

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA FOSFOLIPASE C ZETA EM
EXTRATOS ESPERMÁTICOS DE GATOS DOMÉSTICOS
NORMOSPÉRMICOS E TERATOSPÉRMICOS

ANA IZABEL SILVA BALBIN VILLAVARDE

Botucatu – SP
Agosto 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA FOSFOLIPASE C ZETA EM
EXTRATOS ESPERMÁTICOS DE GATOS DOMÉSTICOS
NORMOSPÉRMICOS E TERATOSPÉRMICOS

ANA IZABEL SILVA BALBIN VILLAVERDE

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Adj. Maria Denise Lopes

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Villaverde, Ana Izabel Silva Balbin.

Localização da proteína fosfolipase C zeta em extratos espermáticos de gatos domésticos normospermicos e teratospermicos / Ana Izabel Silva Balbin Villaverde. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Maria Denise Lopes

Capes: 50504002

1. Gato - Espermatozóides. 2. Fosfolipases. 3. Reprodução animal.

Palavras-chave: Espermatozóide; Fosfolipase C zeta; Gato doméstico; Ultraestrutura; Eletroforese.

Nome do Autor: Ana Izabel Silva Balbin Villaverde

Título: LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA FOSFOLIPASE C ZETA EM EXTRATOS ESPERMÁTICOS DE GATOS DOMÉSTICOS NORMOSPÉRMICOS E TERATOSPÉRMICOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Adj. Maria Denise Lopes
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Adj. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dra. Claudia Barbosa Fernandes
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Prof. Dr. Nei Moreira
Membro
UFPR – Palotina

Data da Defesa: 30 de agosto de 2010.

DEDICATÓRIA

À minha família.

Aos meus pais Antonio e Almerinda que com muito amor e dedicação construíram o alicerce para a minha formação moral e intelectual.

Ao meu irmão Alan Rafael por me ensinar que os sonhos podem se tornar realidade, basta acreditar e correr atrás.

Aos nossos bichinhos de estimação: Joely, Gigi, Julie, Baby, Luis, Léia, Teteco e em memória à Tutu.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado guiando meus passos e por todas as pessoas maravilhosas que colocou em minha vida.

Ao meu namorado Eduardo, por sempre estar ao meu lado, nos bons e maus momentos. Pela amizade, amor, carinho, paciência e dedicação incondicionais. Por várias vezes me ouvir e me aconselhar mesmo sem entender o meu projeto. Pela ajuda com a execução do projeto e por me ajudar a cuidar dos gatos, mesmo sem gostar de gatos. Pelos bons momentos mesmo nas horas mais difíceis.

À professora Maria Denise Lopes, por nove anos de boa convivência, ensinamentos, conselhos, dedicação, incentivo e confiança.

Aos gatos do projeto; Lelo, Branco, Panda, Mustafá, Gato de Botas, Thomas, Tutu, Princesinha e Cinzinha, pelos anos de colaboração em vários projetos do laboratório (mesmo sem saber), pelo carinho, pelos arranhões, pelas mordidas e por serem a melhor parte do meu trabalho.

À professora Fernanda da C. Landim e Alvarenga, pela confiança no laboratório, paciência ao me ouvir, ensinamentos e auxílio durante o projeto.

Ao professor Nereu Carlos Prestes, pelos ensinamentos e ajuda com os gatos do projeto.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, João Carlos P. Ferreira, Frederico Ozanam Papa, Sony Dimas Bicudo, Eunice Oba, Marco Antonio Alvarenga e Cezinande de Meira por todos estes anos de boa convivência e por sempre terem me ajudado quando precisei.

À Fabiana Ferreira de Souza, pela ajuda e ensinamentos na técnica de eletroforese e pelo seu otimismo e bom humor.

Ao professor João Pessoa de Araújo Júnior, do Depto de Microbiologia e Imunologia, IBB, UNESP, pela confiança ao ceder o laboratório e ajuda na execução do projeto.

Ao professor Pedro M. Padilha, do Depto de Química e Bioquímica, IBB, UNESP, por gentilmente ter cedido o aparelho para leitura de eletroforese.

Ao professor Paulo Roberto R. Ramos, do Depto de Física e Biofísica, IBB, UNESP, pela ajuda com a leitura dos géis de eletroforese e simpatia.

À pós-graduanda Renata S. Ramos, pela amizade, pelas boas conversas e pelo carinho e dedicação ao cuidar dos gatos desse projeto.

Às pós-graduandas: Carla Pozzi, Andreza S. Figueiredo, Taís F. da Cruz e Tatiana S. Rascado, pela preciosa ajuda em várias etapas desse projeto.

Aos colegas do laboratório REPAS: Camila, Rodrigo, Bethania, Ana Augusta, Moisés, Bruna e Luis, pela boa convivência e boas risadas.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: Edilson, Walter e Cristina, por sempre me ajudar quando precisei e pelas risadas.

A todos os proprietários dos gatos, por terem confiado em mim.

A todas as pessoas que conviveram comigo na FMVZ durante estes anos e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha história.

À empresa Royal Canin, pela doação de ração.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

***“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.
Essa é a fonte de toda arte e ciências verdadeiras.”***

Albert Einstein

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição do meio ICM (<i>intracellular-like medium</i>).....	25
Quadro 2 - Ajuste do aparelho de IEF.....	33
Quadro 3 - Número total de <i>spots</i> por gel (N ^o <i>Spots</i>), número de <i>spots</i> equivalentes por pareamento e porcentagem de equivalência entre o pareamento para as amostras de proteínas do citosol.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios \pm desvio padrão para volume ejaculado (μL), quantidade total de espermatozóides ejaculado ($\times 10^6$), motilidade total (%), motilidade progressiva (%), integridade de membrana plasmática (%) e porcentagem de espermatozóides com alterações morfológicas (%) de três colheitas de sêmen em dias consecutivos para seis gatos.....	23
Tabela 2 -	Quantidade de espermatozóide utilizado, quantidade de proteína total recuperada e proporção de proteína total recuperada por quantidade de espermatozóides utilizados para os protocolos de extração das proteínas espermáticas do citosol (SE^{C}) e matriz perinuclear (SE^{MP}).....	40
Tabela 3 -	Valores médios para peso molecular (kDa) e quantidade de proteína (μg) das bandas protéicas presentes na eletroforese unidimensional de amostras provenientes do citosol (SE^{C}) e matriz perinuclear (SE^{MP}).....	42
Tabela 4 -	<i>Spots</i> presentes na eletroforese bidimensional das proteínas espermáticas do citosol entre o intervalo de 60 a 80 kDa para todos os gatos. <i>Spots</i> equivalentes apresentam mesma numeração.....	49
Tabela 5 -	<i>Spots</i> presentes na eletroforese bidimensional das proteínas espermáticas da matriz perinuclear de animais normospermicos e teratospémicos. <i>Spots</i> equivalentes apresentam mesma numeração.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de vagina artificial usada para colheita de sêmen..	24
Figura 2 -	Colheita de sêmen em gatos domésticos.....	24
Figura 3 -	Amostras de sêmen de gato no sonicador.....	26
Figura 4 -	Sêmen de gato após processo de sonicação. Setas indicam espermatozóides decapitados. Aumento de 1000x.....	26
Figura 5 -	Sobrenadante lavado e concentrado em membrana de ultrafiltração Amicon Ultra-4.....	27
Figura 6 -	<i>Pellet</i> composto de sulfato de amônio ligado às proteínas espermáticas e formado após centrifugação da amostra....	27
Figura 7 -	Espermatozóide íntegro antes do procedimento de extração das proteínas espermáticas. AC = conteúdo acrossomal, MP = membrana plasmática, MPN = matriz perinuclear, N = núcleo. Aumento de 31.500x.....	37
Figura 8 -	Espermatozóide após procedimento de congelação/descongelação. MAE = membrana acrossomal externa, MP = membrana plasmática, MPN = matriz perinuclear. R = ruptura das membranas plasmática e acrossomal externa. Aumento de 31.500x.....	37
Figura 9 -	Espermatozóide após procedimento de sonicação. Ruptura completa das membranas plasmática e acrossomal externa. MPN = matriz perinuclear. Aumento de 31.500x.....	38

- Figura 10 - Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. Dissolução e ausência parcial da matriz perinuclear com desestruturação da cromatina. MPN = matriz perinuclear, A = ausência da MPN, N = núcleo. Aumento de 23.000x.... 38
- Figura 11 - Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. D = destacamento da matriz perinuclear e desestruturação da cromatina, RC = resquícios de material genético, I = espermatozóide apresentando integridade da matriz perinuclear e do núcleo. Aumento de 9.750x..... 39
- Figura 12 - Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. MPN = matriz perinuclear, MN = membrana nuclear. Aumento de 107.500x (esquerda) e 77.500x (direita)..... 39
- Figura 13 - Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. MPN = matriz perinuclear, MN = membrana nuclear. Aumento de 107.500x (esquerda) e 77.500x (direita)..... 39
- Figura 14 - Gel de eletroforese unidimensional das proteínas espermáticas. Iniciando da segunda coluna da esquerda para a direita, as amostras correspondem ao SE^{MP} de animais normospermico (Normo) e teratospermico (Terato) e ao SE^C dos gatos 1 ao 6, sendo o gato 4 de qualidade seminal intermediária (Interm)..... 41
- Figura 15 - Gel de eletroforese unidimensional das proteínas espermáticas do citosol. Proteínas entre o intervalo de 60 a 80 kDa estão indicadas por seu peso molecular..... 43

