica (MORALES e LLANOS, 1996). A proteína ZP3 que reage fortemente com as proteínas do espermatozóide está na região molecular 55 kDa (NAZ e AHMAD, 1994). A ZP2 e ZP3, depois da fertilização, sofrem mudanças moleculares que constituem um bloqueio para polispermia (BLEIL e WASSARMAN, 1983).

Uma proteína que pode estar envolvida na ligação da ZP e espermatozóide é a enzima D-manosidase (TULSIANI et al., 1990), que apresenta atividade em espermatozoides humanos e pode estar envolvida na ligação da ZP3 e indução da reação acrossômica (BENOFF et al., 1988).

2.1.2. Proteínas de membrana do espermatozóide

RIFKIN e OLSON (1985) e EPIFANO e DEAN (1994), caracterizaram em seus experimentos duas proteínas secretadas pelo epidídimo que ligam à superfície do espermatozóide durante sua maturação. Estas proteínas são removidas da membrana plasmática por meio de soluções de alta força iônica e podem ser classificadas como proteínas de membrana extrínscica. Elas migram diferentemente no SDS-PAGE (eletroforese de gel de poliácridamida desnaturante), exibindo um alto grau de similaridade imunológica e estrutural.

DYSON e ORGEBIN-CRIST (1973) detectaram a presença de polipeptídeos com massas moleculares de 100 e 66 kDa. No mapa peptídico HIS-50 indica que o polipeptídeo pode reassociar e sugere que HIS-100 possa

ser um dímero da forma HIS-50, que não é completamente dissociado sobre as condições usadas na eletroforese. As proteínas HIS primeiro aparecem na cauda proximal do epidídimo, que é a região onde o espermatozóide de rato apresenta um maior aumento na capacidade de fertilização, podendo ser um evento significativo no desenvolvimento da capacidade de fertilização pelo espermatozóide durante a maturação epididimal. Esta capacidade do espermatozóide se ligar a zona pelúcida pode estar relacionada com a deposição de proteínas na sua superfície durante o trânsito através do epidídimo (TEZON et al., 1985; citado por JEAN et al., 1995).

JEAN et al. (1995) extraiu de sêmen fértil humano proteínas da superfície dos espermatozoides com uma solução 0,6 M de Cloreto de Potássio, expôs este extrato a espermatozoides inférteis e o incubou juntamente com a zona pelúcida de óvulos, observando um aumento da capacidade de ligação do espermatozóide ao óvulo. Baseados nestes resultados, eles criaram duas hipóteses para mostrar como estes espermatozoides poderiam estar deficientes destas proteínas: a primeira hipótese seria que espermatozoides imaturos não receberam estas proteínas durante o trânsito no epidídimo e a segunda seria que sítios receptores específicos destas proteínas de superfície não são completamente saturadas na membrana plasmática do espermatozóide depois do trânsito através do epidídimo. Usando este extrato de proteínas de sêmen fértil, elas se ligariam aos espermatozoides, aumentando assim sua capacidade de ligação ao óvulo.

A respeito de proteínas de ligação do espermatozóide e do óvulo, muitas hipóteses ainda têm sido propostas, como mostra a Figura 1. Entre elas estão também a galactosiltransferase, uma proteína tirosina quinase, e um receptor usual de lectina galactosil (MORALES e LLANOS, 1996).

Galactosiltransferase é uma enzima localizada na membrana plasmática do espermatozóide que tem um papel definido no reconhecimento do gameta feminino em camundongos (SHUR e NEELY, 1988; BENOFF et al., 1988).

Receptor tirosina quinase (ZRK) pertence a uma classe de moléculas que pode estar relacionada com o reconhecimento e sinal de transdução da ZP3 (LEYTON e SALING, 1989). Exposição de espermatozoides humano e de camundongo para ZP3 resulta em uma rápida autofosforilação de resíduos

tirosina em uma kinase de 95 kDa (ZRK).

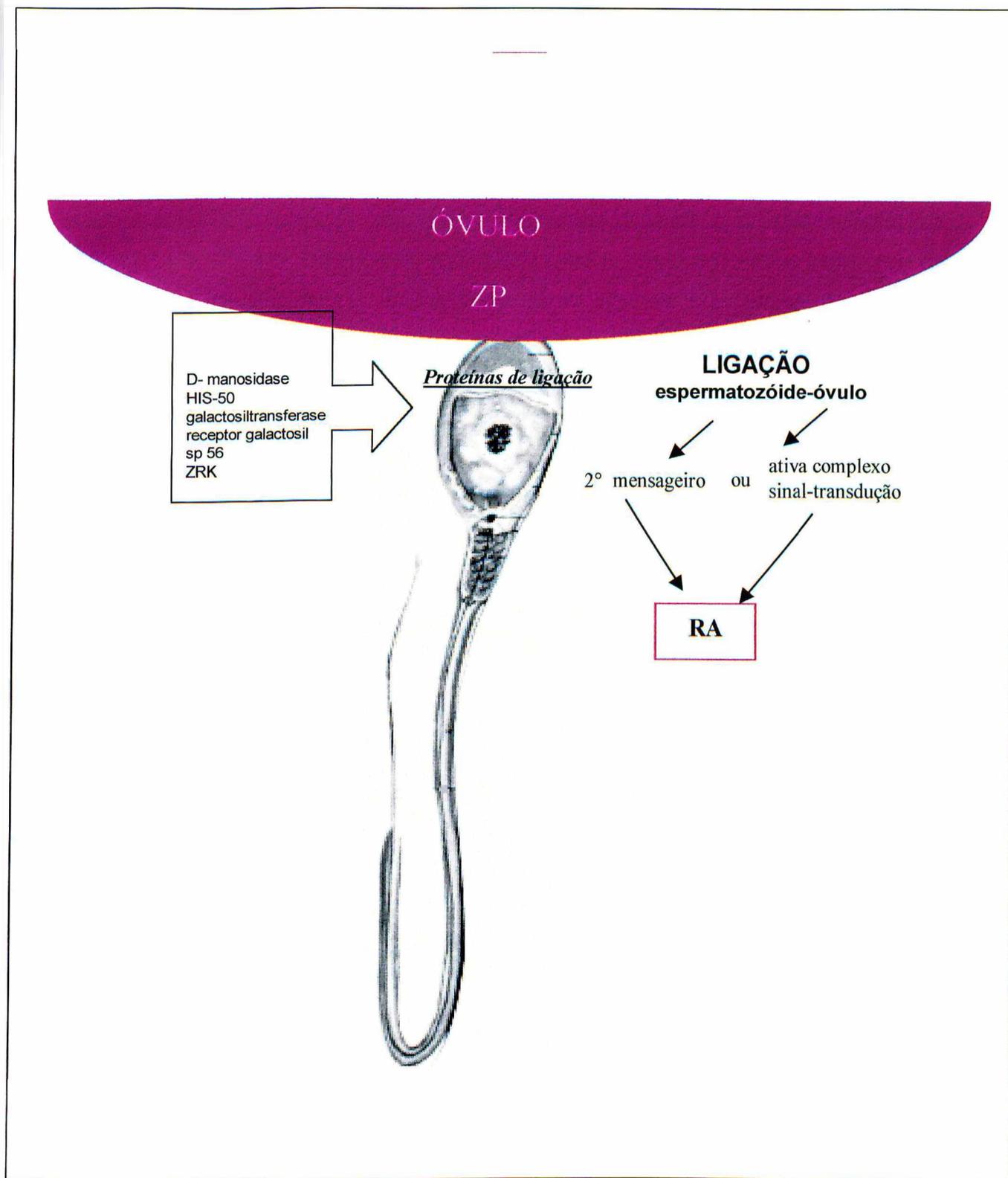


Figura 1. Diagrama esquemático da ligação do espermatozóide ao óvulo e indução de reação acossômica.

Segundo trabalhos realizados por LEYTON et al. (1992) e SALING (1991) uma proteína de 95 kDa, encontrada na superfície do espermatozóide, estimula um ligante no espermatozóide humano que é essencial para uma cascata regulatória de sinais para exocitose acrossômica se ligando a ZP3 e possuindo atividade tirosina kinase. Entretanto, a proteína de 95 kDa contendo fosfotirosina encontrada em um espermatozóide de camundongo tem sido apresentada como sendo uma única forma de hexokinase fosforilada (KALAB et al., 1994, citado por BAILEY e STOREY, 1994). NAZ e AHMAD (1994) relataram várias proteínas de espermatozóide que tem a capacidade de se ligarem a proteínas da ZP com massas moleculares de 95, 63, 51 e 14-18 kDa. KALAB et al. (1994), citado por BAILEY e STOREY (1994) isolou e purificou uma proteína de espermatozóide de camundongo com SDS-PAGE, onde encontrou propriedades idênticas a proteína ZRK, com massa molecular de 116 kDa em condições não redutoras e 95 kDa sob condições de redução. Estas proteínas apresentaram atividade de autofosforilação. Potencialmente, a proteína de 95 kDa corresponde a ZRK também descrita por BURKS et al. (1995 e 1996).

Receptor galactosil, tipo lectina C (dependente de cálcio) no espermatozóide humano pode ser um receptor de zona pelúcida (ABDULLAH et al., 1991; GOLUBOFF et al., 1995). Esta lectina é uma proteína transmembrana com domínios de reconhecimento de carboidrato no segmento extracelular C-terminal e um citoplasmático N-terminal. Ela foi caracterizada como um componente de proteína simples de 50 kDa na membrana plasmática da cabeça do espermatozóide e sobrepondo o acrossoma (GOLUBOFF et al., 1995). Segundo resultados obtidos por LOPEZ et al. (1985) a ligação dos gametas é mediada pela galactosiltransferase da superfície do espermatozóide, que reconhece e liga ao resíduo terminal N- acetilglicosamino na zona pelúcida. Em um trabalho, BOOK-BINDER et al. (1994), descreve o clone e sequenciamento do cDNA de uma molécula semelhante a lectina, localizada na cabeça do espermatozóide com uma massa molecular de 56 kDa; o cDNA codifica para uma proteína de 547 aminoácidos.

Em resposta ao sinal ou sinais derivados do óvulo, na hora de sua

fertilização, o espermatozóide sofre exocitose acrossomal (YANAGIMACHI, 1981). O ponto de vista geralmente aceito é que o espermatozóide atravessa o cumulus oóforus usando a atividade hialuronidase presente na proteína PH20, localizada na membrana plasmática da cabeça posterior (LIN et al., 1994). Então, os espermatozóides durante a fertilização, com seu acrossoma intacto, ligam as glicoproteínas ZP3 da zona pelúcida. Seguindo a estimulação por ZP3, o espermatozóide sofre a reação acrossômica.

2.1.3. Proteínas do plasma seminal

Muitos estudos sugerem que o plasma seminal, que consiste de uma complexa mistura de secreções originadas do testículo, epidídimo e glândulas secretórias, contém fatores que podem influenciar a capacidade de fertilização do espermatozóide. Interessantemente, as proteínas do plasma seminal bovino (BSP), também se ligam a heparina que é um glicosaminoglicano presente no trato reprodutivo feminino e parece participar do processo de capacitação espermática. Estas proteínas também têm a capacidade de se ligar a fosfolípidos, parecendo participar do metabolismo lipídico do espermatozóide e podendo ter um papel importante no fenômeno de capacitação (CHANDONNET et al., 1990).

THÉRIEN et al. (1995), também encontrou no plasma seminal bovino quatro proteínas ácidas (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30kDa), que são secretadas pela vesícula seminal cobrindo a superfície dos espermatozóides após a ejaculação, sugerindo que elas tenham participação nos fatores regulatórios de capacitação.

Estudos bioquímicos e ultraestruturais têm indicado que espermatozóides que sofrem capacitação exibem perda de componentes adsorvidos originalmente do plasma seminal, modificações da composição lipídica, aumento da permeabilidade de cálcio, redistribuição de componentes da membrana e mudanças na distribuição intramembrana (LANGLAIS e ROBERTS, 1985). Estas mudanças estruturais levam o espermatozóide para um segundo mecanismo, a fusão da membrana plasmática e membrana acrossomal externa.

2.1.4. Fosfolipase A₂ (PLA₂)

2.1.4.1. Nomenclatura das fosfolipases

A degradação de fosfolípidos de membrana é um processo catalizado por diferentes fosfolipases e lisofosfolipases (VAN DEN BOSCH, 1980; DENNIS, 1983). A molécula fosfolipídica é suscetível a hidrólise enzimática de diferentes fosfolipases que são classificadas em fosfolipases A₁, A₂, C, D e lisofosfolipases de acordo com sua especificidade de hidrólise (DENNIS, 1983). A fosfolipase A₂ hidrolisa a ligação éster na posição sn-2 da molécula fosfolipídica (DENNIS, 1983).

2.1.4.2. Classificação da fosfolipase A₂

PLA₂ são divididas em enzimas intracelular e extracelular de acordo com sua localização (VAN DEN BOSCH, 1980; DENNIS, 1983; DANIEL, 1985). PLA₂ extracelulares estão na forma solúvel e PLA₂ intracelulares podem estar ligadas a membrana ou na forma solúvel (VAN DEN BOSCH, 1980; DENNIS, 1983). Além disso, as PLA₂ intracelulares e extracelulares podem ser enzimas cálcio-dependentes ou cálcio-independentes (MARAGANORE et al., 1984; MARAGARONE e HEINRIKSON, 1986; PIERIK et al., 1988).

As PLA₂ são divididas em dois grupos, de acordo com o padrão dos resíduos de cisteínas encontrados na sequência, segundo HEINRIKSON et al. (1977):

-Grupo I são as enzimas que tem uma única ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteínas 11 e 69, e estão presentes no pâncreas de mamíferos e venenos de répteis, como de algumas espécies de serpentes;

-Grupo II são aquelas que possuem uma distinta extensão C-terminal de 5 resíduos, terminados por uma cisteína ligada a outra na posição 49 ou 50. Esta enzima está presente no intestino suíno (VERGER et al., 1982), líquido sinovial humano (SEILHAMER et al., 1989) e plasma seminal humano (TAKAYAMA et al., 1991).

2.1.4.3. Fosfolipase A₂ no sistema reprodutivo masculino

PLA₂ tem sido caracterizada em humano (TAKKAR et al., 1984; ANTAKI et al., 1988; GUÉRETTE et al., 1988; ANTAKI et al., 1989; FRY et al., 1992; LANGLAIS et al., 1992), suíno (ONO et al., 1982) hamster (LLANOS et al., 1982; ESPONDA et al., 1991), ovinos (ROLDAN et al., 1991), caprinos (ATREJA e ANAND, 1985) e espermatozóide de camundongo (TAKKAR et al., 1983).

Geralmente, estas enzimas têm as mesmas propriedades bioquímicas, um pH ótimo neutro e requerem cálcio. O massa molecular de 16,7 kDa tem sido obtido para PLA₂ purificada de espermatozóide humano (LANGLAIS et al., 1992).

Segundo WEINMAN et al. (1986) a PLA₂ está presente no plasma seminal, vesícula seminal, próstata além das várias partes do espermatozóide bovino, como a membrana plasmática, núcleo, acrossoma, flagelo, mitocôndria, e microtúbulos. Segundo RÖNKKÖ (1994) a PLA₂ do líquido da vesícula seminal bovina foi dissociada em duas bandas proteicas por SDS-PAGE, tendo elas massas moleculares de 15,0 e 16,0 kDa . Já no plasma seminal humano a PLA₂ pode ser dissociada em 2 subunidades com massas moleculares de 12,2 e 14,0 kDa (WURL e KUNZE, 1985).

2.1.4.4. Papel da fosfolipase A₂ na reprodução masculina

O espermatozóide de mamíferos sofre RA antes da fertilização normal (YANAGIMACHI, 1981; MEIZEL, 1984). Segundo resultados de RÖNKKÖ et al. (1994), PLA₂ purificadas do líquido da vesícula seminal são capazes de potencializar a reação acrossômica, já PLA₂ purificada de pâncreas bovino e veneno de *Crotalus adamanteus* não apresentaram esta propriedade. PLA₂ causa esta possível RA por catalisar a formação de lisofosfatidilcolina que tem sido apresentada como um potente fusogênico de membrana (POOL et al., 1970). A PLA₂ sendo uma proteína de membrana do espermatozóide pode participar da RA na presença de heparina e possivelmente na síntese de prostaglandina.

2.1.4.5. Regulação da atividade da fosfolipase A₂

A regulação endógena da PLA₂ é complexa e vários fatores afetam sua atividade (Figura 2). Um óbvio mecanismo regulatório é a formação da forma de proenzima da PLA₂ que requer clivagem proteolítica para se tornar ativa, como demonstrado em PLA₂ de espermatozóide humano por GUÉRETTE et al. (1988) e ANTAKI et al. (1989). Cálcio é outro fator regulador de todas as PLA₂ cálcio-dependentes (CHANG et al., 1987). Cálcio aumenta a atividade enzimática desde que seja essencial para a ligação ao substrato (DENNIS, 1983).

De acordo com DYCK e BUHR (1993) o processo de congelamento e descongelamento do sêmen suíno reduz a atividade da PLA₂ do espermatozóide para aproximadamente 50% da atividade obtida em sêmen fresco.

Muitas moléculas envolvidas na sinalização transmembrana podem afetar a atividade PLA₂. Após vários estudos, foi demonstrado que a indução da reação acrossômica pela zona pelúcida humana é mediada por uma proteína G1 do espermatozóide (LEE et al., 1992; FRANKEN et al., 1996). Isto é verdadeiro também para a indução da reação acrossômica em bovinos (ENDO e LEE, 1987; FLORMAN et al., 1989). Deste modo, depois do espermatozóide se ligar a zona pelúcida, uma proteína G1 pode ser um sinal de transdução crucial. Ativação de uma proteína G1 media a produção de sinais intracelulares envolvidos em eventos celulares e moleculares da reação acrossômica. Em outras células, as proteínas G1 estão envolvidas na regulação mediada por receptores da mobilização de cálcio, atividade da fosfolipase C e da adenil ciclase (AC) (SPIEGEL et al., 1988).

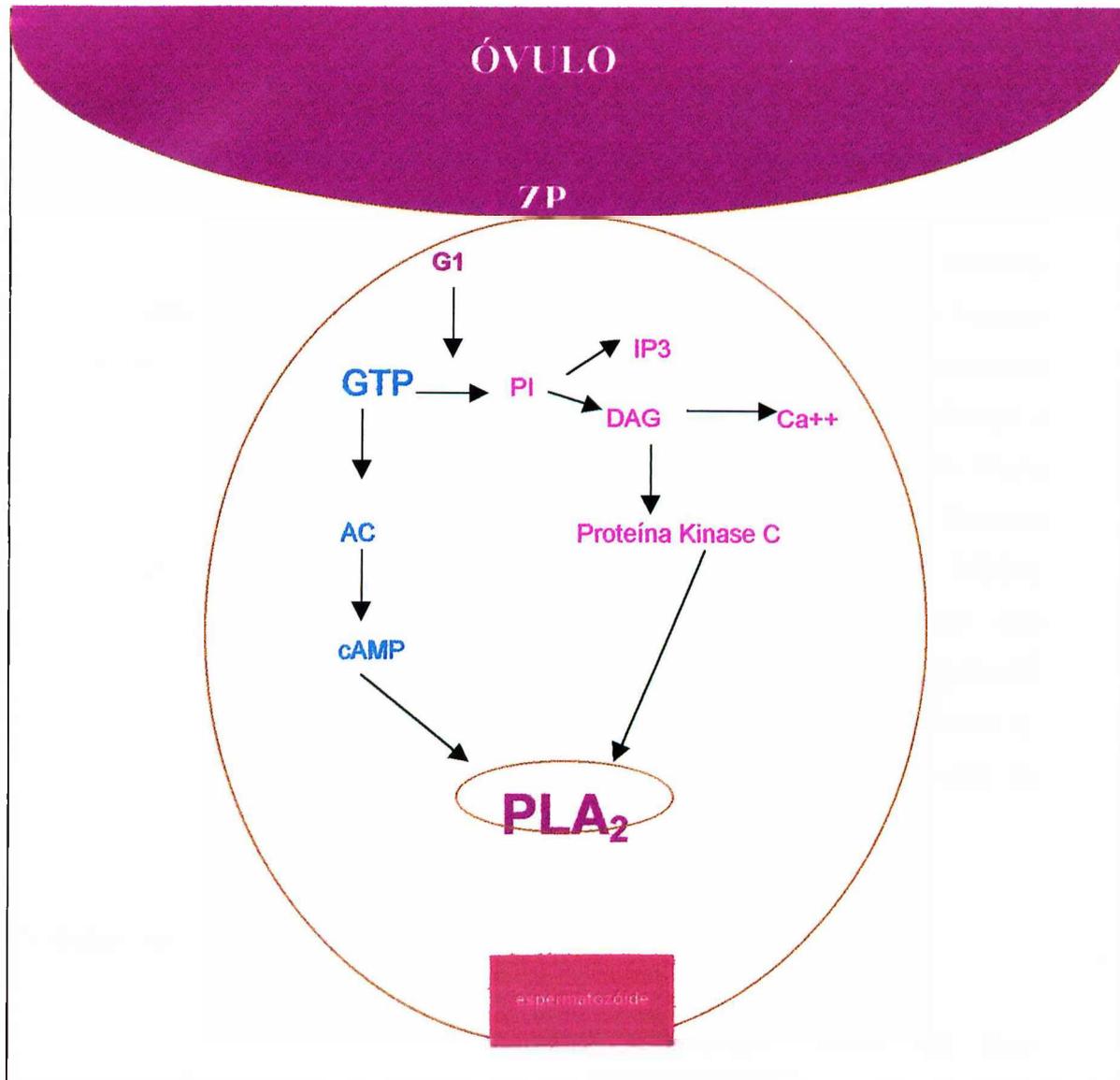


Figura 2. Representação esquemática modificada do mecanismo de regulação da atividade PLA₂ (Chang et al., 1987).

Em muitos espermatozoides mamíferos, incluindo humano, a ativação de PKC está envolvida na reação acrossômica (BREIBART et al., 1992; NAOR et al., 1995). Ao lado da ativação de PKC, DAG produzido no espermatozoide ativa uma fosfolipase C, capaz de hidrolisar fosfatidilcolina e aumentar o nível de DAG (ROLDAN e MURASE, 1994). Este alto nível de DAG modularia uma fosfolipase A₂ (ROLDAN e MOLLINEDO, 1991). Esta enzima chave que produz componentes fusogênicos como lisofosfolípeos e ácidos graxos livres, é requerida para o desenvolvimento da reação acrossômica (LLANOS et al., 1993 e 1995; ROLDAN

e FRAGIO, 1993).

Muitos destes processos já têm sido envolvidos nos mecanismos que disparam a reação acrossômica (WARD e KOPF, 1993). Exposição a ZP3 leva a fosforilação da tirosina de uma proteína de 95 kDa (NAZ e AHMAD, 1994; BURKS et al., 1995 e 1996) e ativação de uma proteína ligada a uma guanosina trifosfato (GTP) (LEE et al., 1992). Fatores como a proteína Kinase C, proteínas regulatórias nucleotídeo guanidina, inositol trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) e adenosina monofosfato cíclica (cAMP) também influenciam a atividade PLA₂ (CHANG et al., 1987). O cAMP pode além de ativar inibir a atividade PLA₂ ligando a enzima ou substituindo o cálcio livre na forma estocada (VAN DEN BOSH, 1980). Estudos têm demonstrado que a hidrólise de fosfatidilinositol (PI) produzem IP₃ e liberam cálcio, aumentando o cálcio livre intracelular (SCHEUR, 1989). Os outros produtos hidrolisados, como o DAG, ativam a proteína Kinase C, aumentando sua afinidade por cálcio e ativando a PLA₂ pela fosforilação de lipocortinas (SCHEUR, 1989).

2.2. FLUXO DE CÁLCIO NO SÊMEN

A próstata secreta cátions em grande quantidade, sendo os mais importantes cálcio, magnésio e zinco (ELIASSON, 1976, citado por HOMONNAI, 1978).

2.2.1. Canais de cálcio

O aumento transitório na concentração de íons cálcio, age como sinal celular. Liberação de cálcio do estoque interno pode ser estimulado por um aumento na concentração de cálcio, este processo é chamado CICR (cálcio liberado, cálcio induzido). Esta liberação de cálcio parece ser mediada por canais de cálcio no retículo endoplasmático. Os canais de cálcio relacionados com estas propriedades são o IP₃, receptor inositol trifosfato (IP₃R) e receptor ryanodine (RyR), que parece ser regulado pelo ciclo adenosina ribose-difosfato (cADPR). De acordo com o experimento de GALIONE et al. (1993), óvulos de sapos tem um

simples mecanismo CICR que usa IP_3R , e em óvulos de ouriço do mar, ambos o IP_3R e o RyR contribuem para a formação de ondas de cálcio. A existência de dois tipos de canais liberadores de cálcio é a sugestão da existência de vários modelos para as oscilações de cálcio, que levam a pesquisar RyR em células não musculares, como os espermatozóides.

2.2.2. Modelos de alteração do fluxo de cálcio no sêmen

Pesquisadores do assunto sugeriram alguns modelos para explicar como essa alteração no fluxo de cálcio é importante para a fertilização, como mostrado na Figura 3.

De acordo com BYRNE e HUNGUND (1979) a indução da reação acrossômica, que é uma pré-condição para fertilização de óvulos mamíferos, foi sugerida envolver a desestabilização da membrana plasmática através de uma ação na fase lipídica da membrana pela albumina. De acordo com o modelo, a desestabilização desta membrana está associada com o aumento da permeabilidade para o cálcio, que naquelas moléculas fosfolipídicas aniônicas em bicamada adjacente da membrana lipídica promovem fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa.

Recentemente, a localização seletiva do IP_3R no acrossoma de rato, camundongo, hamster e cão foi relatada (WALENSKY e SNYDER, 1995). WALENSKY e SNYDER (1995) também descreveram a presença de $G\alpha_{q/11}$ e fosfolipase C, e sugeriram que o IP_3 libera o cálcio na reação acrossômica do espermatozóide de mamíferos. FLORMAN et al. (1995) trabalhando com espermatozóides bovino propôs um modelo que explica porque a proteína G1 é dependente de um influxo de cálcio promovido pela ZP3, depois da interação com seu receptor no espermatozóide. Brevemente, este modelo explica que a ZP3 estimula seletivamente a proteína G1 a sensibilizar canais de cálcio responsáveis pela despolarização da membrana. Estas mudanças ativam um canal de cálcio que causa um massivo influxo deste íon necessário para a reação acrossômica. Com base nos achados, os autores apresentaram um modelo mais completo, onde uma interação multivalente entre ZP3 e proteínas receptoras de

ligação da membrana plasmática do espermatozóide disparam a produção de sinais intracelulares múltiplos. Ativação de receptores de G1 leva a ativação da fosfolipase C com a subsequente hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato gerando IP_3 e DAG. Então, a ligação de IP_3 para IP_3R localizado na membrana acrossomal externa induziria a liberação de cálcio acrossomal.

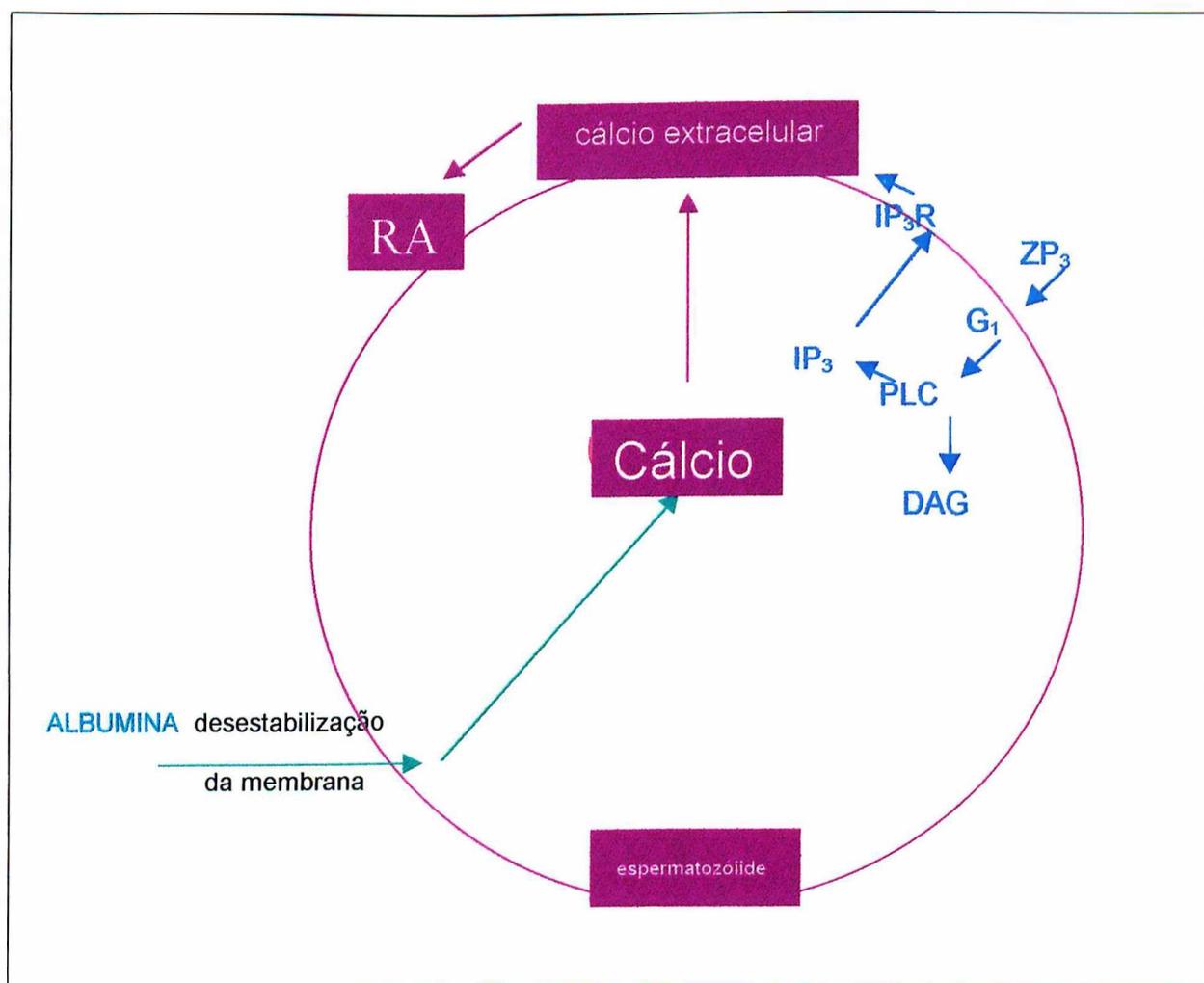


Figura 3. Representação esquemática de 2 modelos de indução da reação acrossômica pelo fluxo de cálcio. 1º modelo em verde (albumina desestabiliza a membrana plasmática aumentando a permeabilidade para o cálcio); 2º modelo em azul (ativação de receptores G1 pela ZP3 ativam a PLC que hidrolisa fosfatidilinositol liberando IP_3 e DAG. IP_3 se liga ao seu receptor e libera cálcio).