Figura 16 -	Distribuição em diferentes intervalos de peso molecular da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas do citosol.....	45
Figura 17 -	Distribuição em diferentes intervalos de ponto isoelétrico da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas do citosol.....	46
Figura 18 -	Distribuição em diferentes intervalos de peso molecular da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas da matriz perinuclear.....	47
Figura 19 -	Distribuição em diferentes intervalos de ponto isoelétrico da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas da matriz perinuclear.....	47
Figura 20 -	Gel de eletroforese bidimensional da amostra de proteína espermática do citosol para o gato 1. Os <i>spots</i> de interesse, entre 60 e 80 kDa, estão enumerados.....	48
Figura 21 -	Gel de eletroforese bidimensional das proteínas espermáticas da matriz perinuclear dos animais normospérmicos. Os <i>spots</i> de interesse estão enumerados.....	51

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

A = miliampere

BCA = ácido bicinconínico

Ca²⁺ = cálcio

[Ca²⁺]_i = concentração intracelular de cálcio

CHAPS = 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano- sulfonato

CSF = fator citostático

DAG = 1,2-diacilglicerol

DPBS = *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

DTT = 1,4-ditiotreitol

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

FIV = fertilização *in vitro*

GDP = guanosina difosfato

GPCR = receptor acoplado à proteína G

GTP = guanosina trifosfato

HEPES = Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)1-piperazinil]-etanosulfônico

IA = inseminação artificial

ICM = *intracellular-like medium*

ICSI = injeção espermática intracitoplasmática

IEF = isoeletrofocalização

IOD = densidade óptica integrada

IP₃ = inositol 1,4,5-trifosfato

IP₃R-1 = receptor do inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1

LiCa²⁺_i = liberação do cálcio intracelular

MAPK = proteína quinase ativadora da mitose

MPF = fator promotor da maturação

mRNA = RNA mensageiro

OsCa²⁺_i = oscilações do cálcio intracelular

pI = ponto isoelétrico

PIP₂ = fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIV = produção *in vitro*

PLC = fosfolipase C

PLCζ = fosfolipase C zeta

PM = peso molecular

PMSF = fenilmetilsulfonilflúor

PTK = proteínas tirosinoquinases

RTK = receptor tirosinoquinase

RyR = receptores de rianodina

SDS = *sodium lauryl sulfate*

SE = extrato espermático

SE^c = extrato espermático do citosol

SE^{MP} = extrato espermático da matriz perinuclear

SFKs = proteínas tirosinoquinase da família Src

SOAF = *Sperm-borne oocyte-activating factor*

TE = transferência de embrião

Tris = trishidroximetilaminometano

tr-kit = forma truncada e intracelular do receptor tirosinoquinase *c-kit*

V = volts

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Resposta oocitária à indução da ativação	7
2. Hipóteses do mecanismo espermático para a ativação oocitária.....	9
2.1. Hipótese da “bomba de cálcio” ou da “condução”.....	10
2.2. Hipótese do ligante/receptor	11
2.3. Hipótese do fator espermático	13
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
1. Local	22
2. Animais	22
3. Colheita e armazenamento do sêmen	24
4. Extração das proteínas espermáticas do citosol – proteínas solúveis .	25
5. Extração das proteínas espermáticas da matriz perinuclear – proteínas não solúveis.....	28
6. Microscopia eletrônica de transmissão	29
7. Eletroforese unidimensional	31
8. Eletroforese bidimensional	32
RESULTADOS.....	35
1. Extração das proteínas espermáticas	36

1.1. Avaliação ultraestrutural	36
1.2. Total de proteína espermática recuperada	40
2. Eletroforese unidimensional	41
3. Eletroforese bidimensional	44
3.1. Número de <i>spots</i> e porcentagem de equivalência	44
3.2. Distribuição das proteínas por massa molecular e ponto isoelétrico	45
3.3. Proteínas espermáticas do citosol	48
3.4. Proteínas espermáticas da matriz perinuclear	51
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	64
BIBLIOGRAFIA	66

Villaverde, A.I.S.B. **Localização da proteína fosfolipase C zeta em extratos espermáticos de gatos domésticos normospérmicos e teratospérmicos.** Botucatu, 2010. 84p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O estudo da proteína fosfolipase C zeta (PLC ζ), considerada o fator espermático ativador do oócito em mamíferos, pode beneficiar algumas técnicas de reprodução assistida, como a injeção espermática intracitoplasmática e transferência nuclear, por propiciar conhecimento a respeito do processo de fertilização e a possibilidade de utilização da PLC ζ presente nos extratos espermáticos. Portanto, o objetivo deste estudo foi localizar a PLC ζ em extratos provenientes do citosol e matriz perinuclear de espermatozóides de gatos domésticos normospérmicos e teratospérmicos. Amostras de sêmen foram colhidas de seis gatos adultos: normospérmicos (n=3), teratospérmicos (n=2) e de qualidade seminal intermediária (n=1). As proteínas do citosol foram extraídas utilizando os procedimentos de sonicação, ultracentrifugação, ultrafiltração e precipitação em sulfato de amônio. Por sua vez, as proteínas da matriz perinuclear foram extraídas após incubação em Na₂CO₃, sonicação, ultracentrifugação, ultrafiltração e precipitação em sulfato de amônio. Com base na avaliação ultraestrutural dos espermatozóides e dosagem de proteína total, foi confirmada a eficiência de ambos os protocolos de extração. As amostras da matriz perinuclear apresentaram 3,3 vezes menos proteína total e diferente perfil protéico na eletroforese unidimensional e bidimensional quando comparadas as amostras obtidas do citosol. Após análise das proteínas encontradas, foi concluído que nos extratos espermáticos do citosol e matriz perinuclear de gatos domésticos normospérmicos e teratospérmicos estão presentes proteínas de peso molecular semelhante ao previamente descrito para a proteína PLC ζ em outras espécies de mamíferos.

Palavras-chave: Gato doméstico; Espermatozóide; Fosfolipase C zeta; Ultraestrutura; Eletroforese.

Villaverde, A.I.S.B. **Localization of the phospholipase C zeta protein in sperm extracts from normospermic and teratospermic domestic cats.** Botucatu, 2010. 84p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The study of phospholipase C zeta protein (PLC ζ), considered as the oocyte activating sperm factor in mammals, could benefit some assisted reproductive techniques, such as intracytoplasmic sperm injection and nuclear transfer, by providing knowledge about the process of fertilization and the possibility of using the PLC ζ contained in the sperm extracts. Thus, the aim of this study was to localize the phospholipase C zeta (PLC ζ) protein in extracts from the spermatozoa cytosol and perinuclear matrix of normospermic and teratospermic domestic cat. Sperm samples were collected from six adult male cats: normospermic (n=3), teratospermic (n=2) and with intermediate sperm quality (n=1). Proteins from the cytosol were extracted using the procedures of sonication, ultracentrifugation, ultrafiltration and precipitation in ammonium sulfate. On the other hand, proteins from perinuclear matrix were extracted after incubation in Na₂CO₃, sonication, ultracentrifugation, ultrafiltration and precipitation in ammonium sulfate. Based on the ultrastructural analysis of the spermatozoa and total protein determination, the efficiency of both extraction protocols was confirmed. Samples from perinuclear matrix showed 3.3 times less total recovered protein and different protein profile in the uni- and bi-dimensional electrophoresis when compared to the samples obtained from the cytosol. After protein profile analysis, it can be concluded that several proteins showing similar molecular weight to that previously described for PLC ζ protein in other mammalian species are presented in both sperm extracts from cytosol and perinuclear matrix of normospermic and teratospermic domestic cats.

Key words: Domestic cat; Spermatozoa; Phospholipase C zeta; Ultrastructure; Electrophoresis.

Introdução

INTRODUÇÃO

A maioria das 36 espécies de felídeos selvagens é classificada como rara, vulnerável ou em perigo de extinção devido à caça ilegal ou perda do *habitat* (NOWELL e JACKSON, 1996). Para os felídeos selvagens em cativeiro, a finalidade conservacionista da propagação natural é reduzida devido a incompatibilidades comportamental ou genética, problemas físicos ou isolamento geográfico (MELLEN, 1991).

Programas de conservação *in situ* e *ex situ* para algumas espécies de mamíferos ameaçadas de extinção podem ser beneficiados com a utilização de técnicas de reprodução assistida, tais como: produção *in vitro* (PIV), transferência de embrião (TE), inseminação artificial (IA), micromanipulação e criopreservação de gametas e embriões e clonagem. Nesse contexto, devido a semelhanças fisiológicas com os demais membros da família Felidae, facilidade de manejo e maior número de exemplares, o gato doméstico é um importante modelo experimental para os felídeos selvagens ameaçados de extinção.