Uma subsequente capacidade de entrar cálcio, através de canais focais de voltagem insensitiva, produziria uma elevação de cálcio intracitoplasmático, disparando a despolarização da membrana e ativação de canais de cálcio (WALENSKY e SNYDER, 1995). A alta concentração de cálcio livre, junto com a produção de DAG seria requerida para eventos moleculares, disparando a fusão de membrana plasmática e membrana acrossomal externa (FLORMAN et al., 1995).

No modelo clássico, IP_3 e DAG, produzidos depois da hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato por uma fosfolipase C, estão envolvidos na modulação da concentração de cálcio intracelular (NISHIZYKA, 1992).

2.2.3. Variação do fluxo de cálcio em sêmen congelado bovino

Segundo BAILEY e BUHR (1993) o controle do fluxo de cálcio através da membrana do espermatozóide é crucial para o sucesso da fertilização. O maior acúmulo de níveis de cálcio intracelular em sêmen bovino congelado sugere que o processo de congelamento danifica mecanismos regulatórios de cálcio. O procedimento de congelamento e descongelamento pode induzir mudanças ultraestruturais como a separação da fase lateral da bicamada da membrana plasmática (DE LEEUW et al., 1991, citado por BAILEY, 1993) e redução da capacidade de fertilização do espermatozóide bovino congelado por danificar as proteínas regulatórias do fluxo de cálcio através da membrana celular.

2.2.4. Papel do fluxo de cálcio no sêmen

O cálcio tem um papel integral na capacitação e reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1988, citado por BAILEY, 1993). Durante a capacitação ocorre uma série de eventos bioquímicos na membrana plasmática aumentando a permeabilidade para o cálcio externo, causando um influxo e induzindo a reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1982, citado por BAILEY, 1993).

Em espermatozóide mamífero, um influxo do cálcio extracelular no citosol é considerado um evento obrigatório da reação acrossômica, como demonstrado

por indução de exocitose acrossomal pelo tratamento com cálcio ionoforo (YANAGIMACHI, 1982, citado por BAILEY, 1993). Reação acrossômica não tem sido observada na ausência de cálcio extracelular; similarmente indutores de reação acrossômica estão associados com elevações na concentração de cálcio intracelular. Experimentos com espermatozóides bovino demonstraram que o influxo de cálcio é tão importante quanto a indução da reação acrossômica pela ZP bovina (CLARK et al., 1993, citado por BAILEY, 1994). Estes resultados sugerem que uma substância antagonista de um receptor muscarínico, a QNB (3-quinuclidinyl benzilate) inibe a reação acrossômica induzida pela ZP por um mecanismo que interfere no influxo de cálcio e conseqüentemente aumenta a concentração de cálcio no espermatozóide. Trabalhos prévios (ENDO et al., 1987; WARD et al., 1992, citado por BAILEY, 1994) têm demonstrado que a ZP solubilizada e a proteína ZP3 purificada têm o mesmo potencial e dão resultados idênticos, iniciando o primeiro sinal de reação de transdução disparando a exocitose acrossomal.

Primeiros eventos da reação acrossômica requerem níveis micromolares de cálcio e eventos mais tardios requerem níveis milimolares de cálcio (ROLDAN e HERRISON, 1993). Estes achados sugerem que este pequeno e rápido aumento de cálcio dependente de IP_3 é devido a mobilização de cálcio intracelular, que é seguido por um influxo de cálcio extracelular.

Já é conhecido que um aumento extracelular de cálcio dependente da concentração de cálcio intracelular livre é usualmente requerido para iniciação da reação acrossômica. Isto parece ser verdadeiro pelo menos em indução de reação acrossômica pela zona pelúcida em camundongos e bovino (FLORMAN et al., 1989).

2.3. REAÇÃO ACROSSÔMICA

2.3.1. Estrutura do espermatozóide

Espermatozóides são constituídos de cabeça, peça intermediária e cauda,

tendo cada componente características morfológicas particulares (KRUGER et al., 1988).

2.3.2. Morfologia da reação acrossômica

Para ganhar a capacidade de fertilizar, espermatozóides devem *in vivo* ou *in vitro*, sofrer um processo chamado de capacitação. Desde que um marcador para capacitação não existe, é considerado que este processo é completado quando o espermatozóide é capaz de sofrer a exocitose do acrossoma. Por isso a RA tem sido um dos eventos mais estudados no processo de fertilização (MORALES e LLANOS, 1996). A ZP é o sítio de interação inicial do espermatozóide com o óvulo. Esta interação inclui a ligação do espermatozóide espécie-específica com a ZP e indução da reação acrossômica, ambas as quais são pré-requisitos para o sucesso da fertilização *in vivo* (YANAGIMACHI, 1988). Em camundongos, somente espermatozóides de acrossoma intacto são capazes de ligar a zona pelúcida e sofrer a reação acrossômica na superfície dela (BLACKMORE et al., 1990). Entretanto, em várias espécies, ambos acrossoma intacto e acrossoma reagido são igualmente capazes de se ligar a superfície da zona pelúcida e penetrá-la (KUZAN et al., 1984; MYLES et al., 1987).

As características morfológicas da reação acrossômica em espermatozóide humano são similares a de outras espécies investigadas (YUDIN et al., 1988). Este processo ocorre primeiramente pela descondensação da matriz acrossomal, seguida pela sua invaginação sozinha ou juntamente com a membrana plasmática e finalmente ambas se fundindo (NAGAE et al., 1986). Isto permite a liberação de conteúdos solúveis do acrossoma que aparentemente facilitam a passagem do espermatozóide através da zona pelúcia. Uma subsequente formação de vesículas ocorrem, compostas de membrana acrossomal externa e membrana plasmática. Estas vesículas permanecem fechadas na cabeça do espermatozóide por um curto período de tempo e então dispersam (MOLLER et al., 1989; MILLER et al., 1993).

2.3.3. Indutores da reação acrossômica

Reação acrossômica de espermatozóide humano pode ser iniciada por diferentes moléculas que podem ser classificadas como indutores fisiológicos ou farmacológicos. Dentre os indutores farmacológicos o mais usado é o cálcio ionoforo A23187 e a ionomicina. Componentes fusogênicos como os lisofosfolípídeos têm sido relatados como estimuladores de RA em mamíferos, incluindo o espermatozóide humano (LLANOS et al., 1993 e 1995; PARRISH et al., 1988). Segundo GAMZU et al., (1997) a taxa molar de colesterol:fosfolípídeos é um dos maiores fatores que determinam a fluidez da membrana. Esta fluidez tem um papel importante na capacitação e reação acrossômica. Apesar da fluidez não afetar a morfologia das células espermáticas, ela é acompanhada por reações bioquímicas e biofísicas, com a hidrólise de fosfolípídeos para lisofosfolípídeos pelas fosfolipases, como citado no trabalho de RÖNKKÖ, (1994) onde espermatozóides incubados com fosfolipase A₂ durante a reação acrossômica *in vitro*, apresentaram uma exocitose acrossomal aumentada. Estas reações reduzem a taxa molar colesterol:fosfolípídeos na membrana plasmática do espermatozóide e aumentam sua fluidez. Deste modo, capacitação resulta em aumento da fluidez da membrana e consequente tendência do plasma e da membrana acrossomal externa fundirem (LANGLAIS e ROBERTS, 1985). O fluido folicular preovulatório humano (TESARIK, 1985) e a zona pelúcia humana (CROSS et al., 1988) estão entre os estimuladores da RA em espermatozóide humano.

2.3.4. Moduladores da reação acrossômica

Existem também vários moduladores da ligação do espermatozóide e da zona pelúcida, são eles:

- progesterona (P): espermatozóides de camundongo tratados sequencialmente com metade da concentração máxima de progesterona e zona pelúcida exibem exocitose aumentada (ROLDAN et al., 1994). Extensivos

trabalhos têm sido feitos para elucidar as moléculas e mecanismos envolvidos na indução de P na reação acrossômica do espermatozóide humano (BALDI et al., 1995; MEIZEL, 1995). Existem algumas similaridades entre o caminho de P e a indução da reação acrossômica. Efeitos de P no espermatozóide humano são mediados pela presença de proteínas receptoras de ligação localizadas na área acrossomal da subpopulação espermática (BLACKMORE e LATTANZIO, 1991; TESARIK et al., 1992). P age na superfície do espermatozóide induzindo no mínimo três diferentes eventos:

- 1- abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática para induzir um influxo de cálcio (BLACKMORE et al., 1990);
- 2- abertura dos canais de Cl^- da membrana plasmática para induzir o efluxo de cálcio;
- 3- ativação de uma proteína tirosina kinase (LUCONI et al., 1995; TESARIK et al., 1993);

Estas hipóteses podem explicar a variedade de respostas devido a ação não genômica de esteróides, e reconciliar resultados experimentais que parecem contraditórios a primeira vista (MENDONZA et al., 1995). Segundo YANG et al. (1994) e PLANT et al. (1995) a progesterona estimula um aumento dramático na concentração do cálcio intracelular em espermatozóide humano por ligar a um novo receptor de superfície celular. Isto aumenta a proporção de espermatozóide exibindo hiperatividade e promove a reação acrossômica.

- fucoidina: é um heteropolissacarídeo consistindo primariamente de ligações alfa e beta ligadas a subunidades L-fucose sulfato. Tratamento do espermatozóide com fucoidina inibe a ligação da zona pelúcida e espermatozóide.

- ácido siálico: remoção do ácido siálico pode também ter um papel importante na ligação de espermatozóide e zona pelúcida desde que o tratamento com neuraminidase, uma enzima que cliva alfa ou beta ligação de resíduos de ácido siálico, aumenta a ligação do espermatozóide com a zona pelúcida humana (LASSALLE e TESTART, 1994). Remoção do ácido siálico da superfície do espermatozóide está associada com a perda de cargas negativas (ROSADO et al., 1973) e capacitação do espermatozóide (SRIVASTAVA e

FAROOQUI, 1988).

- D-Manose: Acrosina é um dos candidatos a suportar a ligação do espermatozóide a zona pelúcida (JONES, 1990; FRANCAVILLA et al., 1994), a ação da acrosina humana é inibida por uma variedade de monossacarídeos, especialmente D-frutose e D-manose (ANDERSON et al., 1981).

- gema de ovo e leite: foram recentemente sugeridos para aumentar o número de espermatozoides que ligam a zona pelúcida (BARISIC et al., 1994; LANZERNDORF et al., 1992).

- Proteína placentar 14: uma glicoproteína sintetizada e secretada pelas células endometriais, reduz significativamente a ligação da zona pelúcida e do espermatozóide (OEHNINGER et al., 1995).

- GnRH: e análogos podem modular a ligação zona pelúcida-espermatozóide em humano (MORALES et al., 1994; OLIVA et al., 1995). GnRH ou moléculas semelhantes ao GnRH têm sido detectadas em fluido folicular pré-ovulatório humano (YING et al., 1981) e plasma seminal humano (IZUMI et al., 1985; SOKOL et al., 1985).

Foi observado também por NOLAND et al. (1988) que uma elevação da cAMP durante a indução da zona pelúcida a reação acrossômica em espermatozoides de camundongo, indicam que a zona pelúcida modula a atividade da AC. Maiores estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelo qual a ZP estimula a membrana associada AC e revelar seu papel na reação acrossômica. Uma ligação entre ativação de AC, aumento da concentração cAMP, modulação dos canais de cálcio e desenvolvimento da reação acrossômica foram recentemente sugeridas (LECLER e KOPF, 1995).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética e Bioquímica (DEGEB) da Universidade Federal de Uberlândia e as análises de reação acrossômica foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do CENARGEM / EMBRAPA.

3.1. Material biológico

Foi avaliado sêmen de 37 touros, sendo 14 animais *Bos taurus*, 15 animais *Bos indicus* e 8 animais mestiços. As raças estudadas foram: Caracu, Gir, Nelore, Guzerá, Dinamarquesa, Holandesa, Aberdeen Angus, Limousin, Simental e Girolandesa.

As amostras foram gentilmente cedidas pela Lagoa da Serra Inseminação Artificial (Sertãozinho-SP), Pecplan ABS Importação e Exportação Ltda (Uberaba-MG) e Laboratório de Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia. Todas as amostras de sêmen estavam acondicionadas em palhetas contendo 0,5 ml de sêmen congelado e mantidas em nitrogênio líquido.

3.2. Extração de proteínas totais do espermatozóide

O procedimento utilizado para extração ácida das proteínas do espermatozóide foi aquele descrito por RÖNKKÖ et al. (1991) e DYCK e BUHR (1993).

Inicialmente as amostras de sêmen dos 37 animais foram descongeladas em água à temperatura de 37°C, por 30 segundos. Após, o material foi centrifugado durante 30 minutos a 30.000 g e seguido por uma lavagem com solução Tris 0,050 M e sacarose 0,025 M em pH 7,0 com centrifugação de 10

minutos a 30.000 g. Esta etapa foi repetida para uma melhor lavagem das células espermáticas. Os espermatozoides foram ressuspensos em 100 μ l de uma solução de ácido sulfúrico 0,18 N. Esta solução foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida centrifugada a 30.000 g por meia hora, onde o sobrenadante continha o extrato de proteínas totais do espermatozoide.

3.3. Extração de proteínas da membrana do espermatozoide

Todas as 37 amostras foram submetidas à extração de proteínas da membrana seguindo a metodologia descrita por JEAN et al. (1995). Uma palheta de sêmen descongelado de cada touro foi centrifugada a 30.000 g, durante 30 minutos objetivando a separação do plasma seminal e espermatozoides. Duas lavagens com solução de tampão salino fosfato (PBS) foram realizadas com centrifugações a 30.000 g durante 10 minutos. Os espermatozoides foram ressuspensos em 400 μ l de uma solução de Cloreto de Potássio 0,6 M e de PMSF 0,002 M para prevenir possíveis efeitos proteolíticos. Após incubação de 30 minutos no gelo, o extrato de proteínas da membrana dos espermatozoides foi obtido pela centrifugação a 30.000 g, durante 5 minutos.

3.4. Extração de proteínas do plasma seminal

Após a separação do plasma seminal e espermatozoides por meio de centrifugação, as proteínas de 0,5 ml de plasma seminal congelado de 37 touros, foram precipitadas utilizando 3,6 ml de Acetona analítica. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 5 minutos, o precipitado foi ressuspensado em 1 ml de solução Tris 0,1 M, pH 7,5.

3.5. Quantificação de proteína

Após as extrações, as amostras foram submetidas a uma quantificação de proteína, como descrito por BRADFORD (1976). O método envolve a ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 a proteínas, resultando em coloração

azul que foi detectada por leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 595 nm. Foi usado como padrão a proteína BSA (soro albumina bovina).

3.6. Estudos eletroforéticos

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE à 14%.

A dimensão do gel de poliacrilamida era de 21 cm x 19 cm x 0,75 mm.

A preparação do gel de poliacrilamida desnaturante foi realizada segundo ALFENAS et al. (1991). Na eletroforese descontínua os reagentes utilizados foram: 4,7 ml de Tris-HCl 2 M, pH 8,8, 7,8 ml de água deionizada, 250 ul de ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico (EDTA) 200 mM, 250 ul de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) 10%, 11,7 ml de Acrilamida 30% e N,N-metilenebisacrilamida 0,8%, 30 ul de N,N,'N,'N-tetrametiletilinediamino (TEMED) e 150 ul de Persulfato de Amônio 10% em um volume total de 25 ml.

As soluções Trizma base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, Glicina 0,77 M e SDS 0,3%, pH-8,3 foram utilizadas como solução eletrodo para ânodo e cátodo.

Amostras contendo 5 ug de proteína foram dissociadas em seus polipeptídeos pelo aquecimento à 100°C, três minutos, na presença de tampão da amostra 1x (Tris-HCl 0,187 M, pH- 6,8, glicerol 27,6%, SDS 6%, EDTA 6 mM e azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol nas proporções de 1: 0,5: 0,1 respectivamente.

A eletroforese foi conduzida à uma temperatura de 10°C, numa voltagem constante de 100 volts até atingir o gel de separação e 200 volts até o final da eletroforese, que durava em média 4 a 7 horas.

Após a corrida eletroforética, a coloração do gel foi realizada de acordo com o método descrito por BLUM et al. (1987). Inicialmente o gel foi fixado durante a noite em uma solução 12% de ácido acético, 50% de etanol e 0,05% de formaldeído. Após, foram realizadas três lavagens durante vinte minutos cada, em uma solução de 50% de etanol. Em seguida foi feito um pré-tratamento com tiosulfato de sódio 0,02% durante um minuto, e uma lavagem com água destilada por dois minutos. A coloração foi realizada durante vinte minutos com 200 mg de Nitrato de Prata e 75 ul de formaldeído em 100 ml de água destilada.

Esta etapa foi seguida por uma lavagem durante dois minutos com água destilada e a revelação foi realizada com uma solução gelada de 3 g de Carbonato de Sódio, 50 ul de formaldeído e 2 ml de tiosulfato de sódio 0,02% em 100 ml de água destilada. A reação foi parada com uma solução de ácido acético 10%.

A secagem dos géis foi baseada no método de POPESCU (1983), adaptado para secagem em bastidores. Os géis foram prensados entre duas folhas de papel celofane poroso e deixados à temperatura ambiente por vinte e quatro horas para a secagem.

3.7. Atividade fosfolipásica

Para determinação da atividade da fosfolipase A_2 foi realizada a extração ácida de proteínas totais de duas palhetas de sêmen congelado bovino em um lote de 31 animais. Em cada palheta de sêmen foi extraído uma média de 30 a 80 ug de proteínas totais.

Foi desenvolvido um método colorimétrico para detecção da atividade da fosfolipase A_2 . Este método consistiu em detectar ácidos graxos liberados após a clivagem enzimática da fosfolipase A_2 em um fosfolípido, onde este produto foi corado com o uso da Rodamina 6G e a leitura realizada em espectrofotômetro.

Inicialmente realizou-se a otimização do método pelo uso de diferentes substratos:

- Tris 0,1 M, pH 7,4 e CaCl_2 20 mM;

- 15% de uma solução de gema de ovo, Deoxicolato de Sódio 0,3 M e CaCl_2 0,006 M;

- filtrado com papel, 15% de uma solução de gema de ovo, Deoxicolato de Sódio, CaCl_2 0,006 M e 10% de clorofórmio.

O tempo de incubação utilizado foi de três minutos, vinte minutos e durante a noite (aproximadamente 10 horas).

A quantidade do corante Rodamina 6G (0,12%) variou de 5 ul, 10 ul e 20 ul em um volume total da reação de 1.900 ul.

A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro (SPEKOL) a 530 nm.

Na curva padrão utilizou-se veneno bruto de serpente (*Bothrops neuwiedae*) cristalizado que foi dissolvido em solução salina 0,9%. Em seguida foi centrifugado à baixa rotação por 10 minutos à temperatura ambiente e no sobrenadante foi feita a dosagem de proteínas pelo método do microbiureto (ITZHAKI e GILL, 1964). Em seguida o veneno foi submetido à quantificação de atividade da fosfolipase A₂ pelo método potenciométrico (DE HAAS et al., 1968). Foram feitas duas repetições da curva, bem como de cada touro analisado.

3.8. Dosagem de cálcio no plasma seminal bovino

Em 0.5 ml de plasma seminal dos 37 touros obtido após descongelamento e centrifugação do sêmen à 30000 g por 30 minutos, foi realizada uma digestão nitroperclórica (2 ml de ácido nítrico e 1 ml de ácido perclórico) durante duas horas em um bloco digestor a uma temperatura média de 200°C.

Após a digestão, o plasma seminal foi ressuspenso em 50 ml de óxido de lantânio 0.5%, de acordo com HOMONNAI et al. (1978) modificado. A leitura do material foi realizada 12 a 24 horas após a digestão em espectrofotômetro de absorção atômica (GBC-932AA), em um comprimento de onda de 422,7 nm.

3.9. Reação acrossômica

Duas palhetas de sêmen (1 ml) foram descongeladas a 37°C por 30 segundos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e foi adicionado aos espermatozóides 2 ml de meio TALP modificado (PARRISH et al., 1988), contendo: Cloreto de Cálcio 1 M, Cloreto de Potássio 1 M, Cloreto de Magnésio 0,1 M, Cloreto de Sódio 1 M, Fosfato de Sódio 0,1 M, ácido D-L láctico 21,6 mM, Hepes 10 mM, Bicarbonato de Sódio 25 mM, Soro Albumina Bovina 0,6% e ácido pirúvico 1 mM, aquecido a 37°C.

A motilidade e o vigor dos espermatozóides foram analisados logo após o descongelamento, antes da incubação e após a incubação de quatro horas. A motilidade é medida pela porcentagem de espermatozóides móveis em relação

aos imóveis variando de 0 a 100%. O vigor é a observação do movimento em massa dos espermatozóide que varia de 0 a 5, sendo que: 0- nenhum movimento; 1- movimentos leves; 2- movimentos claros e sem ondas; 3- início da formação de ondas; 4- ondas claras; 5- turbilhonamento.

Foram adicionados mais 7ml do meio TALP objetivando uma diluição de 1:10 (sêmen : TALP). Foi realizada uma centrifugação a 1.800 RPM durante 10 minutos e este processo foi repetido quando necessário para uma melhor lavagem dos espermatozóides. Após, foi adicionado 1ml de meio TALP e homogeneizado. Novamente foram verificados a motilidade e o vigor. Com o uso de uma câmara de Neubauer foi determinado a concentração dos espermatozóides.

Em seguida foram preparados 3 tubos contendo em cada um 20×10^6 de espermatozóides em um volume final de 1ml:

- * primeiro tubo - sêmen e meio TALP;
- * segundo tubo - sêmen , meio TALP e heparina;
- * terceiro tubo - sêmen, meio TALP, heparina e LPC (lisofosfatidilcolina) que foi adicionada após 4 horas de incubação e deixado agir durante 15 minutos.

Os tubos foram incubados durante 4 horas e 15 minutos a 37°C e terminado este tempo foram verificados a motilidade e vigor dos espermatozóides. Foram preparados esfregaços de lâmina de cada tubo antes e após a incubação.

A coloração das lâminas foi realizada de acordo com o método descrito por LENZ et al. (1983). Após o esfregaço e secagem da lâmina, ela foi deixada em uma solução de ácido flaviânico 0,1% e ácido acético 1% em água destilada durante 30 minutos. As lâminas foram secas com papel toalha e lavadas com ácido acético 1%, durante 10 a 15 segundos. Novamente as lâminas foram secas e colocadas em uma solução de ácido flaviânico 0,2% e eritrosina B 0,2% por 13 minutos e novamente lavadas com água destilada duas vezes. Após secarem ao ar durante 1-2 horas, foram lavadas com xileno e em seguida colocado uma gota de permount e coberto com uma lamínula. Por meio de microscopia em objetiva de imersão foram contados 200 espermatozóides em lâminas preparadas antes e após a incubação e com estes números foi calculado um índice do aumento da

taxa de RA do início da incubação até 4 horas e 15 minutos de incubação do sêmen. Este índice é o número de espermatozoides que sofreram RA após a incubação com LPC dividido pelo número de espermatozoides que sofreram a RA antes da incubação de 4 horas.

3.10. Análises dos géis

A massa molecular dos produtos dissociados foi determinada pelo programa IMVDS (Pharmacia), baseados nos padrões de massas moleculares utilizados na eletroforese das proteínas, sendo eles: SDS-6H de alta massa molecular (anidrase carbônica, 29 kDa; albumina de ovo, 45 kDa; soro albumina bovina, 66 kDa; fosforilase b, 97.5 kDa; β -galactosidase, 116 kDa e miosina, 205 kDa) e Dalton Mark de baixa massa molecular (α -lactalbumina, 14,2 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio, 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; albumina de ovo, 45 kDa e albumina bovina, 66 kDa). A densitometria das bandas proteicas detectadas nos géis de poliacrilamida foram obtidas também através da análise pelo programa IMVDS (Pharmacia).

3.11. Análises estatísticas

As análises para obtenção das curvas padrões foram realizadas por meio de regressão linear do programa STAT (Statistica, versão 4.5, 1993).

Para a dosagem de cálcio e atividade fosfolipásica dos diferentes touros foi realizada análise de variância por meio do teste de Duncan, pelo programa SAS (versão 5.0, 1989).

O coeficiente de correlação das proteínas do sêmen, dosagem de cálcio, atividade da fosfolipase A_2 e reação acrossômica foram analisadas pelo programa STAT (Statistica, versão 4.5, 1993).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil eletroforético das proteínas do sêmen

Para obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis, foi fundamental a padronização das técnicas de extração das proteínas do plasma seminal, da eletroforese e da coloração dos géis. Nas proteínas do plasma seminal foi utilizado um solvente orgânico (acetona) que diminuiu a solubilidade das proteínas a ponto de precipitá-las; com isso reduzindo a quantidade de impurezas existentes e facilitando a eletroforese destas proteínas. Na eletroforese, foram utilizadas inicialmente concentrações de acrilamida de 12 e 14%, sendo que na última foram obtidos melhores resultados, permitindo a avaliação de um maior número de bandas.

Para obter uma quantidade padrão de proteínas aplicadas de cada animal nos géis, foi quantificado e aplicado 5 ug de proteínas de cada animal. A coloração dos géis foi feita inicialmente com Coomassie Brilliant Blue R-250, mas pela pequena quantidade de proteínas extraída, principalmente da membrana dos espermatozóides, obteve-se melhores resultados com a coloração por íons prata, onde a coloração de nanogramas de proteína é possível pela redução química específica de íons prata aumentada pelo uso de tiosulfato de sódio, que solubiliza os sais de prata e aumenta a sensibilidade da coloração. A sensibilidade desta técnica é somente superada pela marcação radioativa e de quimioluminescência.

A análise dos perfis eletroforéticos das 37 amostras dos touros, mostrou que existe polimorfismo entre indivíduos, onde pode-se observar diferenças de natureza qualitativa e quantitativa, representadas pela presença e ausência de bandas específicas, bem como pela maior ou menor concentração de determinadas bandas polipeptídicas.

O polimorfismo encontrado em todas as proteínas que possam estar relacionadas com a ligação do óvulo ao espermatozóide mostra que nas diferenças quantitativas, uma proteína está presente em maior ou menor quantidade em um animal em relação a outro. Estas diferenças podem ser devido a alterações na expressão desta proteína, tanto à nível transcricional como traducional. Nas diferenças qualitativas, as proteínas estão presentes em um animal e ausentes em um outro animal. Estas variações à nível de DNA (mutação, deleção) podem impedir a transcrição e/ou a tradução desta proteína.

Na análise da massa molecular dos perfis eletroforéticos de proteínas totais do espermatozóide e a sua densitometria nas 37 amostras dos touros, foram encontradas 45 bandas proteicas diferentes, variando de 205 kDa a 6,3 kDa. As diferenças quantitativas foram observadas principalmente nas bandas de massas moleculares menores que 35 kDa (31,8; 29,7; 25,4; 20,9; 20,2; 18,4; 16,2 e 16 kDa) e diferenças qualitativas também foram observadas em proteínas de baixa massa molecular- 27,5; 21,4; 16,8 e 16,2 kDa. Na Figura 4, estão apresentados os perfis eletroforéticos de proteínas totais do espermatozóide de onze animais de diferentes raças.