Nos felídeos selvagens, taxas de FIV e de clivagem comparáveis às obtidas no gato doméstico são difíceis de serem alcançadas (GOODROWE et al., 1989; MILLER et al., 1990; DONOGHUE et al., 1992; POPE et al., 1993). Pope et al. (1993) observaram que as taxas de FIV são prejudicadas devido à baixa qualidade espermática dos exemplares de felídeos, incluindo a motilidade. Essa baixa qualidade espermática é uma característica presente em várias espécies de felídeos não domésticos (WILDT et al., 1988), sendo um fator limitante para o sucesso na aplicação rotineira de técnicas como a IA e FIV (WILDT et al., 1992).

Técnicas de fertilização assistida por micromanipulação, especialmente a injeção espermática intracitoplasmática (ICSI), podem ser utilizadas como uma alternativa à FIV convencional, visando aumentar a produção *in vitro* de embriões de felídeos não domésticos. Nos gatos domésticos, o nascimento dos primeiros filhotes viáveis após a utilização da técnica de ICSI foi reportado por Pope et al. em 1998, provando que estes não eram apenas produtos de

partenogênese. Contudo, baixos índices de formação de mórula e, em especial, blastocisto após a ICSI têm sido observados quando comparados à técnica de FIV (POPE et al., 1998; PENFOLD et al., 2003), principalmente em oócitos maturados *in vitro* (GÓMEZ et al., 2000; COMIZZOLI et al., 2006).

Em adição, outra importante técnica de reprodução assistida, a transferência nuclear, mostrou-se viável em gatos domésticos após o nascimento de um filhote por inserção de material genético proveniente de células do *cumulus* em oócitos enucleados (SHIN et al., 2002). Embora as perspectivas dessa tecnologia sejam muito promissoras, a eficiência do processo de transferência nuclear ainda é muito baixa (ALBERIO et al., 2001). Portanto, vários aspectos relacionados aos eventos primários do desenvolvimento embrionário, incluindo a ativação oocitária, remodelamento da cromatina, expressão gênica e a regulação do ciclo celular ainda devem ser investigados.

Estudos voltados à compreensão do(s) mecanismo(s) de ativação oocitária, incluindo fator(es) desencadeante(s) e via(s) de liberação do cálcio intracelular ($LiCa^{2+}_i$), se intensificaram nas últimas décadas, principalmente devido aos avanços na área da reprodução assistida e por fatores como; (1) distúrbios no padrão das oscilações do cálcio intracelular ($OsCa^{2+}_i$) após o procedimento de ICSI (TESARIK et al., 1994; NAKANO et al., 1997; KUROKAWA e FISSORE, 2003), o que desencadeia ausência ou falhas no desenvolvimento embrionário; e (2) a necessidade da ativação artificial dos oócitos no procedimento de transferência nuclear, uma vez que a ativação oocitária é uma etapa crítica nesse procedimento (MACHÁTY e PRATHER, 1998; ALBERIO et al., 2001). Desta forma, é correto afirmar que o sucesso dos protocolos de ICSI e transferência nuclear está diretamente relacionado ao conhecimento prévio dos mecanismos da ativação oocitária. Contudo, em gatos domésticos não há relato de estudos direcionados à compreensão do processo de ativação oocitária fisiológica.

A hipótese da fusão é o modelo de ativação oocitária mais aceito para os mamíferos. Essa hipótese está baseada na existência de um ou vários fatores espermáticos que são liberados para o interior do oócito no momento da fertilização (SAUNDERS et al., 2002). Vários estudos indicam que o

provável fator espermático é uma fosfolipase C, isoforma zeta (PLC ζ), com aproximadamente 70 kDa e presente apenas no espermatozóide (WU et al., 1998; SAUNDERS et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2004; KOUCHI et al., 2004; KNOTT et al., 2005; KUROKAWA et al., 2005; SWANN et al., 2006).

Estudos em humanos demonstraram que falhas no procedimento de ICSI devido à ausência de ativação oocitária estão ligadas à inabilidade do espermatozóide em iniciar as $OsCa^{2+}_i$, provavelmente, pela redução na quantidade ou presença de formas anormais da PLC ζ . Essa deficiência na PLC ζ em humanos mostrou-se associada a pacientes com altas quantidades de espermatozoides com formas anormais (YOON et al., 2008; HEYTENS et al., 2009). A presença de alta porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal é um achado comum em ejaculados de felídeos, com incidência espécie e população específica (WILDT et al., 1983; HOWARD et al., 1990; PUKAZHENTHI et al., 2001). Felídeos apresentando mais que 60% de espermatozoides com formas anormais são classificados como teratospérmicos, enquanto que animais que apresentam menos que 40% de formas anormais são denominados normospérmicos (HOWARD et al., 1990).

Em oócitos de coelhos e camundongos, apesar da dinâmica das clivagens iniciais não ser determinada pela qualidade das $OsCa^{2+}_i$ no período de ativação oocitária, os eventos mais tardios do desenvolvimento embrionário como compactação, formação do blastocisto e taxa de implantação foram influenciados pela qualidade dessas oscilações (OZIL, 1990; OZIL e HUNEAU, 2001) podendo, em alguns casos, levar à parada completa do desenvolvimento embrionário (GORDO et al., 2000).

Em gatos, apesar da porcentagem de clivagem e formação de mórula na ICSI em alguns casos se assemelhar à FIV, a porcentagem de formação de blastocisto é sempre menor no procedimento de ICSI (POPE et al., 1998; GÓMEZ et al., 2000). Entretanto, a proporção de embriões apresentando parada do desenvolvimento com 8 a 16 células foi maior para o procedimento de ICSI comparado à FIV (COMIZZOLI et al., 2006). Esses achados podem estar associados a uma alteração no padrão das $OsCa^{2+}_i$ após o procedimento de ICSI como já relatado para outras espécies de mamíferos (LUDWIG, 2001; MIYAZAKI, 2006).

Com base nesses resultados podemos deduzir que o estudo do fator espermático responsável pela ativação oocitária em gatos é importante para o sucesso de técnicas como a ICSI e transferência nuclear, especialmente pela possibilidade de utilização dos extratos espermáticos contendo o fator de ativação oocitária nesses procedimentos. Adicionalmente, a busca de diferenças na quantidade e função dos extratos espermáticos de animais normospérmicos e teratospérmicos poderia indicar futuras falhas na ativação oocitária e assim determinar previamente a necessidade de utilização da ativação oocitária artificial após o procedimento de ICSI, em especial, nas populações com alta incidência de teratospermia.

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Resposta oocitária à indução da ativação

A ligação do espermatozóide à membrana plasmática do oócito induz a $LiCa^{2+}_i$ nos oócitos durante o processo de fertilização (LAWRENCE et al., 1997). O aumento na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) no oócito é necessário para o desencadeamento dos eventos da ativação oocitária tais como; exocitose dos grânulos corticais (CRAN et al., 1988; DUCIBELLA et al., 2002), reinício do ciclo da meiose pela degradação da ciclina B1 (HYSLOP et al., 2004), formação do pró-núcleo, recrutamento de RNA mensageiro (mRNA) materno e início das divisões mitóticas (SCHULTZ e KOPF, 1995).

Em equinodermos, peixes e anfíbios a $LiCa^{2+}_i$ ocorre em uma única e prolongada onda com duração de 10 minutos (JAFFE, 1983), enquanto que repetidas $OsCa^{2+}_i$ por várias horas são observadas em mamíferos (MIYAZAKI et al., 1993; FISSORE et al., 1992; KLINE e KLINE, 1992). Essas oscilações na $[Ca^{2+}]_i$ são de baixa frequência e variam entre as espécies, ocorrendo a cada dois minutos ou uma hora (FISSORE et al., 1992; KLINE e KLINE, 1992). O intervalo entre as $OsCa^{2+}_i$ aumenta com o tempo e duram por várias horas até a formação do pró-núcleo como no camundongo (KLINE e KLINE, 1992; DEGUCHI et al., 2000) ou persiste durante o primeiro ciclo celular como observado na espécie bovina (FISSORE et al., 1992).

O primeiro aumento na $[Ca^{2+}]_i$ inicia-se no sítio de penetração do espermatozóide e expande-se pelo oócito em forma de onda (MIYAZAKI et al., 1986; DEGUCHI et al., 2000). Contrariamente, as subseqüentes $OsCa^{2+}_i$ surgem na região cortical do hemisfério vegetativo apresentando uma propagação de forma quase uniforme nos oócitos de camundongos (DEGUCHI et al., 2000).

O aumento na $[Ca^{2+}]_i$ nos equinodermos e mamíferos é devido, em grande parte, à liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático (STRICKER, 1999). Em mamíferos, dados sugerem que os receptores do inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) presentes no retículo endoplasmático, sozinhos ou

em conjunto com outro componente, são responsáveis por gerar as $OsCa^{2+}_i$. Miyazaki et al. (1993) e Xu et al. (1994), utilizando injeções de anticorpos contra receptores IP_3 , promoveram a inibição completa das $OsCa^{2+}_i$ em oócitos de hamster e camundongo, respectivamente. Por sua vez, os receptores de rianodina (RyR), localizados no retículo endoplasmático, embora estejam presentes e funcionais nos oócitos de camundongos e bovinos parecem não ser essenciais para a liberação do cálcio no processo de ativação oocitária (AYABE et al., 1995; YU et al., 1995). Adicionalmente, a pré-incubação de oócitos com rianodina ou sua adição a oócitos apresentando oscilações induzidas, indicou que o RyR pode estar envolvido na modulação das $OsCa^{2+}_i$, e não necessariamente em seu início (WU et al., 1997).