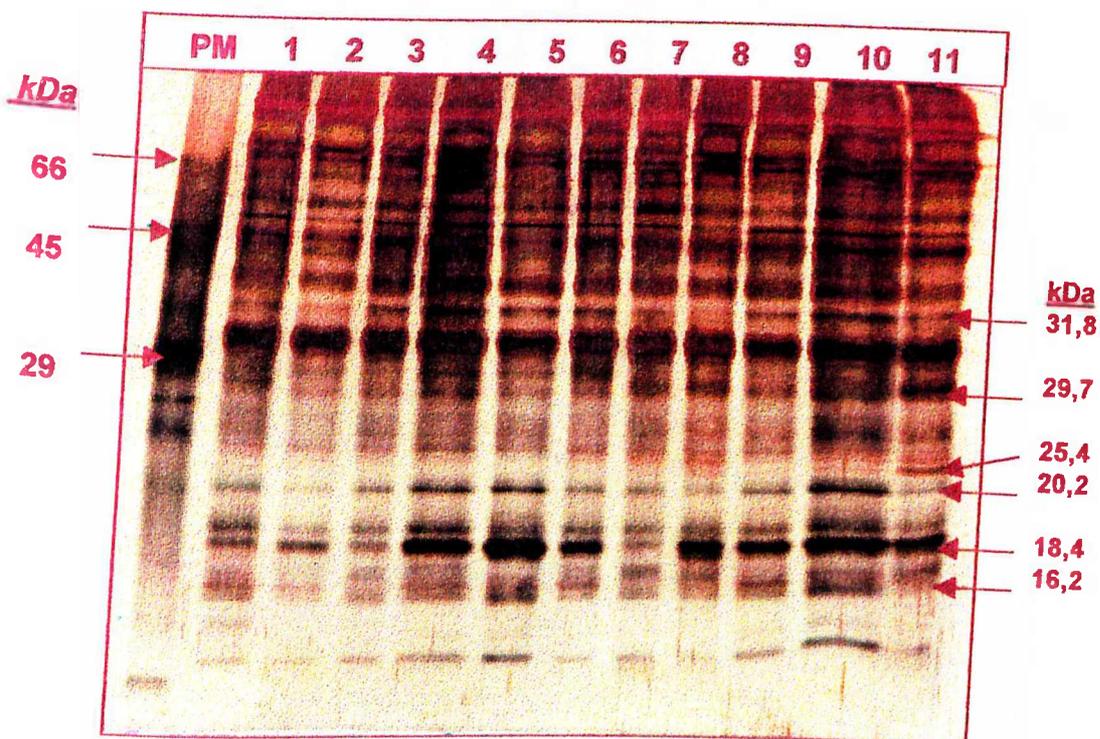


Figura 4. Eletroforese em SDS-PAGE 14% de proteínas totais dos espermatozoides bovinos. (PM) Padrão de Massa molecular SDS-6H. (1) Guzerá ; (2) Holandesa ; (3) Holandesa ; (4) Holandesa ; (5) Gir ; (6) Holandesa ; (7) Simental ; (8) Limousin ; (9) Gir ; (10) Nelore ; (11) Nelore.

Na membrana do espermatozóide foram encontradas 35 diferentes bandas proteicas de massas moleculares variando entre 233,8 kDa e 12,7 kDa. Observou-se que no perfil eletroforético das proteínas da membrana do espermatozóide também foi detectado polimorfismo entre indivíduos. Diferenças qualitativas foram encontradas nas proteínas de massas moleculares estimadas em 31,1 e 16,7 kDa e diferenças quantitativas nas proteínas de 66; 60; 45; 36; 29; 27,3; 20,9; 20,2; 18,8; 17,3; 16,3 e 15,7 kDa. Na Figura 5 estão representadas oito amostras mostrando algumas das diferenças proteicas encontradas nas 37 amostras dos animais analisados.

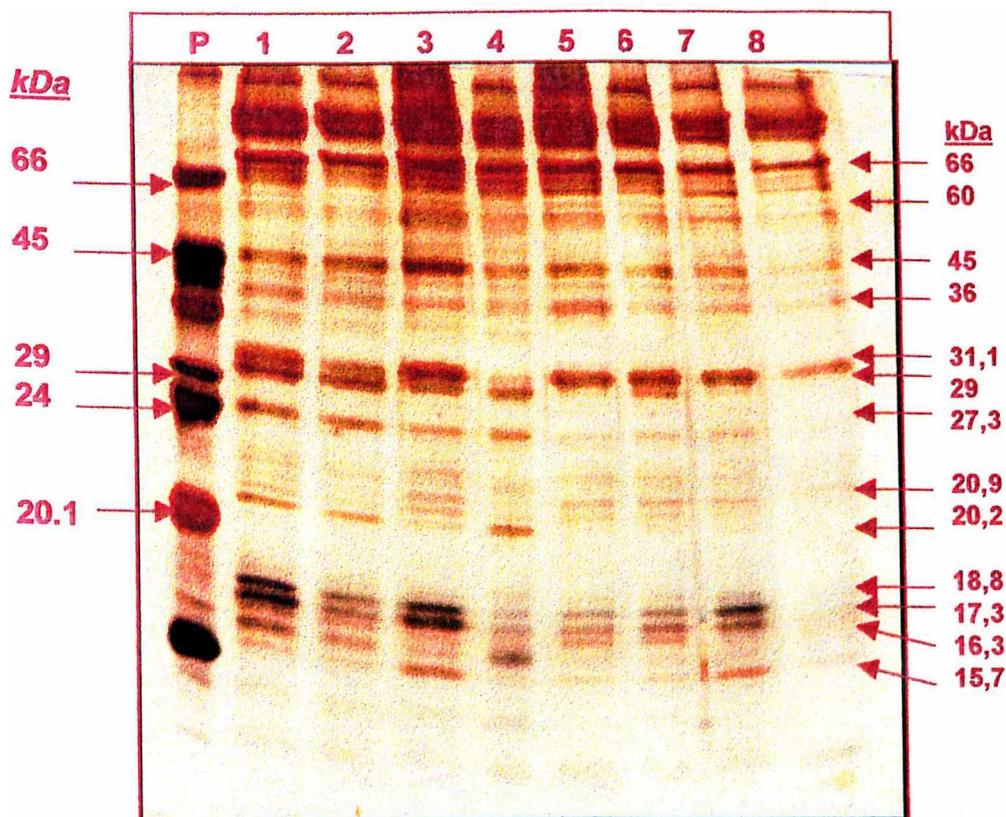


Figura 5. Eletroforese em SDS-PAGE 14% de proteínas da membrana dos espermatozóides bovino. (PM) Padrão de Massa molecular SDS-6H. (1) Nelore ; (2) Nelore ; (3) Limousin, (4) Simental; (5) Nelore; (6) Gir; (7) Holandês; (8) Limousin.

No gel de proteínas do plasma seminal, 21 bandas proteicas de massas moleculares diferentes foram encontradas. Diferenças quantitativas foram encontradas nas bandas proteicas de 94,5; 29,9; 24,9; 18,1; 17,4 e 16,2 kDa e diferenças qualitativas nas proteínas de 24,9 e 21,5 kDa. Na Figura 6 encontraram-se perfis eletroforéticos de amostras de oito animais e do diluente utilizado no sêmen para o congelamento. O diluente possui uma grande quantidade de proteínas que no momento da análise foram excluídas.

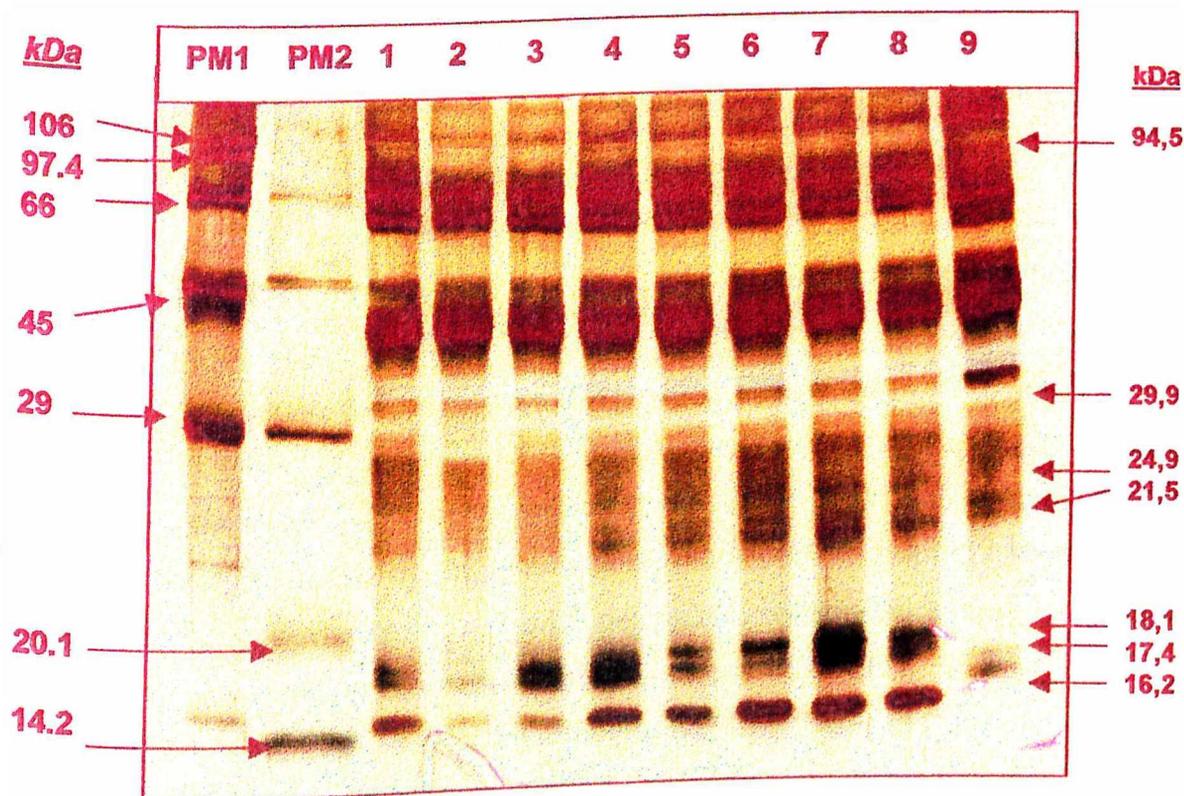


Figura 6. Eletroforese em SDS-PAGE 14% de proteínas do plasma seminal bovino. (PM1) Padrão de Massa molecular SDS-6H e (PM2) Dalton Mark. (1) Gir; (2) Gir; (3) Gir; (4) Nelore; (5) Simental; (6) Aberdeen Angus; (7) Holandesa; (8) Holandesa; (9) Diluente do sêmen.

Das proteínas analisadas dos espermatozoides de 37 touros que apresentaram polimorfismo é interessante notar aquelas de massas moleculares de 66 kDa que podem ser uma proteína HIS-50 (DYSON e ORGEBIN-CRIST, 1973) ou uma proteína ZRK (NAZ et al., 1994), ambas de grande importância na ligação do espermatozoide ao óvulo durante a fertilização. De acordo com NAZ et al. (1994) as proteínas ZRK também podem se apresentar com massas moleculares entre 14 e 18 kDa. Grande polimorfismo foi observado em proteínas com massas moleculares similares nos touros analisados, sugerindo um importante papel na fertilização, sendo possivelmente proteínas ZRK.

As proteínas de 20 kDa encontradas nos perfis eletroforéticos de proteínas do espermatozoide dos animais analisados apresentaram diferenças quantitativas. Estas proteínas possuem massas moleculares semelhantes à PH20

que tem atividade hialuronidase, encontrada na membrana plasmática do espermatozóide (LIN et al., 1994).

Segundo WEINMAN et al. (1986) a PLA₂ bovina está presente no plasma seminal e membrana plasmática do espermatozóide. De acordo com RÖNKKÖ (1994), a PLA₂ do plasma seminal e espermatozóide bovino apresentam massas moleculares de 15 e 16 kDa. Nos perfis eletroforéticos de proteínas totais, proteínas de membrana do espermatozóide e do plasma seminal encontrou-se grandes diferenças qualitativas e quantitativas em proteínas de massas moleculares de 15 e 16 kDa, bem como de proteínas de 30 à 36 kDa que podem ser dímeros de PLA₂ ou ZRK, onde as cadeias polipeptídicas podem não ter sido dissociadas completamente sob as condições usadas na eletroforese.

Somente na região da proteína sp56 citada por BOOKBINDER et al. (1995) como sendo uma das proteínas importantes na ligação do óvulo ao espermatozóide de camundongo, não foi detectado polimorfismo nos perfis eletroforéticos das proteínas do espermatozóide dos 37 touros.

4.2. Análise da atividade da fosfolipase A₂

Pela existência de pequena quantidade de atividade enzimática encontrada no sêmen congelado, não foi possível detectá-la por métodos convencionais como o potenciométrico (DE HAAS, 1968), e pela impossibilidade de utilização de métodos radioativos, foi desenvolvido um método colorimétrico onde foi possível detectar a atividade da PLA₂ quando esta é maior que 0,001 unidade/minuto/microlitro. O método foi otimizado e padronizado. Melhores resultados foram obtidos com a utilização do substrato contendo 15% de solução da gema do ovo, 10% de Deoxicolato de Sódio 0,3 M, 1% de CaCl₂ 0,006 M e 10% de Clorofórmio, completando-se o volume com água destilada e sendo posteriormente filtrado e ajustado o pH para 8,0. Este substrato mostrou grande variação de absorbância de uma solução de gema de ovo para outra, para tanto utilizou-se uma mesma solução de gema de ovo para fazer a curva padrão e todas as análises, conjuntas. Utilizou-se também 10 ul de Rodamina 6G (0,12%)

com um volume final da reação de 1.900 μ l. O tempo de incubação ideal foi de vinte minutos.

O espectro de absorção do produto da reação foi determinado em espectrofotômetro na faixa de 350 nm a 750 nm. Como mostrado na Figura 7, o comprimento de onda de maior absorbância foi 530 nm.

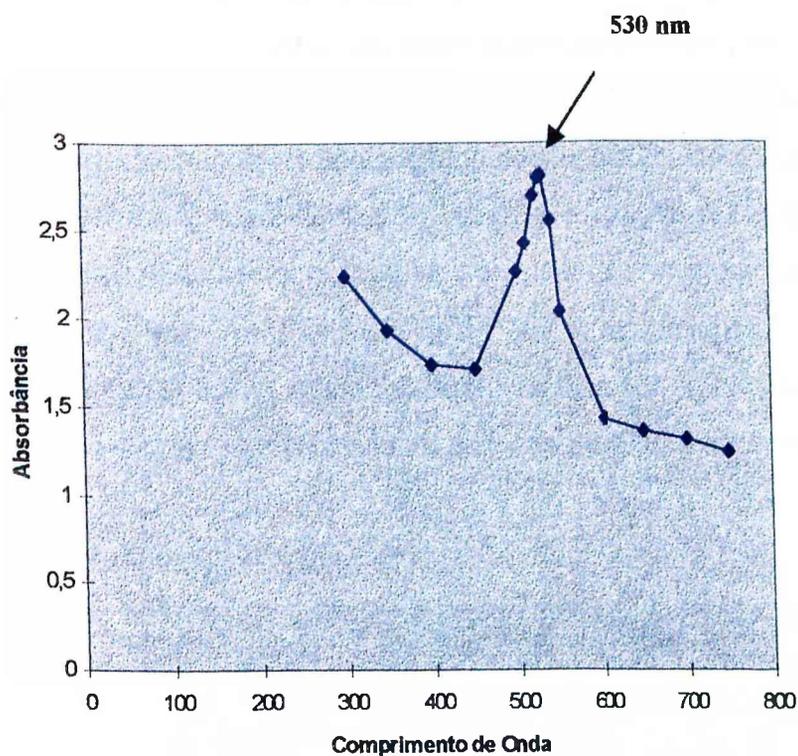


Figura 7. Determinação do comprimento de onda para medir a atividade da fosfolipase A_2 por meio de espectrofotometria.