Diante do exposto e somando o fato de que inibidores da fosfolipase C (PLC) preveniram as $OsCa^{2+}_i$ induzidas pelo espermatozóide em oócitos de camundongos (DUPONT et al., 1996), a ativação da via do fosfoinositol foi apontada como responsável pela $LiCa^{2+}_i$ durante a ativação oocitária. Nessa via, o lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) é hidrolisado por uma isoforma da PLC resultando na produção do IP_3 e do 1,2-diacilglicerol (DAG) (PARRINGTON et al., 1998). Ambos os produtos da via do fosfoinositol estão envolvidos nas $OsCa^{2+}_i$ durante a ativação oocitária. O IP_3 é responsável pela liberação do cálcio após ligação ao seu receptor do tipo 1 (IP_3R-1) localizado no retículo endoplasmático do oócito (MIYAZAKI et al., 1993). Por sua vez, a produção de DAG, tanto direta quanto indiretamente via ativação da proteína quinase C, pode estar envolvida na regulação do influxo de cálcio (HALET et al., 2004).

O mecanismo que regula as oscilações da $[Ca^{2+}]_i$ durante a ativação oocitária ainda não está claro. Porém, o modelo conhecido como “liberação de cálcio induzido pelo IP_3 ”, utilizado por muitos hormônios e neurotransmissores para alterar a função celular, pode estar envolvido na ocorrência das oscilações repetidas do cálcio intracelular no oócito. Esse modelo determina que a sensibilidade dos IP_3R-1 ao IP_3 é regulada pelo nível de cálcio livre no citoplasma, desta forma, levando à abertura ou fechamento dos canais de cálcio (SCHUSTER et al., 2002).

A retomada da divisão meiótica é um evento induzido pelo aumento na $[Ca^{2+}]_i$ e essencial no processo de fertilização. Oócitos de vertebrados permanecem quiescentes em metáfase II devido à atividade do fator promotor da maturação (MPF; complexo ciclina B1/Cdk1), a qual é mantida pela ação do fator citostático (CSF). Os oócitos são liberados da quiescência pela fertilização, na qual é promovida a degradação da ciclina B1 pela inibição do CSF e, desta forma, resultando em queda da atividade do MPF (HYSLOP et al., 2004). Em adição, induzida pelo número de picos de cálcio, a atividade da proteína quinase ativadora da mitose (MAPK), importante na regulação da meiose, diminui após a queda da ação do MPF, permitindo assim a formação do pró-núcleo (DUCIBELLA et al., 2002).

É importante ressaltar que alterações na frequência e duração das $OsCa^{2+}$ durante a ativação do oócito podem induzir padrões anormais de ativação oocitária e parada no desenvolvimento embrionário em oócitos de camundongo (GORDO et al., 2000) e também efeito sobre os eventos mais tardios do desenvolvimento embrionário em coelhos, como compactação, formação do blastocisto e implantação (OZIL e HUNEAU, 2001). As alterações observadas no desenvolvimento embrionário dessas espécies podem estar relacionadas a um possível impacto negativo sobre o recrutamento dos RNAs maternos, o qual é estimulado pelas oscilações de cálcio e importante para o desenvolvimento embrionário inicial (DUCIBELLA et al., 2002; OZIL et al., 2005).

2. Hipóteses do mecanismo espermático para a ativação oocitária

Apesar de conhecida a significância das $OsCa^{2+}_i$ para a ativação oocitária e desenvolvimento embrionário, o(s) mecanismo(s) de sinalização utilizado(s) pelo espermatozóide para iniciar e perpetuar essas oscilações ainda não foi(ram) completamente estabelecido(s). As hipóteses para este(s) mecanismo(s) que apresentaram ou apresentam atualmente maior relevância são; 1) a hipótese da “bomba de cálcio” ou modelo do conduto espermático, 2) a hipótese do receptor espermático ou do ligante/receptor e 3) a hipótese do fator espermático ou da fusão.

2.1. Hipótese da “bomba de cálcio” ou da “condução”

Em 1983, Jaffe propôs que em oócitos de animais classificados como protostômios o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ durante a fertilização é devido ao influxo do cálcio extracelular promovido pelo espermatozóide. Essa hipótese foi denominada de “bomba de cálcio”. Nesse modelo, o espermatozóide com o acrossomo reagido liga-se à membrana plasmática do oócito e age como um canal, bombeando um fluxo constante de cálcio do meio extracelular para o interior do oócito que, por sua vez, armazena o cálcio no retículo endoplasmático, o qual se sobrecarrega para dar início à onda de cálcio na fertilização. Esse modelo foi baseado na observação de que nos animais protostômios a exocitose dos grânulos corticais ocorre de forma bem lenta e com um padrão diferente de uma onda. A aferição direta e/ou imagem das elevações nas $[Ca^{2+}]_i$ nos protostômios revelaram que essa hipótese é verdadeira apenas para o primeiro aumento no cálcio intracelular, uma vez que as oscilações subseqüentes ocorrem em forma de onda devido à liberação intracelular do cálcio (STRICKER, 1999).

Em mamíferos, existem evidências que se contrapõem a esse modelo. Jones et al. (1998a) observaram que próximo ao sítio de fusão entre os gametas não ocorre aumento nas concentrações do cálcio extracelular. Em adição, a injeção de cálcio no interior dos oócitos por si não é suficiente para induzir as $OsCa^{2+}_i$ (SWANN e OZIL, 1994). Por sua vez, estudos que utilizam a privação do cálcio extracelular para avaliar sua importância na ativação oocitária são contraditórios. Em camundongos, Lawrence et al. (1997), realizando estudos com privação do cálcio extracelular, observaram um efeito inibitório na fusão entre os gametas e nas $OsCa^{2+}_i$, entretanto o mesmo efeito não foi observado por Jones et al. (1998a). Ao avaliar esses resultados, é importante ressaltar que o cálcio extracelular pode ser necessário não apenas para preencher os estoques no retículo endoplasmático para a ativação do oócito, mas também para a regulação de moléculas envolvidas na adesão e/ou fusão dos gametas ou mesmo na origem de uma via de transdução o que poderia acarretar em dificuldade na interpretação dos resultados provenientes desses estudos baseados na privação do cálcio (CIAPA e CHIRI, 2000).

2.2. Hipótese do ligante/receptor

Essa hipótese é baseada na especulação de que, no momento da ligação oócito/espermatozóide durante a fertilização, um receptor na membrana plasmática do oócito é ativado dando início a um sinal descendente que desencadeia as $OsCa^{2+}_i$ (KLINE et al., 1988). O receptor ativo da membrana pode estar acoplado a uma proteína G (GPCR) ou pode ser do tipo tirosinoquinase (RTK), resultando em ambos os casos na ativação de uma isoforma da PLC.

As integrinas, receptores localizados na membrana plasmática do oócito, foram apontadas como possíveis receptores para a sinalização na ativação oocitária, uma vez que a aplicação de peptídeos sintéticos, os quais são reconhecidos por este receptor, foram capazes de desencadear aumentos nas $[Ca^{2+}]_i$ em oócitos bovinos (CAMPBELL et al., 2000). Contudo, uma relação direta entre as $OsCa^{2+}_i$ induzidas por esses receptores e as desencadeadas pela ativação oocitária fisiológica ainda precisa ser investigada.

Em adição, a fertilina β , uma proteína de superfície encontrada na membrana plasmática do espermatozóide, apesar de necessária para a fusão entre os gametas, não mostrou interferir com as $OsCa^{2+}_i$ normais e ativação do oócito quando ausentes em camundongos (CHO et al., 1998). Desta forma, embora alguns estudos tenham buscado definir quais receptores oocitários e ligantes espermáticos são capazes de mediar as $OsCa^{2+}_i$ na ativação oocitária, até o momento eles ainda não foram identificados.

Oócitos de camundongos expressam, ao menos o mRNA, duas isoformas da PLC β , denominadas de $\beta 1$ e $\beta 3$ (DUPONT et al., 1996). As isoformas da PLC β são ativadas pelas subunidades α da subfamília Gq heterotrimérica ligadora da guanosina trifosfato (GTP) ou pelo heterodímero $\beta\gamma$ após a estimulação dos GPCR presentes na superfície dos oócitos (RHEE, 2001).

O papel da proteína G na ativação oocitária durante a fertilização foi estudado em mamíferos após a observação de que injeções de GTP- γ -S, um análogo do GTP resistente à hidrólise que ativa a proteína G, desencadearam $OsCa^{2+}_i$ e ativação partenogenética em oócitos de hamster (MIYAZAKI, 1988),

coelho (FISSORE e ROBL, 1994) e suíno (MACHÁTY et al., 1995). Adicionalmente, foi demonstrado que injeções de GDP- β -S, um análogo não hidrolisável da guanosina difosfato (GDP) que inibe a proteína G, bloqueou as $OsCa^{2+}_i$ em oócitos de hamster e coelho (MIYAZAKI, 1988; FISSORE e ROBL, 1994). Apesar desses resultados sugerirem o envolvimento da ativação da PLC β mediada pelos GPCR, dois fatos devem ser considerados; 1) as $OsCa^{2+}_i$ estimuladas pelo GTP- γ -S apresentaram uma forma não vista na fertilização (RUNFT et al., 2002) e 2) altas concentrações de GDP- β -S pode levar a uma ação inibitória não específica (CROSSLEY et al., 1991).

A sobre-expressão dos receptores muscarínicos M1, um GPCR, por meio de mRNA em oócitos de camundongo e suíno estimulados com acetilcolina foi capaz de desencadear as $OsCa^{2+}_i$ e ativação oocitária (MOORE et al., 1993; MACHÁTY et al., 1997), sugerindo que a ativação dos GPCR é um sinal ascendente da liberação do cálcio. Entretanto, Williams et al. (1998), utilizando anticorpos bloqueadores da função da proteína G, inibiram as $OsCa^{2+}_i$ iniciadas pela estimulação dos receptores muscarínicos M1, mas não evitaram as $OsCa^{2+}_i$ desencadeadas pelo espermatozóide. Em adição, fertilidade aparentemente normal foi relatada na maioria das linhagens de camundongos com ausência de uma isoforma da PLC β (CHOI et al., 2001).

Outra provável via de sinalização da interação entre os gametas é a mediada pelas proteínas tirosinoquinases (PTK) e ativação do PLC γ . Em equinodermos, estudos sobre a sinalização na fertilização concluíram que a ativação do PLC γ via proteínas tirosinoquinase da família Src (SFKs) está envolvida na ativação oocitária, uma vez que as $OsCa^{2+}_i$ induzidas pelo espermatozóide foram prevenidas pela pré-injeção de domínios SH2 das SFKs ou PLC γ (ABASSI et al., 2000; RUNFT et al., 2004).

Baseados em estudos realizados com camundongos, nos quais foram detectadas as isoformas PLC γ 1 e PLC γ 2 (DUPONT et al., 1996; MEHLMANN et al., 1998) e induzidas as $OsCa^{2+}_i$ pela expressão e estimulação de RTF nos oócitos desta espécie (RUNFT et al., 2002), foi sugerido o envolvimento das PTKs na ativação oocitária de mamíferos. Contudo, existem várias evidências contra essa hipótese. O uso de domínios SH2 da PLC γ 1 e PLC γ 2 mesmo em quantidades 100 a 400 vezes maiores que a PLC γ endógena (MEHLMANN et

al., 1998) e a microinjeção de PLC γ 1 recombinante em doses 500 a 900 vezes superior a atividade PLC presente em um único espermatozóide (MEHLMANN et al., 2001) não causaram perturbações nas $OsCa^{2+}_i$ durante a fertilização de oócitos de camundongo. Em adição, a microinjeção de uma proteína c-Src recombinante e a pré-incubação dos gametas com inibidores da SFK não interferiram nas $OsCa^{2+}_i$ durante a fertilização em camundongos (KUROKAWA et al., 2004).

Nos mamíferos, o argumento de maior importância que se contrapõe à hipótese do ligante/receptor em desencadear as $OsCa^{2+}_i$ na ativação oocitária está no fato de que oócitos fertilizados utilizando a técnica de ICSI, na qual não ocorre a interação entre as membranas plasmáticas dos gametas, apresentaram oscilações na $[Ca^{2+}]_i$ e desenvolvimento dos embriões a termo (KIMURA e YANAGIMACHI, 1995).

2.3. Hipótese do fator espermático

Nessa hipótese o espermatozóide conteria um ou vários fatores de ativação oocitária que se difundiriam para o interior do oócito após a fusão das membranas plasmáticas dos gametas. Essa tese foi proposta inicialmente por Dale et al. em 1985, após observarem que microinjeções de extratos do citosol espermático (SE) de ouriço-do-mar foram capazes de causar exocitose dos grânulos corticais de oócitos da mesma espécie. Cinco anos depois, Swann (1990) demonstrou que um fator protéico contido no SE de suíno e hamster causou $OsCa^{2+}_i$ similares àquelas visualizadas durante a fertilização normal.

Com base nesses achados, experimentos utilizando injeções de SE vêm acumulando-se em mamíferos, e a hipótese do fator espermático foi reforçada pelos seguintes achados; (1) $OsCa^{2+}_i$ são induzidas em oócitos após a ICSI, mesmo na ausência de ligação entre as membranas plasmáticas dos gametas (KIMURA e YANAGIMACHI, 1995); (2) $OsCa^{2+}_i$ em oócitos de camundongo iniciam-se poucos minutos após a fusão entre os gametas (LAWRENCE et al., 1997) e (3) $OsCa^{2+}_i$ são prevenidas em oócitos de camundongos *knockout* para o receptor CD9, no qual ocorre apenas ligação, mas não há fusão entre os gametas (KAJI et al., 2000).

A habilidade de LiCa^+_i , presente no SE, foi abolida após tratamento com calor ou protease, indicando que a substância ativa é uma proteína (SWANN, 1990; WU et al., 1997). Em adição, baseado na observação de que os SE de mamíferos foram capazes de induzir LiCa^+_i não apenas em oócitos da mesma classe, mas também de ouriço-do-mar (JONES, 1998) foi determinado que esta proteína não é espécie-específica. O achado de que anticorpos contra a função IP_3 foram capazes de bloquear a LiCa^+_i induzida pelos SE em camundongos (ODA et al., 1999), corroborou com a hipótese de este utiliza a mesma via usada pela fertilização fisiológica.

Estudos têm sido focados na identificação da proteína indutora de OsCa^{2+}_i dos mamíferos. A *oscillin* foi a primeira candidata proposta, uma vez que frações purificadas de SE de hamster que continham esta proteína de 33 kDa, homóloga à enzima bacteriana glucosamina-6-fosfato desaminase, apresentaram atividade de LiCa^+_i (PARRINGTON et al., 1996). Contudo, foi proposto que a *oscillin* liga-se a um componente do oócito e forma um complexo capaz de ativar os receptores do retículo endoplasmático por um mecanismo que não envolve o IP_3 (GALIONE et al., 1997). Em adição, a *oscillin* recombinante, embora enzimaticamente ativa, não causou LiCa^+_i em oócitos de camundongo (SHEVCHENKO et al., 1998). Utilizando a técnica de cromatografia, foi observado que frações de SE ricas em *oscillin* não apresentaram atividade de LiCa^+_i , enquanto que frações que não continham a *oscillin* desencadearam a LiCa^+_i (WU et al., 1998).

A forma truncada e intracelular do RTK *c-kit* (tr-kit), que se acumula durante a fase tardia da espermatogênese em espermatozóides de camundongos, foi sugerida como possível candidata à proteína indutora de OsCa^{2+}_i após a observação de que a tr-kit recombinante causou eventos da ativação oocitária em oócitos de camundongo (SETTE et al., 1997). A co-injeção com domínios SH3 da PLC γ 1, reduziu a habilidade da tr-kit em ativar a LiCa^+_i . Assim, é provável que a tr-kit ative a PLC γ 1 através do domínio SH3. Contudo, é importante destacar que a injeção de domínios SH3 da PLC γ 1, mesmo em altas concentrações, não é capaz de inibir a LiCa^+_i na fertilização de camundongos (MEHLMANN et al., 1998), indicando que a tr-kit realiza a LiCa^+_i por uma via diferente. Em adição, a tr-kit não foi detectada pela técnica

de *Western blotting* nas frações de SE com atividade de LiCa^+_i (WU et al., 1998).

Outra candidata à proteína indutora de OsCa^{2+}_i é a óxido nítrico sintetase, uma vez que esta é capaz de desencadear a LiCa^+_i pela produção de óxido nítrico no interior do oócito. Em ouriço-do-mar, foi relatado que essa proteína tem um papel importante na fertilização (KUO et al., 2000). Contudo, apesar do óxido nítrico ser provavelmente capaz de promover LiCa^+_i pela estimulação de quinases semelhantes às SFKs e, subsequente, ativação da PLC γ , Hyslop et al. (2001) demonstraram que em camundongos as OsCa^{2+}_i na fertilização ocorrem independentemente de alterações nas concentrações intracelular de óxido nítrico.

Embora os relatos iniciais tenham descrito o fator espermático como um componente solúvel do citosol, relatos posteriores sugerem que este está localizado na matriz perinuclear. Espermatozóides tratados com o detergente Triton X-100 e desprovidos de membrana plasmática, vesículas acrossomais e conteúdo citoplasmático foram utilizados com sucesso na ICSI (KURETAKE et al., 1996), porém após tratamento conjunto com tripsina ou SDS (dodecil sulfato de sódio), que removem também a matriz perinuclear, não ocorreu a ativação oocitária (KIMURA et al., 1998). Em 2000, Perry et al. relataram a presença de pelo menos dois componentes da matriz perinuclear com atividade de LiCa^+_i nomeados SOAF (*Sperm-borne oocyte-activating factor*), que podem ser divididos em um componente sensível e outro estável ao calor. Deve-se frisar que, apenas quando co-injetados, esses componentes induzem OsCa^{2+}_i semelhantes às encontradas na fertilização.