Uma solução contendo 200 μ l de proteínas totais obtidas através da extração ácida de duas palhetas de sêmen (neutralizada com 25 μ l de Tris pH 8,8), 1.565 μ l de substrato, 100 μ l de água destilada e 10 μ l de Rodamina 6G (0,12%) foi incubada a temperatura ambiente durante vinte minutos e a reação foi parada com banho de gelo.

Pelas dificuldades de leitura da solução em suspensão, centrifugou-se durante cinco minutos a 30.000 g obtendo assim um precipitado contendo a

Rodamina 6G ligada aos ácidos graxos liberados após a clivagem enzimática da PLA₂ na lecitina do ovo. O precipitado foi ressuspensionado primeiramente em 15 µl de hidróxido de sódio 0,1208 M para solubilizá-lo, e após adicionou-se 1 ml de água destilada. Em seguida foi feita a leitura da absorbância a 530 nm.

A curva padrão foi preparada com uma fosfolipase A₂ de veneno de serpente (*Bothrops neuwiedae*), com atividade previamente determinada pelo método potenciométrico. As diluições da atividade enzimática variaram de 0,0001 à 20 unidades/minutos/microlitros onde observou-se que o mínimo detectável por este método foi de 0,001 e o máximo de 3,0 unidades/minutos/microlitros (unidade corresponde a microequivalentes de NaOH necessário para titular em pH 8,0 os ácidos graxos liberados durante a reação a temperatura ambiente). Com estes dados da curva obteve-se por meio de regressão linear uma equação, onde **atividade enzimática = -1,21 + 11,766 x Absorbância**, cujo coeficiente de correlação foi 0,9985. A atividade fosfolipásica foi calculada pela equação da curva padrão e o resultado obtido foi expresso em unidade/minuto/microlitro.

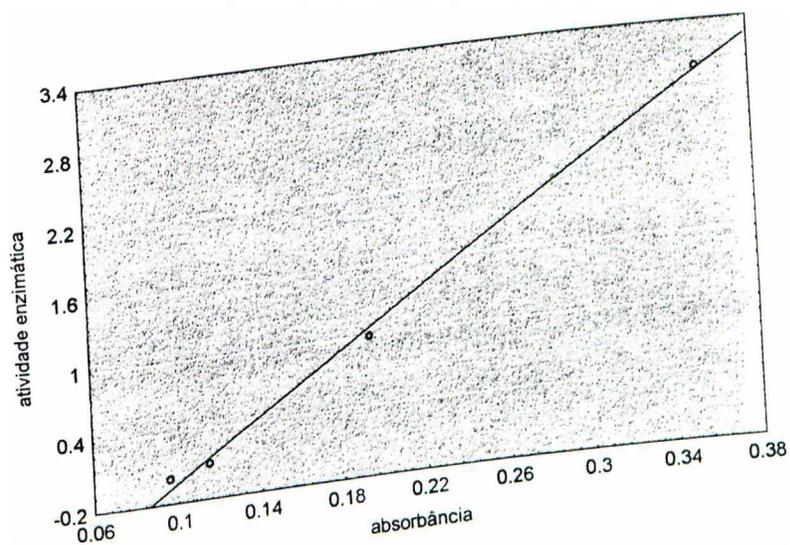


Figura 8. Curva padrão da atividade enzimática da PLA₂ de veneno de serpente.

De acordo com DYCK e BUHR (1993) o processo de congelamento e descongelamento reduz a atividade da PLA₂ de espermatozoides suíno em aproximadamente 50% daquela encontrada em sêmen fresco. Observou-se que das 31 amostras dos animais analisados, em cinco delas não foi possível detectar a atividade enzimática por este método, mostrando assim que estas amostras possuem uma atividade enzimática inferior a 0,001 udi/min/ul.

Tabela 1. Análise de variância para a atividade da enzima fosfolipase A₂ do espermatozóide bovino.

Varição	Grau de Liberdade	Quadrados Médios
repetições	1	1.018815
indivíduos	30	1.053975**
erro	30	0.29740736

**Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 2. Comparação de médias da atividade da fosfolipase A₂ em sêmen de 31 touros.

Raça do touro	*Média da atividade	
	PLA ₂ (udi/min/ul)	
Gir 5	2,814	A
Guzerá 2	1,862	A B
Simental 3	1,569	B C
Simental 1	1,568	B C
Holandesa 5	1,446	B C D
Nelore 3	1,352	B C D E
Nelore 2	1,187	B C D E F
Gir 3	1,108	B C D E F
Girolandesa 3	0,804	B C D E F
Nelore 4	0,752	B C D E F
Holandesa 3	0,576	B C D E F
Simental 2	0,456	C D E F
Girolandesa 5	0,434	C D E F
Girolandesa 4	0,375	C D E F
Gir 6	0,295	C D E F
Holandesa 6	0,188	D E F
Holandesa 4	0,188	D E F
Dinamarquesa	0,096	E F
Guzerá 1	0,087	E F
Girolandesa 1	0,006	F
*Pool	0,005	F
Gir 4	0,004	F
Caracu	0,003	F
Limousin 2	0,002	F
Girolandesa 2	0,001	F
Nelore 1	0,001	F
Gir 2	0	F
Limousin 1	0	F
Simental 4	0	F
Gir 7	0	F
Aberdeen	0	F

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

*Pool de 5 touros com alterações morfológicas espermáticas

A média encontrada da atividade enzimática dos 31 touros analisados foi 0,573 unidade/minuto/microlitro, o mínimo detectado de 0,001 e o máximo de 2,814. É importante enfatizar que 3u/min/ul é o máximo detectável por este

método, pois após este limite a curva atinge um "plateau". O touro Gir 5 atingiu este limite podendo apresentar atividade superior ao detectado.

As diferenças encontradas na análise de variância da atividade da enzima PLA₂ foi significativa com $P < 1\%$. O teste de Duncan mostra que a prevalência entre os touros foi de 0.08 a 1.8 u/ul/min. O pool de touros com patologias espermáticas mostraram possuir uma atividade fosfolipásica baixa, provavelmente pela grande quantidade de espermatozóide com patologias de acrossoma.

A variação das médias da atividade enzimática entre touros pode ser devido a fatores reguladores como a quantidade de íons cálcio presente no espermatozóide, proteínas regulatórias nucleotídeo guanidina, proteína Kinase C, IP₃, DAG e cAMP (CHANG et al., 1987), bem como moléculas envolvidas na sinalização transmembrana, como a proteína G1 (FRANKEN et al., 1996). Pela grande variabilidade encontrada dentro de cada raça pode-se dizer que além do fator genético relativo à atividade fosfolipásica há também a influência de fatores ambientais.

4.3. Análise da concentração de cálcio no plasma seminal bovino

A digestão nitroperclórica foi realizada objetivando destruir qualquer matéria orgânica presente neste material que pudesse influenciar na leitura dos íons cálcio, bem como o cloreto de lântanio 0,5% que, utilizado para diluir o plasma seminal após a digestão, foi aquecido a uma temperatura de 60°C para que não houvesse formação de precipitados.

Foi feito com cálcio padrão, uma curva de 0,5; 1; 2; 3; e 4 ug de cálcio. Através do cálculo por regressão linear obteve-se uma equação onde **concentração de cálcio = absorvância - 0,000291 / 0,027453**, com um coeficiente de correlação de 0,9986. Foram calculadas as concentrações de cálcio das amostras de 37 animais e do diluente do sêmen congelado.

Para obter uma concentração de cálcio do plasma seminal mais precisa, subtraiu-se a concentração de 36 ug/ml de cálcio encontrada no diluente do sêmen.

A análise de variância indicou diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.01\%$) tanto para repetições como para indivíduos, como mostra a Tabela 3. A grande variabilidade intrínseca de cada repetição se deve provavelmente à diferentes lotes de sêmen que foram analisados. As diferenças entre indivíduos indicam que há um controle genético para a liberação de cálcio extracelular.

Tabela 3. Análise de variância para a concentração de cálcio do plasma seminal bovino.

Varição	Grau de Liberdade	Quadrados Médios
repetições	2	14.772,246
indivíduos	36	43.456,435**
erro	72	5.374,160

**Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade.

As diferenças observadas em amostras do mesmo animal indicam que é necessário um maior número de repetições para se obter uma média das concentrações com um menor erro.

A análise das médias, como mostrado na Tabela 4 revela diferenças significativas entre touros com $P < 0.05\%$, onde a prevalência entre touros foi de 130-400ug/ml, sendo o mínimo detectado de 92 e o máximo de 585 ug/ml de cálcio no plasma seminal.

O pool de touros com alterações morfológicas espermáticas apresentou no plasma seminal bovino baixa concentração de cálcio que provavelmente devido a defeitos na membrana acrossomal podem ter ocorrido alterações no fluxo de cálcio extracelular.

Tabela 4. Comparação de médias das concentrações de cálcio no plasma seminal bovino de 37 amostras.

Raça do touro	*Média da concentração de cálcio ug/ml						
Girolandesa 2	585	A					
Girolandesa 5	533	A					
Gir 1	403	B					
Holandesa 1	401	B					
Holandesa 2	388,8	B	C				
Guzerá 2	383	B	C				
Holandesa 3	357,8	B	C	D			
Girolandesa 4	295	B	C	D	E		
Girolandesa 1	265		C	D	E	F	
Girolandesa 7	250			D	E	F	G
Simental 4	223,3				E	F	G H
Holandesa 4	215,3				E	F	G H
Gir 2	204,8				E	F	G H
Girolandesa 8	204,3				E	F	G H
Nelore 1	199				E	F	G H
Aberdeen	194,7				E	F	G H
Nelore 3	194,3				E	F	G H
Holandesa 6	193,3				E	F	G H
Girolandesa 6	188				E	F	G H
Gir 5	186				E	F	G H
Simental 2	173,7				E	F	G H
Simental 3	171,3				E	F	G H
Gir 7	170,3				E	F	G H
Nelore 2	160,3				E	F	G H
Limousine 2	159				E	F	G H
Caracu	156,3				E	F	G H
Dinamarqueza	133,7					F	G H
Girolandesa 3	131					F	G H
*Pool	130					F	G H
Gir 3	114,7						G H
Gir 4	110,7						G H
Limousine 1	108						G H
Simental 1	107						G H
Guzerá 1	106,7						G H
Gir 6	105,7						G H
Holandêza 5	92,7						H
Nelore 4	92						H

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

*Pool de 5 touros com alterações morfológicas espermáticas.

4.4. Análise da Reação Acrossômica

Quatorze das 37 amostras dos touros foram analisadas quanto a capacidade de sofrerem reação acrossômica *in vitro*. Esta técnica foi escolhida, pois as condições utilizadas são as mesmas para todos os touros, não havendo variação de fêmeas, os resultados apresentam somente variações presentes no sêmen.

Durante a técnica de RA *in vitro* foram verificados a motilidade e o vigor do sêmen após descongelamento, antes da incubação e quatro horas de incubação, ou seja antes da adição de LPC, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Motilidade e vigor do sêmen durante a RA *in vitro*.

Touro	Motilidade/Vigor % / 0-5 (após descongelamento)		Motilidade/Vigor % / 0-5 (antes incubação)		Motilidade/Vigor % / 0-5 (após incubação)	
Simental 4	80	03	80	03	20	02
Simental 3	90	04	70	03	20	02
Simental 1	90	04	60	03	10	02
Nelore 4	60	02	60	02	10	02
Nelore 3	90	05	85	04	08	01
Holandesa 6	70	03	70	03	05	01
Gir 7	90	02	90	02	20	02
Gir 6	90	04	80	03	30	03
Gir 5	80	04	80	04	15	02
Gir 4	80	04	75	03	20	02
Gir 3	80	04	60	03	15	02
Gir 2	95	05	60	04	15	02
Caracu	90	04	80	03	05	01
Aberdeen	80	03	70	03		

A coloração das lâminas realizada com os corantes Eritrosina B e Ácido Flaviânico (LENZ et al., 1983) foi escolhida por ser a mais utilizada atualmente e principalmente por sua rapidez e praticidade. Os espermatozoides que sofreram reação acrossômica (RA positiva) se diferenciam daqueles que não sofreram por apresentar a região do acrossoma mais clara que o restante do espermatozoide (RA negativo), como mostra a Figura 9.

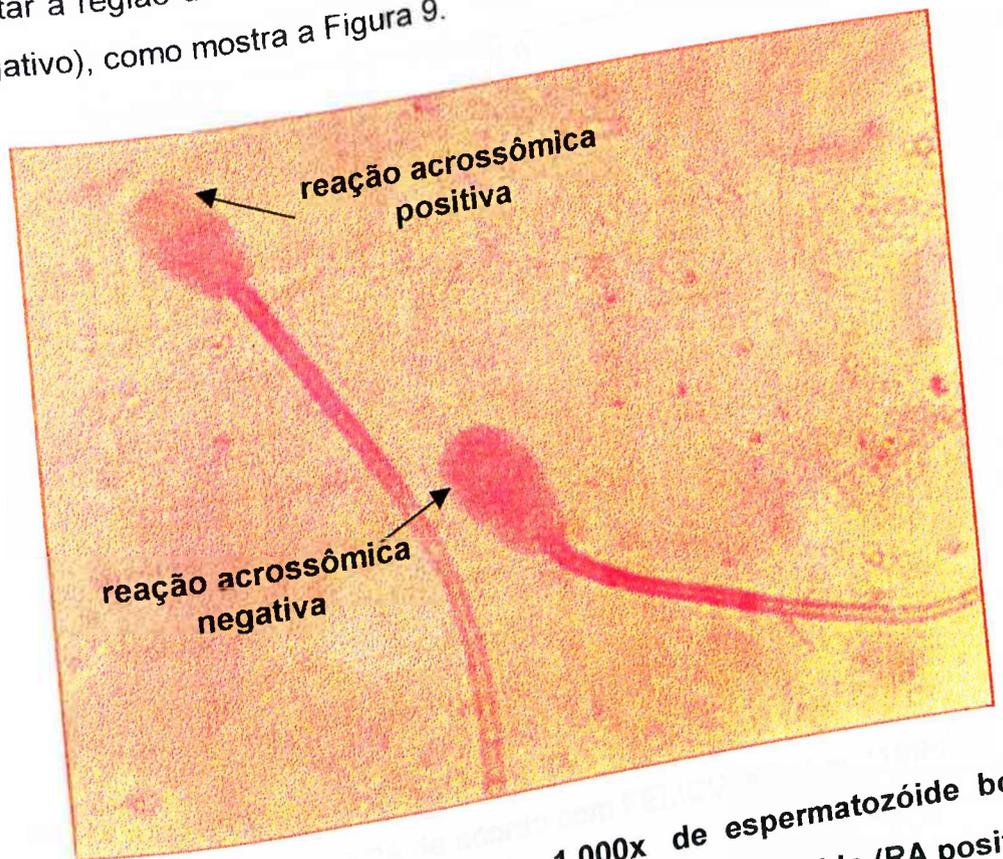


Figura 9. Foto com aumento 1.000x de espermatozoide bovino. Espermatozoides com acrossoma reagido (RA positivo) e acrossoma não reagido (RA negativo).