Apesar de natureza ainda desconhecida, a SOAF pode fazer parte das proteínas que compõem a matriz perinuclear. Recentemente, uma proteína da matriz perinuclear, conhecida como PT32, foi clonada e apontada como uma candidata viável à SOAF (WU et al., 2001). Evidências que sustentam esse papel incluem: sua localização na região pós-acrossomal da cabeça do espermatozóide; primeira região da matriz perinuclear a ser exposta ao citoplasma do oócito (SUTOVSKY et al., 1997) e o fato de que a PT32 recombinante foi capaz de induzir ativação oocitária em oócitos de suínos quando injetada em quantidade próxima à estimada em um único

espermatozóide (SUTOVSKY et al., 2001). Entretanto, para definir a PT32 como ativador fisiológico ainda é necessário investigar se a proteína recombinante induz $OsCa^{2+}_i$ quando micro-injetada em oócitos e se a inibição da sua função previne a ativação oocitária induzida pelo espermatozóide.

A partir da observação de que uma atividade PLC presente nos SE induziu $OsCa^{2+}$ em extratos homogenizados de oócitos de ouriço-do-mar gerando IP_3 (JONES et al., 1998b), foi sugerido que a proteína indutora de $OsCa^{2+}_i$ seria uma isoforma da PLC. Desta forma, foi averiguada uma possível candidata entre as PLC previamente identificadas em espermatozóides; $PLC\beta_1$ (FUKAMI et al., 2001), $PLC\gamma_1$ (DUPONT et al., 1996; MEHLMANN et al., 1998), $PLC\gamma_2$ (MEHLMANN et al., 1998), $PLC\delta_1$ (LEE et al., 1999) e $PLC\delta_4$ (FUKAMI et al., 2001). Entretanto, as isoformas recombinantes $PLC\beta_1$, γ_1 , γ_2 e δ_1 falharam em desencadear a $LiCa^+_i$ (JONES et al., 2000) ou a induziram apenas quando presente em altas concentrações no oócito (MEHLMANN et al., 2001). Em adição, espermatozóides de camundongos com deficiência na isoforma $PLC\delta_4$ falharam na fertilização, mas não na indução das $OsCa^{2+}_i$ (FUKAMI et al., 2001).

Diante do exposto, foi proposta a existência de uma nova isoforma da PLC. Neste contexto, o exame de uma seqüência EST (*expressed sequence tag*) derivada de testículos de camundongo e humano possibilitou o isolamento e caracterização de um DNA complementar, o qual transcreve uma proteína espermática nomeada de $PLC\zeta$ (SAUNDERS et al., 2002). Esta isoforma da PLC é única no que diz respeito ao fato dela ser uma proteína específica do espermatozóide.

Estudos posteriores sobre as características estruturais e funcionais da $PLC\zeta$ fizeram dessa nova proteína a melhor candidata a proteína indutora de $OsCa^{2+}_i$. Dentre esses achados podemos destacar que a injeção de RNA complementar codificando toda a $PLC\zeta$ induziu uma série de $OsCa^{2+}_i$ prolongadas em oócitos de camundongo com amplitude e freqüência dose-dependentes e conseqüente ativação oocitária (SAUNDERS et al., 2002). Da mesma forma, a injeção da proteína $PLC\zeta$ recombinante também demonstrou gerar $OsCa^{2+}_i$ em camundongos (KOUCHI et al., 2004). Em adição, a imunoprecipitação da $PLC\zeta$ com anticorpos levaram a perda da habilidade do

SE em causar as $OsCa^{2+}_i$ em oócitos de camundongo e $LiCa^+_i$ em homogenizados de oócitos de ouriço-do-mar (SAUNDERS et al., 2002). Outro achado importante é o fato de que a quantidade estimada de PLC ζ , determinada por anticorpos, presente em um único espermatozóide de camundongo (SAUNDERS et al., 2002) está dentro do limite da concentração de PLC ζ capaz de desencadear as $OsCa^{2+}_i$ no oócito (YODA et al., 2004).

Até o momento, existe apenas uma evidência de que a PLC ζ desempenha um papel crítico no processo de fertilização, uma vez que espermatozóides de camundongos transgênicos, apresentando metade da quantidade normal de PLC ζ , causaram o término prematuro das $OsCa^{2+}_i$ e redução do tamanho da ninhada quando comparados aos animais controle (KNOTT et al., 2005).

A proteína PLC ζ apresenta por volta de 70 kDa, o que a torna a menor isoforma de PLC conhecida nos vertebrados, e está na faixa de tamanho previamente estimada para a proteína indutora de $OsCa^{2+}_i$ (WU et al., 1998). A PLC ζ já foi encontrada em SE solúveis de camundongo, humano e suíno (SAUNDERS et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2004; KUROKAWA et al., 2005) e no momento há evidências do gene da PLC ζ em oito diferentes espécies de mamíferos (SWANN et al., 2006). Utilizando imunolocalização em espermatozóides, a PLC ζ foi encontrada na região pós-acrossomal em camundongos e distribuída na região equatorial em bovino, local que também apresenta rápido acesso ao citoplasma do oócito no momento da fertilização (YOON e FISSORE, 2007).

Em camundongo, foi identificada na PLC ζ uma seqüência nomeada de sinal de localização nuclear, que possibilita o seqüestro nuclear dessa PLC ao pró-núcleo recém formado, garantindo que as $OsCa^{2+}_i$ cessem e voltem a oscilar apenas após a quebra do pró-núcleo (LARMAN et al., 2004). Entretanto, a PLC ζ de rato e humano apresentou deficiência nessa translocação nuclear em oócito de camundongo (ITO et al., 2008).

Não menos importante, a habilidade da PLC ζ em desencadear as $OsCa^{2+}_i$ e ativação oocitária não se mostrou espécie-específica (COX et al., 2002). Contudo, estudos atuais têm-se focado em entender o porquê da existência de diferenças na quantidade, solubilidade (KUROKAWA et al., 2005)

e potência relativa da PLC ζ entre os espermatozoides das diferentes espécies (ROGERS et al., 2004; COX et al., 2002). A partir desses achados, é possível deduzir que a quantidade e qualidade espécie-específica da PLC ζ possam ser adaptações espermáticas visando combinar o seu tamanho celular à sensibilidade do oócito da mesma espécie e, assim, culminar em uma série de $OsCa^{2+}_i$ por várias horas e indução da ativação oocitária.

É importante destacar que estudos com o fracionamento da matriz perinuclear mostraram que as frações correlacionadas com a habilidade de ativar os oócitos de camundongo continham a PLC ζ (FUJIMOTO et al., 2004). Esse achado sugere que o fator espermático solúvel e o não solúvel, chamado de SOAF, são na verdade a mesma proteína. Desta forma, a PLC ζ pode estar distribuída em ambas as frações espermáticas; solúvel, citosol espermático, e não solúvel, matriz perinuclear (KUROKAWA et al., 2005).

Objetivos

OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi localizar a proteína fosfolipase C isoforma zeta em extratos do citosol e matriz perinuclear dos espermatozoides de gatos domésticos e comparar a quantidade expressa desta proteína em animais normospermicos e teratospérmicos.

Este estudo também teve como objetivo:

- A padronização dos métodos de extração das proteínas espermáticas do citosol (proteínas solúveis) e matriz perinuclear (proteínas não solúveis) dos espermatozoides de gatos domésticos.
- A comparação do perfil protéico dos extratos espermáticos de diferentes regiões dos espermatozoides de gatos domésticos classificados previamente como normospermicos e teratospérmicos.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (DRARV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu.

Algumas etapas do processo de extração das proteínas espermáticas foram realizadas no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP, Campus de Botucatu.

O processamento e análise das amostras destinadas à avaliação ultraestrutural foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP, Campus de Botucatu.

2. Animais

Todos os animais do experimento, machos e fêmeas, foram mantidos no gatil do laboratório REPAS em grupos de dois e três animais em cada sala (3,5 x 4,75 m) e acesso irrestrito à área externa com exposição à luz natural. Os animais foram expostos a mais de 12 horas de luz natural por dia e alimentados com ração seca (FIT 32, Royal Canin) e água *ad libitum*.

Foram utilizados seis gatos machos adultos para colheita de sêmen, com idade variando de 4 a 7 anos. Gatas adultas e um manequim inanimado foram usados para a colheita dos machos.

Para avaliação da qualidade espermática, foram realizadas três colheitas de sêmen em dias consecutivos para cada gato. As amostras foram avaliadas para motilidade espermática com CASA (análise computadorizada do movimento espermático) utilizando o sistema HTR-IVOS-12 (Hamilton Thorn Research – Animal Version 12,0 L) (VILLAYERDE et al., 2009), integridade de

membrana plasmática com o uso das sondas fluorescentes Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA) e Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (C-0662, SIGMA) (VILLAVERDE et al., 2009) e morfologia espermática em esfregaços corados com Fast Green/ Rosa Bengala (POPE et al., 1991). Os resultados obtidos após avaliação seminal estão presentes na Tabela 1.

TABELA 1. Valores médios \pm desvio padrão para volume ejaculado (μL), quantidade total de espermatozoides ejaculado ($\times 10^6$), motilidade total (%), motilidade progressiva (%), integridade de membrana plasmática (%) e porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas (%) de três colheitas de sêmen em dias consecutivos para seis gatos.

Animal	Volume (μL)	Total spz $\times 10^6$	M T (%)	M P (%)	IMP (%)	Defeitos espermáticos		
						Maiores (%)	Menores (%)	Totais (%)
1	27,3 \pm 5,0	48,0 \pm 11,3	95,7 \pm 0,6	67,7 \pm 6,9	78,3 \pm 9,5	24,1 \pm 10,0	6,6 \pm 4,3	30,7 \pm 12,8
2	33,3 \pm 10,4	28,8 \pm 12,3	91,0 \pm 5,2	63,3 \pm 2,1	74,7 \pm 4,2	24,8 \pm 7,1	8,4 \pm 4,4	33,2 \pm 6,0
3	20,7 \pm 1,2	27,4 \pm 5,8	92,0 \pm 1,0	64,7 \pm 3,8	77,7 \pm 4,5	25,6 \pm 9,2	4,3 \pm 1,9	29,9 \pm 8,2
4	26,3 \pm 5,7	31,5 \pm 17	91,3 \pm 0,6	67,0 \pm 5,3	81,3 \pm 5,0	33,3 \pm 9,0	9,0 \pm 2,1	42,3 \pm 8,3
5	38,0 \pm 17,6	35,2 \pm 6,8	63,0 \pm 13,1	35,7 \pm 13,1	77,3 \pm 8,3	80,6 \pm 7,9	7,2 \pm 3,2	87,8 \pm 6,8
6	26,0 \pm 10,1	24,0 \pm 8,4	92,3 \pm 0,6	63,3 \pm 4,9	73,3 \pm 4,5	60,8 \pm 5,1	6,5 \pm 4,6	67,3 \pm 5,5

Volume ejaculado (volume), quantidade total de espermatozoides ejaculados (Total spz), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana plasmática (IMP).

Com base na porcentagem de espermatozoides com defeito de morfologia, os animais 1, 2 e 3 foram classificados como normospermicos (menos de 40% de espermatozoides com morfologia anormal) e os animais 5 e

6 como teratospérmicos (mais de 60% de espermatozóides com morfologia anormal). O gato número 4 foi considerado como animal de sêmen de qualidade morfológica intermediária, uma vez que apresentou porcentagem de defeitos morfológicos no intervalo entre os valores limites utilizado como referência para a classificação dos animais.

3. Colheita e armazenamento do sêmen

As amostras de sêmen dos gatos foram colhidas utilizando vagina artificial (Figuras 1 e 2), as quais foram mantidas a 38°C até o momento da colheita. Cada gato foi colhido duas vezes consecutivas, com intervalos de 5 a 10 minutos, utilizando tubos diferentes para cada ejaculado. As colheitas foram realizadas respeitando um intervalo de no mínimo dois dias para cada gato.



FIGURA 1. Modelo de vagina artificial usada para colheita de sêmen.

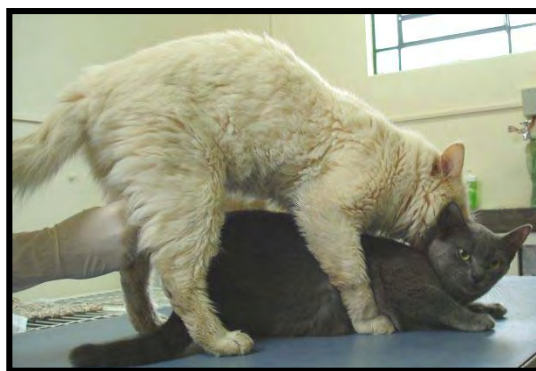


FIGURA 2. Colheita de sêmen em gatos domésticos.

Após colheita, as amostras de sêmen do mesmo gato foram unidas e diluídas em meio tampão *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Nutricell) e uma alíquota foi retirada para a determinação da quantidade total de espermatozóide. A amostra foi centrifugada a 800 x g por 10 minutos a 4°C

e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em DPBS e a amostra centrifugada novamente a 800 x g durante 10 minutos a 4°C. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em meio denominado *intracellular-like medium* (ICM) (Quadro 1) e a amostra congelada por imersão direta em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C.

QUADRO 1. Composição do meio ICM (*intracellular-like medium*).

Componente	Código do produto	Quantidade
KCl	P9541	75 Mm
HEPES	H4034	20 mM
EDTA	E5134	1 mM
β-Glicerofosfato	G6251	10 mM
DTT	D9779	1 mM
PMSF	P7626	200 μM
Pepstatina A	P5318	10 μg/ mL
Leupeptina	L9783	10 μg/ mL

Ajuste do pH para 7,0 com o uso de 1 M NaOH (S8045, SIGMA).

Todos os produtos acima citados são pertencentes à marca SIGMA.

4. Extração das proteínas espermáticas do citosol – proteínas solúveis

O protocolo para recuperação do extrato espermático solúvel (SE^c) foi adaptado para gatos domésticos a partir dos trabalhos de Wu et al. (1998, 2001) que utilizaram sêmen suíno. Esse protocolo também foi utilizado com sucesso em sêmen de eqüinos (BEDFORT et al., 2003) e camundongos (KUROKAWA et al., 2005).

Amostras de sêmen do mesmo gato armazenadas a -80°C foram descongeladas em gelo e unidas em um tubo tipo Falcon[®] de 15 mL. Todas as

etapas a seguir foram realizadas a temperatura de 4°C. As membranas espermáticas foram rompidas com a utilização de um sonicador digital (S-250D®, Branson) em um protocolo consistindo de 10 pulsos com 60% de potência e duração de 5 segundos cada e 1 minuto de descanso entre os pulsos (Figura 3). O sucesso do protocolo de sonicação foi acompanhado pela avaliação das células espermáticas em microscopia de contraste de fase (1000 x). A visualização de células espermáticas decapitadas (Figura 4) é um indicativo da ruptura das membranas plasmática e acrossomal externa. Desta forma, resultados acima de 95% de espermatozoides decapitados, em 200 células avaliadas, determinaram o sucesso do protocolo de sonicação empregado. Em média, o protocolo de sonicação acima citado resultou em 96% de células espermáticas decapitadas para o sêmen de gato doméstico.



FIGURA 3. Amostras de sêmen de gato no sonicador.

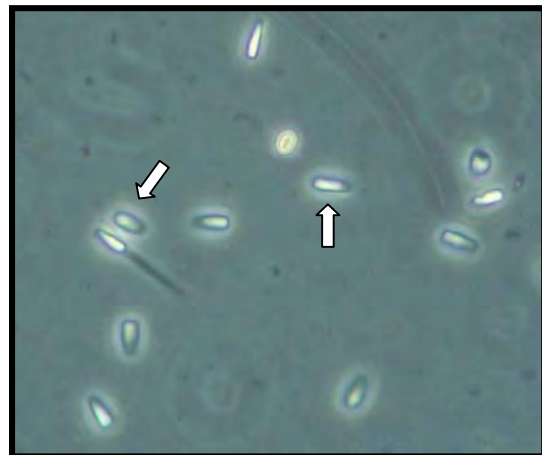


FIGURA 4. Sêmen de gato após processo de sonicação. Setas indicam espermatozoides decapitados. Aumento de 1000x.

Alíquotas de sêmen após a descongelação e protocolo de sonicação foram fixadas em glutaraldeído 2,5% para posterior avaliação da ultraestrutura espermática com o uso de microscopia eletrônica de transmissão para determinação da ruptura total das membranas espermáticas e, conseqüentemente, liberação do citosol.

Após sonicação, a amostra foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante recuperado e re-centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. O *pellet* contendo as células espermáticas foi ressuscitado em 3,5 mL de meio ICM, congelado por imersão em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior extração das proteínas da matriz perinuclear. A porção do sobrenadante foi centrifugada a 100.000 x g durante uma hora em ultracentrífuga (Ultra Pro 80[®], Sorvall) utilizando tubos especiais com capacidade para 5 mL (Ultra-Clear[®], Beckman Coulter). O sobrenadante foi lavado em tampão de injeção (75 mM KCl e 20 mM HEPES, pH=7,0) e concentrado utilizando membrana de ultrafiltração (Amicon Ultra-4[®] 30 ou Amicon Ultra-15[®] 30, Millipore Co.) com peso molecular corte de 30 kDa (Figura 5).

Na seqüência, a amostra foi purificada por precipitação em sulfato de amônio (A4418, SIGMA). Para isso, uma solução de sulfato de amônio saturada a 100% foi acrescentada à amostra por gotejamento e agitação constante em gelo até saturação final de 50%. Posteriormente, a amostra foi agitada em gelo por um período de 30 minutos, centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos e o *pellet* armazenado a -20°C (Figura 6).



FIGURA 5. Sobrenadante lavado e concentrado em membrana de ultrafiltração Amicon Ultra-4.