Foi feito a contagem dos espermatozoides e o cálculo do índice, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Índice de reação acrossômica do sêmen de 14 amostras.

Touro	Índice RA
Gir 3	10
Gir 7	6,5
Holandesa 6	5,6
Simental 4	4,6
Simental 3	4,6
Aberdeen	4,3
Gir 6	3,5
Gir 5	2,6
Gir 4	2,5
Gir 2	2,3
Nelore 4	2,05
Simental 1	2,0
Nelore 3	1,9
Caracu	1,5

As 14 amostras analisadas apresentaram um índice variando de 1,5 à 10, tendo como média 3,9, que está de acordo com FELICIANO et al. (1996).

4.5. Correlação das proteínas do espermatozóide, do plasma seminal, atividade da fosfolipase A₂, cálcio do plasma seminal e reação acrossômica.

Foram analisadas todas as proteínas que apresentaram polimorfismo nos perfis eletroforéticos dos 37 touros estudados e que possam possuir alguma importância no processo de fertilização bovina.

A correlação entre as proteínas detectadas por eletroforese dos touros e a atividade da PLA₂ não foi significativa. Isto pode ser explicado por vários fatores que de acordo com CHANG et al. (1987) podem influenciar na atividade da PLA₂ mesmo após a sua transcrição e tradução. Estes fatores seriam a proteína Kinase

C, proteínas regulatórias nucleotídeo guanidina, IP3, DAG e cAMP. O cAMP pode inibir a atividade PLA₂ ligando-se a enzima ou substituindo o cálcio livre na forma estocada, que é essencial para sua atividade (VAN DEN BOSCH, 1980). Outro mecanismo que pode inibir sua atividade é a formação da proenzima da PLA₂ que requer clivagem proteolítica para se tornar ativa, como demonstrado em PLA₂ de espermatozóide humano por GUÉRETTE et al. (1988). O processo de congelamento e descongelamento do sêmen também diminui a atividade da PLA₂ em suínos em aproximadamente 50% da atividade encontrada no sêmen fresco (DYCK e BUHR, 1993).

Correlação entre proteínas e concentração de cálcio no plasma seminal bovino mostrou que existe um coeficiente significativo com 10 proteínas analisadas nos perfis eletroforético dos animais, sendo sete proteínas presentes no espermatozóide e três presentes no plasma seminal, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Correlação entre proteínas do sêmen bovino e concentração de cálcio do plasma seminal bovino.

Proteína (kDa)	Coefficiente de Correlação do Cálcio
	- 0,50
31,8	0,71
20,9	0,41
16,2	0,38
31,1	0,46
27,3	0,40
20,8	0,54
17,9	0,61
*29,9	0,34
*18,1	-0,34
*16,2	

*Proteínas do Plasma Seminal

As proteínas que apresentaram um coeficiente de correlação positivo indicam que elas podem estar atuando direta ou indiretamente na liberação do cálcio do espermatozóide. Já as proteínas que apresentaram um coeficiente de correlação negativo indicam que elas podem estar atuando indiretamente, por inibindo a liberação de cálcio extracelular, por

serem provavelmente proteínas regulatórias do fluxo de cálcio danificadas pelo processo de congelamento.

A reação acrossômica apresentou um coeficiente de correlação positivo significativo (0,71) somente com a proteína da membrana do espermatozóide de 15,7 kDa e um coeficiente de correlação negativo (0,61) com a proteína da membrana do espermatozóide de 31,1 kDa, como mostra a Tabela 8. A proteína de aproximadamente 15,7 kDa pode ser uma proteína ZRK (NAZ et al., 1994) importante na ligação do espermatozóide ao óvulo, e provavelmente a proteína de 31,1 kDa é também uma ZRK que por se apresentar em forma de dímero não estimula um ligante no espermatozóide humano, que é essencial para uma cascata regulatória de sinais na reação acrossômica (LEYTON et al., 1992).

Segundo LLANOS et al. (1995) o cálcio é de grande importância para a RA e de acordo com RÖNKKÖ et al. (1994) a PLA₂ também tem fundamental importância na RA, mas os resultados deste trabalho não mostraram correlação dos íons cálcio, atividade da fosfolipase A₂ e RA. É provável que a quantidade de cálcio e de atividade da PLA₂ disponível no espermatozóide bovino mesmo significativamente diferente entre touros, seja suficiente para que a RA aconteça, tornando-se portanto, fatores secundários para o processo de fertilização do sêmen bovino, resultados que se diferenciam do observado por FLORMAN et al. (1989). Os autores afirmam que o aumento da concentração do cálcio extracelular é condição para a indução da RA; contudo, neste estudo diferenças na concentração do cálcio extracelular não se correlacionaram com a RA.

Tabela 8. Correlação entre proteínas do sêmen bovino, atividade fosfolipásica A₂, concentração de íons cálcio do plasma seminal e reação acrossômica.

	Coefficiente de Correlação com a RA
Proteína de Membrana 15,7 kDa	0,71
Proteína de Membrana 31,1 kDa	- 0,61
Atividade da PLA ₂	0
Concentração de cálcio	0

5- CONCLUSÕES

- A análise dos perfis eletroforéticos das proteínas (totais e da membrana) do espermatozóide e do plasma seminal bovino revelou uma variabilidade proteica entre touros. Foram identificadas diferenças qualitativas e quantitativas de proteínas que podem ser importantes na ligação do espermatozóide ao óvulo e na indução da RA.
- A técnica criada por espectrofotometria com o uso de Rodamina 6G e lecitina de ovo detectou atividade da fosfolipase A_2 de 0,001 à 2,8 unidades/minuto/microlitro. Sua quantificação revelou uma diversidade entre touros.
- A quantificação de cálcio do plasma seminal bovino revelou diferenças significativas entre touros, indicando que deve existir um controle genético para a liberação de cálcio extracelular.
- Coeficiente de correlação entre concentração de cálcio do plasma seminal bovino e proteínas do sêmen indicam que proteínas de massas moleculares de aproximadamente 31, 27, 20, 18 e 16 kDa do espermatozóide, bem como as proteínas de 29, 18 e 16 kDa do plasma seminal apresentaram um coeficiente de correlação significativo, podendo estar atuando na ativação do fluxo de cálcio extracelular ou inibição, como é o caso das proteínas de 31kDa do espermatozóide e 16 kDa do plasma seminal que apresentaram um coeficiente de correlação negativo.
- A proteína da membrana de 15,7 kDa que apresentou correlação positiva significativa com a RA sugere que esta proteína é importante na ligação do

espermatozóide ao óvulo, podendo ser uma proteína ZRK. A proteína de 31,1 kDa que apresentou um coeficiente de correlação negativo com a RA pode atuar na ligação do espermatozóide com a ZP do óvulo. A proteína de 15,7 kDa que apresentou correlação significativa (0,71) com a RA deve ser um fator de grande importância podendo ser utilizada como um marcador molecular para a fertilidade na análise de sêmen de touros.

- Como já descrito, a PLA_2 e o cálcio possuem grande importância na RA, mas de acordo com os resultados obtidos não existiu correlação significativa entre eles, revelando que as quantidades de cálcio e PLA_2 mesmo significativamente diferentes entre touros, podem ser suficientes para induzir a RA, devendo ser então fatores secundários para o processo de fertilização bovina. A fertilidade bovina é um processo complexo multifatorial, onde seu estudo não se limita somente a um controle genético, mas também a um controle ambiental.

6- BIBLIOGRAFIA

- ABDULLAH, M.; WIDGREN, E. E.; O'RAND, M. G. 1991. A mammalian sperm lectin related to rat hepatocyte lectin-2/3. **Mol. Cell. Biochem.** **103**: 155-161.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. 1991. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, Viçosa-MG. p. 13-20.
- ANDERSON, R. A.; OSWALD, C.; LETO, S.; ZANEVELD, L. J. D. 1981. Inhibition of human acrosin by fructose and other monosaccharides. **Biol. Reprod.** **22**: 1079- 1082.
- ANTAKI, P.; LANGLAIS, J.; ROSS, P.; GUÉRETTE, P.; ROBERTS, K. D. 1988. Evidence for two forms of phospholipase A₂ in human semen. **Gamete Res.** **19**: 305-314.
- ANTAKI, P.; GUÉRETTE, P.; CHAPDELAINÉ, A.; ROBERTS, K. D. 1989. Detection of phospholipase A₂ in human spermatozoa. **Biol. Reprod.** **41**: 241-246.
- ATREJA, S. K.; ANAND, S. R. 1985. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymis. **J. Reprod. Fert.** **74**: 687-691.
- BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. 1993. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. **Can. J. Anim. Sci.** **74**: 45-51.

- BAILEY, J. L.; STOREY, B. T. 1994. Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the tyrophostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. **Mol. Reprod. Dev.** **39**: 297-308.
- BALDI, E.; KARAUZS, C.; FORTI, G. 1995. Nongenomic actions of progesterone on human spermatozoa. **Trends in Endocrinol Metab.** **6**: 198-205.
- BARISIC, D.; SCOBAY, M. J.; JOHSON, D. E.; JEYENDRAN, R. S. 1994. The effect of egg yolk medium on human spermatozoa in milk on sperm penetration into zona-free hamster oocytes and on sperm binding to the human zona pellucida. **Fertil. Steril.** **62**: 172-175.
- BENOFF, S.; RUSHBROOK, J. I.; HURLEY, I. R.; MANDEL, F. S.; BARCIA, M.; COOPER, G. W.; HEB, A.; SHUR, D.; NEELY, C. A. 1988. Plasma membrane association, purification and partial characterization of mouse sperm B-1,4-galactosyltransferase. **J. Biol. Chem.** **263**: 17706-17714.
- BLACKMORE, P.; BEEBE, S. J.; DANFORTH, D. R.; ALEXANDER, N. 1990. Progesterone and 17α -hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. **J. Biol. Chem.** **265**: 1376-1380.
- BLACKMORE, P. F.; LATTANZIO, F. A. 1991. Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **181**: 331-6.
- BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. **Dev. Biol.** **95**: 317-324.

- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8: 93-99.
- BOOKBINDER, L. H.; CHENG, A.; BLEIL, J. D. 1994. Tissue and species-specific expression of sp 56, a mouse sperm fertilization protein. **Science** 269: 86-88.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- BREIBART, H.; LAX, J.; ROTEM, R.; NAOR, Z. 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **J. Biochem.** 281: 473-476.
- BURKS, D. J.; CARBALLADA, R.; MOORE, H. D.; SALING, P. M. 1995. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. **Science** 269: 83-86.
- BURKS, D. J.; MCLESKEY, S. B.; MORALES, P.; SALING, P. M. 1996. Recombinant human ZP3 activates human sperm ZRK. **Submitted.**
- BYRNE, B. D. K.; HUNGUND, R. E. B. 1979. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. **Biochemistry. Biophys. Acta** 558: 257-266.
- CHANDONNET, L.; ROBERTS, K. D.; CHAPDELAINE, A.; MANJUNATH, P. 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Mol. Reprod. Dev.** 26: 313-318.
- CHANG, J.; MUSSER, J. H.; MCGREGOR, H. 1987. Phospholipase A₂: function and regulation. **Biochemistry. Pharmacol.** 36: 2429-2436.

- CLARK, E. N.; CORRON, M. E.; FLORMAN, H. M. 1993. Caltrin, the calcium transport regulatory protein of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *J. Biol. Chem.* **267**: 14061-14067.
- CROSS, N. K.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. 1988. Induction of the acrosome reaction by human zona pellucida. *Biol. Reprod.* **38**: 235-244.
- DANIEL, L. W. 1985. **Phospholipases**. In: **Biochemistry of arachidonic acid metabolism**. Edited by WEM Lands. Boston, Martinus Nijhoff Publishing. 175- 193.
- DE HAAS, G. H.; POSTENNA, N. M.; NIEUWENHVIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. 1968. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochemy. Biophys. Acta* **159**: 103-106.
- DE LEEUW, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. 1991. **Boar semen preservation**. II The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. Paul Parey Sci. Publ., Berlin, Germany.
- DENNIS, E. A. 1983. **Phospholipases**. In: **The enzymes**. Edited by Boyer. Academic Press, New York. XVI: 307-351.
- DYCK, M. K.; BUHR, M. M. 1993. Phospholipase A₂ activity in fresh and cryopreserved spermatozoa from boars. *Can. J. Anim. Sci.* **74**: 59-64.
- DYSON, A. L. M. B.; ORGEBIN-CRIST, M. C. 1973. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* **93**: 391-402.

- ELIASSON, R. 1976. **Seminal plasma, accessory genital glands and infertility.** In **Male Infertility Work. Treatment and Research.** Edited by ATK Cockett, RL Urry. New York, Grune and Stratton. 189.
- ENDO, Y.; LEE, M. A.; KOPF, G. S. 1987. Evidence for a role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida induced mouse sperm acrosome reaction. **Dev. Biol.** **119**: 210-216.
- ENDO, Y.; LEE, M. A. 1987. Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. **Dev. Biol.** **119**: 210-216.
- EPIFANO, O.; DEAN, J. 1994. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immun contraception. **Reprod. Fertil. Dev.** **6**: 319-330.
- ESPONDA, P.; LAHOS, D. G.; FIFFO, M. 1991. Phospholipase A₂ in hamster spermatozoa: Localization and participation in the acrosome reaction. **Comparative spermatology 20 years after** **75**: 161-164.
- FELICIANO SILVA, A. E. D.; RAMALHO, M. F. D.; CAMPANELLI, A. C.; WATANABE, Y. F.; RODRIGUES, L. H.; FREITAS, A. R.; HOSSEPIAN, V. F. Taxa de reação acrossômica como indicador de fertilidade de touros. In: **Congresso Brasileiro das Raças Zebuínas, 2º, 1996, Uberaba, MG.**
- FLORMAN, H. M.; WASSARMAN, P. 1985. M. O-Linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. **Cell.** **41**: 313-324.
- FLORMAN, H. M.; TOMBES, R. M.; FIRST, N. L.; BABCOCK, D. F. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G-protein promoted elevation in Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Dev. Biol.** **135**: 133-146.

- FLORMAN, H. M.; LEMOS, J. R.; ARNOULT, C.; OBERDOF, J. A.; ZENG, Y. 1995. **Exo(cito)tic ion channels in mammalian sperm.** In: **Human Acrosome Reaction.** Eds: Fenichel P, Panrinaud J. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., Collioure, France. 179-189.
- FRANCAVILLA, S.; GABRIELE, A.; ROMANO, R.; GIANAROLI, L.; FERRARETTI, P.; FRANCAVILLA, F. 1994. Sperm-zona pellucida binding of human sperm is correlated with the immunocytochemical presence of proacrosin and acrosin in the sperm head boar not with the proteolytic activity of acrosin. **Fertil. Steril.** **62**: 1226-1233.
- FRANKEN, D. R.; MORALES, P.; HABENICHT, U. F. 1996. Inhibition of G-protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding. **Fertil. Steril.** **66**: 1009-1011.
- FRY, M. R.; GHOSH, S. S.; EAST, J. M.; FRANSON, R. C. 1992. Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: Effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. **Biol. Reprod.** **47**: 751-759.
- GALIONE, A.; McDOUGALL, A.; BUSA, W. B.; WILLMOTT, N.; GILLOT, I.; WHITAKER, M. 1993. Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. **Science** **261**: 348-351.
- GAMZU, R.; YOGEV, L.; PAZ, G.; YAVETZ, H.; LOCHTENBERG, D. 1997. Reduction of sperm cholesterol:phospholipid ratio is a possible mechanism for enhancement of human sperm binding to the zona pellucida following incubation with phosphatidylcholine liposomes. **Biol. Reprod.** **57**: 539-546.

- GOLUBOFF, E.T.; MERTZ, J. R.; TRES, L. L.; KERSZENBAUM, A. L. 1995. Galactosyl receptor in human testis and sperm is antigenically related to the minor C-type (Ca^{2+} dependent) lectin variant of human and rat liver. **Mol. Reprod. Dev.** 40: 460-466.
- GUÉRETTE, P. L.; LANGLAIS, J.; ANTAKE, P. L.; CHAPDELAINE, A.; ROBERTS, K. D. 1988. Activation of phospholipase A_2 of human spermatozoa by proteases. **Gamete Res.** 19: 203-214.
- HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. 1977. Amino acid sequence of phospholipase $A_{2-\alpha}$ from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A_2 based upon structural determinants. **J. Biol. Chem.** 252: 4913-4921.
- HOMONNAI, Z. T. 1978. The composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. **Fertil. Steril.** 29: 539-542.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, E. M. 1964. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochemistry.** 9: 401-407.
- IZUMI, S.I.; MAKINO, T.; IIZUKA, R. 1985. Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in the seminal plasma and human semen parameters. **Fertil. Steril.** 43: 617-620.
- JEAN, M.; DACHEAUX, J-L.; DACHEUX, F.; SAGOT, P.; LOPES, P.; BARRIERE, P. 1995. Increased zona-binding ability after incubation of spermatozoa with proteins extracted from spermatozoa of fertile semen. **J. Reprod. Fertil.** 105: 43-48.
- JONES, R. 1990. Unusual fucoidin-binding properties of chymotrypsinogen and trypsinogen. **Biochemistry. Biophys. Acta.** 1037: 227-232.

- KALAB, P.; VISCONTI, P.; LECLERC, P.; KOPF, G. S. 1994. p95 the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. **J. Biol. Chem.** 269: 3810-3817.
- KARABINUS, D. S. 1991. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **J. Dairy Sci.** 74: 3836-3848.
- KRUGER, T.; ACOSTA, A.; SIMMONS, K.; SWANSON, R.; MATTA, J.; OEHNINGER, S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.** 49: 112.
- KUZAN, F. B.; FLEMING, A. D.; SEIDEL, G. E. 1984. Successful fertilization *in vitro* of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. **Fertil. Steril.** 41: 766-770.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Res.** 12: 183-224.
- LANGLAIS, J.; CHAFOULEAS, J. G.; INGRAHEM, R.; VIGNEAULT, N.; ROBERTS, K. D. 1992. The phospholipase A₂ of human spermatozoa, purification and partial sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 182: 208-214.
- LASSALLE, B.; TESTART, J. 1994. Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. **J. Reprod. Fert.** 101: 703-711.

- LECLER, P.; KOPF, G. S. , 1995. Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol. Reprod.* **52**: 1227-1233.
- LEE, M. A.; CHECK, J. H.; KOPF, G. S. 1992. A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* **31**: 78-86.
- LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LOHSE, J. K.; FIRST, N. L.; AX, R. L. 1983. Chondroitin sulfate facilitates on acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* **28**: 683-690.
- LEYTON, L.; SALING, P. M. 1989. 95kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell.* **57**: 1123-1130.
- LEYTON, L.; LEGUEN, P.; BRUNCH, D.; SALING, P. M. 1992. Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 11692-11695.
- LIN, Y.; MAHAN, K.; LATHROP, W. F.; MYLES, D. G.; PRIMAKIFF, P. A. 1994. 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**: 1157-1163.
- LLANOS, M. N.; LUI, C. W.; MEIZEL, S. 1982. Studies of phospholipase A₂ related to hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* **221**: 107-117.
- LLANOS, M. N.; MORALES, P.; RIFFO, M.S. 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **267**: 200-210.

- MENDOZA, C.; SOLER, A.; TESARIK, J. 1995. Nongenomic steroid action: independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **210**: 518-23.
- MILLER, D. J.; GONG, X.; SHUR, B. D. 1993. Sperm require beta-N-acetyl glucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. **Development** **118**: 1279-89.
- MOLLER, C. C.; WASSARMAN, P. M. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. **Dev. Biol.** **132**: 103-112.
- MORALES, P.; RIQUELME, R.; SALGADO, A. M.; UMAÑA, A.; LEIVA, L. 1994. Effect of GnRH upon sperm ability to bind to the human zona pellucida (hZP). **Biol. Reprod.** **50**: 147.
- MORALES, P.; LLANOS, M. 1996. Interaction of human spermatozoa with the zona pellucida of oocyte: Development of the acrosome reaction. **Frontiers in bioscience** **1**: 146-160.
- MYLES, D. G.; HYATT, H.; PRIMAKOFF, P. 1987. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during *in vitro* fertilization. **Dev. Biol.** **121**: 559-567.
- NAGAE, T.; RYUZO, Y.; PRAKASH, N. S.; HIROKO, Y. 1986. Acrosome reaction in human spermatozoa. **Fertil. Steril.** **45**: 701-707.
- NAOR, Z.; ROTEM, R.; KALINA, M. 1995. Role of protein kinase C in human sperm acrosome reaction. In: **Human Sperm Acrosome Reaction**. Eds: Fenichel P, Parinaud J, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., Collioure, France. 217-223.

- POOL, A. R.; HOWELL, J. I.; LUCY, J. A. 1970. Lipoecitin and cell fusion. **Nature** 227: 810-817.
- POPESCU, O. 1983. A simple method for drying polyacrilamide slabs gels using glycerol and gelatin. **Electrophoresis** 4: 432-435.
- RENARD, J. P. 1984. Methods of conserving gametes and embryos of farm mammals. **Livest. Prod. Sci.** 11: 49-59.
- RIFKIN, J. M. ; OLSON, G. E. 1985. Characterization of maturation-dependent extrinsic proteins of the rat sperm surface. **J. Cell. Biol.** 100: 1582-1591.
- ROLDAN, E. R. S.; HARRISON, R. A. P. 1993. Diacylglycerol in the exocytosis of the mammalian sperm acrosome. **Biochem. Soc. Trans.** 21: 284-289.
- ROLDAN, E. R. S.; MOLLINEDO, S. 1991. Diacylglycerol stimulates the Ca^{2+} dependent phospholipase A_2 on ram spermatozoa. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 176: 294-300.
- ROLDAN, E. R. S.; FRAGIO, C. 1993. Phospholipase A_2 activation and subsequent exocytosis in the Ca^{2+} -ionophore- induced acrosome reaction of ram spermatozoa. **J. Biol. Chem.** 268: 13962-13970.
- ROLDAN, E. R. S.; MURASE, T. 1994. Polyphosphoinositides-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. **J. Biol. Chem.** 269: 23583-23589.
- ROLDAN, E. R. S.; MURASE, T.; SHI, Q-X. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. **Science** 266: 1578-1581.

- RÖNKKÖ, S.; LAHTINEN, R.; VANHA-PERTTULA, T. , 1991. Phospholipases A₂ in the reproductive system of the bull. **Int. J. Biochem.** **23 (5/6)**: 595-603.
- RÖNKKÖ, S.; LINNALA-KANKKUNEN, A.; TUHKANEN, A. L. 1994. Partial characterization of a fraction from bull seminal vesicle fluid that potentiates the bull sperm acrosome reaction *in vitro*. **Andrologia** **26**.
- ROSADO, A.; VELAZQUEZ, A.; LARA-RICALDE, R. 1973. Cell Polarography. II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. **Fertil. Steril.** **24**: 349-354.
- ROSIERE, T. K.; WASSARMAN, P. M. 1992. Identification of a region mouse zona pellucida glycoprotein mZP3 that possesses sperm receptor activity. **Dev Biol** . **154**: 309-317.
- SALING, P. 1991. How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. **Biol. Reprod.** **44**: 246-251.
- SCHEUR, W. 1989. Phospholipase A₂-regulation and inhibition. **Klin. Wochenschr.** **67**: 153-159.
- SEILHAMER, J. J.; PLANT, S.; PRUZANSKY, W.; SNILLING, J.; STEFANSKI, E.; VADAS, P.; JOHNSON, L. K. 1989. Multiple forms of phospholipase A₂ in arthritic synovial fluid. **J. Biochem.** **106**: 38-42.
- SHUR, B. D.; NEELY, C. A. 1988. Plasma membrane association, purification and partial characterization of mouse sperm B-1,4-galactosyltransferase. **J. Biol. Chem.** **263**: 17706-17714.
- SOKOL, R.Z.; PETERSON, M.; HEBER, D.; SWERDLOFF, R. S. 1985. Identification and partial characterization of gonadotropin-releasing hormone-like factors in human seminal plasma. **Biol. Reprod.** **33**: 370-374.

- SPIEGEL, A.; CARTER, A.; BRANN, M.; COLLINS, R.; GOLDSMITH, P.; SIMONDS, W.; VINITSKY, R.; EIDE, B.; ROSSITER, K.; WEINSTEIN, L.; WOODARD, C. 1988. Signal transduction by guanidine nucleotide binding protein. **Rec. Prog. Horm. Res.** **44**: 337-375.
- SRIVASTAVA, P. N.; FAROOQUI, A. A. 1988. Studies on neuraminidase activity of the rabbit endometrium. **J. Exp. Zool.** **245**: 106-110.
- TAKAYAMA, K.; HARA, S.; KUDO, I.; INOUE, K. 1991. Detection of 14-kDa group II phospholipase A₂ in human seminal plasma. **Biochemistry. Biophys. Res. Commun.** **178**: 1505-1511.
- TAKKAR, J. K.; EAST, J.; SEYLER, D.; FRANSON, R. C. 1983. Surface-active phospholipase A₂ in mouse spermatozoa. **Biochim. Biophys. Acta.** **754**: 44-50.
- TAKKAR, J. K.; EAST, J.; FRANSON, R. C. 1984. Modulation of phospholipase activity associated with human sperm by divalent cations and calcium antagonists. **Biol. Reprod.** **30**: 679-686.
- TESARIK, J. 1985. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** **74**: 383-388.
- TESARIK, J.; MENDOZA, C.; MOOS, J.; CARRERAS, A. 1992. Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. **Fertil. Steril.** **58**: 784-792.
- TESARIK, J.; MOOS, J.; MENDOZA, C. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. **Endocrinology** **133**: 328-335.

- TEZON, J. G.; RAMELLA, E.; CAMEO, M. S.; BLAQUIER, J. A. 1985. Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymid and their association with spermatozoa. **Biol. Reprod.** **32**: 591-597.
- THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. 1995. Phosphatidylcholine- binding of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biol. Reprod.** **52**: 1372-1379.
- TULSIANI, D. R. P.; SKUDLAREK, M. D.; ORGBIN-CRIST, M. C. 1990. Human sperm plasma membrane posses alpha-D-mannosidase activity but no galactosyltransferase activity. **Biol. Reprod.** **42**: 842-858.
- VAN DEN BOSH, H. Intracelular phospholipases A. 1980. **Biochemistry. Biophys. Acta** **604**:191-246.
- VERGER, R.; FARRATO, F.; MASBACH, C.; PIERONI, G. 1982. Novel intestinal phospholipase A₂: purification and some molecular characteristics. **Biochemistry** **21**: 6883-6889.
- WALENSKY, L. D.; SNYDER, S. H. 1995. Inositol 1,4,5-triphosphate receptors selectively localized to acrosomes of mammalian sperm. **J. Cell. Biol.** **130**: 857- 869.
- WARD, C. R.; STOREY, B. T.; KOPFT, G. S. 1992. Activation of G1 protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of zona pellucida, the egg's extracellular matrix. **J. Biol. Chem.** **267**: 14061-14067.
- WARD, C. R.; KOPF, G. S. 1993. Molecular event mediating sperm activation. **Dev. Biol.** **158**: 9-34.
- WASSARMAN, P. M. 1990. Profile of a mammalian sperm receptor. **Development.** **198**: 1-17.

- WASSARMAN, P. M. 1988. Zona pellucida glycoproteins. **Ann. Rev. Biochem.** **57**: 414-442.
- WEINMAN, S.; ORES-CARTON, D.; RAINTEAU, D.; PUSZKIN, S. 1986. Immunoelectron microscopic localization of calmodulin and phospholipase A₂ in spermatozoa. **J. Histochem. Cytochem.** **34**: 1171-1179.
- WURL, M. L. P.; KUNZE, H. 1985. Purification and properties of phospholipase A₂ from human seminal plasma. **Biochem. Biophys. Acta** **834**: 411-418.
- YANAGIMACHI, R. 1981. **Fertilization and embryonic development in vitro: Mechanisms of fertilization in mammals**. Plenum Press, New York, NY.
- YANAGIMACHI, R. 1982. Requirement of extracellular calcium for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. **Gamete Res.** **5**: 323-344.
- YANAGIMACHI, R. 1988. **Mammalian Fertilization**. In: **The Physiology of Reproduction**. Eds: Knobil E, Neil J D, Raven Press, New York. 189-317.
- YANG, J.; SERRES, C.; PHILIBERT, D.; ROBEL, P.; BAULIEU, E. E.; JOUANNET, P. 1994. Progesterone and RU486: opposing effects on human sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **91**: 529-33.
- YING, S. Y.; LING, N.; BOHLEN, P.; GUILLEMIN, R. 1981. Gonadotropins: peptides in ovarian follicular fluid stimulating the secretion of pituitary gonadotropins. **Endocrinology** **108**: 1206-1215.
- YUDIN, A. I.; GOTTLEIB, W.; MEIZEL, S. 1988. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. **Gamete Res.** **20**: 11-24.

DE HAAS, G. H.; POSTENNA, N. M.; NIEUWENHVIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. 1968. Purification and properties of phospholipase A from porcine Pancreas. **Biochemistry. Biophys. Acta** **159**: 103-106.

LLANOS, M. N.; MORALES, P.; SALGADO, A. M.; VIGIL, P. 1995. **Effect of lysophospholipids on the human sperm acrosome reaction.** In: **Human Sperm Acrosome Reaction.** Eds: Fenichel P, Parinaud J. Colloque INSERM /John Libbey Eurotext Ltd, Collioure, France. 410-411.