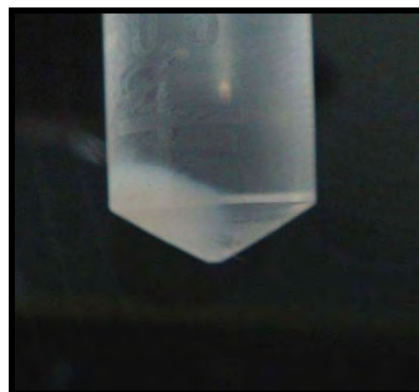


FIGURA 6. *Pellet* composto de sulfato de amônio ligado às proteínas espermáticas e formado após centrifugação da amostra.

O *pellet* formado por proteína e sulfato de amônio foi descongelado em gelo e dissolvido em tampão de injeção. A amostra foi lavada duas vezes em membrana de ultrafiltração (Amicon Ultra-4[®] 10, Millipore Co.) com peso molecular corte de 10 kDa e utilizando tampão de injeção. O volume da amostra foi mensurado e uma alíquota separada e diluída para determinação da quantidade de proteína total pelo método de BCA (ácido bicinconínico) (BCA Protein Assay Kit, Pierce) usando espectrofotômetro (Ultrospec 200[®], Pharmacia Biotech). As amostras foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C.

5. Extração das proteínas espermáticas da matriz perinuclear – proteínas não solúveis

O protocolo utilizado para a extração das proteínas da matriz perinuclear (SE^{MP}) foi adaptado do trabalho de Kurokawa et al. (2005), o qual se mostrou mais eficaz em recuperar o fator espermático responsável pela ativação oocitária em sêmen suíno. Esse protocolo baseia-se na extração das proteínas da matriz perinuclear por exposição dos espermatozoides a uma solução com alto pH.

Devido à pequena quantidade de proteína que pode ser extraída da matriz perinuclear do espermatozoide do gato, a extração das proteínas não solúveis foi realizada na forma de *pool* para os animais normospérmicos (gatos 1, 2 e 3) e teratospérmicos (gatos 5 e 6).

As amostras de espermatozoides após extração das proteínas do citosol foram descongeladas em gelo, unidas em *pool* para animais normospérmicos ou teratospérmicos e lavadas duas vezes em meio ICM e centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C. Todas as etapas a seguir foram realizadas a temperatura de 4°C.

Após lavagem da amostra, os espermatozoides foram ressuspensos em um tampão de lavagem contendo alta concentração de sal [1 M KCl (P9541, SIGMA), 10 mM Tris (15,456-3, SIGMA), 0,2 mM PMSF (P7626, SIGMA), pH 7,4]. A amostra foi incubada em gelo por 30 minutos com agitação

constante e, posteriormente, lavada em meio ICM e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos.


As cabeças dos espermatozóides foram ressuspensas e incubadas por 10 minutos em gelo e agitação constante em solução alcalina de carbonato de sódio [100 mM Na₂CO₃ (22,353-0, SIGMA), pH 11,5]. A amostra foi neutralizada até pH final de 7,4 utilizando meio tampão a base de Tris (0,5 M, pH 3,0) acrescida de 12 mM de DTT. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e inibidores da protease (200 µM PMSF, 2 µg/ mL pepstatina, 2 µg/ mL leupeptina) foram adicionados. A solução foi re-centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e submetida à ultracentrifugação por uma hora a 4°C utilizando velocidade de 110.000 x g.

Uma amostra do *pellet* contendo as cabeças dos espermatozóides foi fixada em glutaraldeído 2,5% para análise da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão para determinação da dissolução da matriz perinuclear.

As etapas seguintes são semelhantes às descritas para a extração das proteínas espermáticas do citosol. O sobrenadante foi lavado em tampão de injeção, concentrado em membrana de ultrafiltração (Amicon Ultra-4[®] 30, Millipore Co.) e as proteínas precipitadas em sulfato de amônio 50%. O *pellet* foi armazenado a -20°C, descongelado, lavado em tampão de injeção e re-concentrado em membrana de ultrafiltração (Amicon Ultra-4[®] 10, Millipore Co.). Uma alíquota foi separada e diluída para dosagem de proteína total pelo método de BCA e a amostra foi alíquotada e armazenada a -80°C.

6. Microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural das cabeças dos espermatozóides foi realizada após os procedimentos de colheita de sêmen, descongelamento, ruptura das membranas espermáticas utilizando sonicador e incubação em solução de carbonato de sódio para extração da matriz perinuclear. Todas as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% e tampão fosfato 0,1 M (pH=7,4) e mantidas a 5°C até o momento do processamento.

 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

- ♦ Lavagem em tampão fosfatado 0,1 M, pH 7,3 (3 vezes por 15 minutos).
- ♦ Pós-fixação por 2 horas em tetróxido de ósmio 15 no mesmo tampão.
- ♦ Lavagem em água destilada (3 lavagens de 5 minutos).
- ♦ Incubação por 2 horas em acetato de uralina 0,5% em solução aquosa.
- ♦ Desidratação em seqüência crescente de soluções de 50, 70, 90 e 100% de acetona.
- ♦ Embebição em resina (Araldite[®]) e acetona 100% por 12 horas.
- ♦ Embebição em resina na estufa a 37°C por uma hora.
- ♦ Inclusão em resina e polimerização em estufa a 60°C por 72 horas.
- ♦ Trimagem.
- ♦ Seleção de campos desejados com o uso de cortes semi-finos corados em azul de metileno 1% e azur II 1% em solução de bórax 1%.
- ♦ Obtenção de cortes ultrafinos utilizando ultramicrotomo (Ultratome III 880, LKB).
- ♦ Coloração dos cortes ultrafinos em solução saturada de acetato de uranila em álcool 50% e, posteriormente, em citrato de chumbo.

Após preparo do material e coloração, as grades foram analisadas em microscópio de transmissão (CM100[®], Philips) e as células espermáticas fotografadas para análise da ultraestrutura.

7. Eletroforese unidimensional

Amostras das proteínas do citosol (solúvel) para todos os animais separadamente e das proteínas da matriz perinuclear (não-solúvel) para o *pool* dos animais normospérmicos e teratospérmicos foram submetidas à eletroforese unidimensional e, posteriormente, à técnica de eletroforese bidimensional. Quando não citado, todos os reagentes mencionados foram adquiridos da empresa GE Healthcare (PlusOne e USB).

As amostras de proteína espermática foram diluídas em tampão da amostra [60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50% glicerol, 2% SDS, 23 mM 2-mercaptoetanol, 0,1% bromofenol azul), na proporção de 1 do tampão para 4 da amostra e aquecidas a 100°C por 7 minutos. Um gel separador de 12% de poliacrilamida (30% de acrilamida e 0,8% de bisacrilamida) e um gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida foram utilizados para a corrida. Após a polimerização do gel de empilhamento, o tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS) foi adicionado à cuba (mini-cuba vertical, MiniVE[®], Amersham Biosciences).

Duas canaletas do gel foram destinadas à aplicação de um padrão de peso molecular (Full Range Rainbow[®], Recombinant Protein Molecular Weight Markers, 12 a 225 kDa, Amersham Biosciences). Nas demais canaletas do gel foram adicionados 15 µL da amostra, resultando em uma quantidade de 36 µg de proteína total por amostra. A cuba foi então ligada a uma fonte elétrica bipolar (EPS 300 Power Supply, Amersham Biosciences) com uma corrente elétrica constante de 15 mA/ gel e voltagem máxima de 180 V, os quais foram aplicados durante 170 minutos.

Os géis foram corados em solução de 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 0,1% de Coomassie Azul (Coomassie[®] Brilliant Blue R-250) durante 30 minutos. Posteriormente, as imagens dos géis foram digitalizadas e analisadas em *software* específico para leitura de eletroforese unidimensional (ImageMaster[®] 1D, Amersham Biosciences) para determinação do peso molecular e densidade óptica integrada (IOD) de cada banda protéica no gel.

8. Eletroforese bidimensional

A técnica de eletroforese bidimensional foi realizada segundo os métodos contidos em manuais técnicos (Protean[®] IEF Cell for 2D Instructions, Bio-Rad Laboratories).

Rehidratação passiva dos strips

O volume de 35 µL das amostras de proteína foi diluído em 125 µL de solução de rehidratação (8 M uréia, 2% CHAPS, 0,001% bromofenol azul, 50mM DTT e 0,2% Bio-lytes), resultando em uma quantidade de 224 µg de proteína total por amostra. Posteriormente, as amostras foram colocadas em sarcófagos da bandeja de rehidratação.

As proteções adesivas dos *strips* (7 cm, gradiente de pH 3 a 10 NL, Immobiline[®] DryStrip) foram retiradas e cada um foi acomodado dentro de um sarcófago sobre a amostra previamente diluída, ficando voltado para baixo e, assim, em contato com o líquido. Os *strips* foram recobertos com 2 mL de óleo mineral e a bandeja mantida por 12 horas na temperatura de 20 a 25°C.

Primeira dimensão: Isoeletrofocalização (IEF)

Na bandeja destinada à IEF, um papel filtro (Eletrode wicks 10x5 mm) previamente umedecido em água MilliQ foi acomodado sobre cada eletrodo. Os *strips* foram retirados da bandeja de rehidratação, acomodados na bandeja de IEF e recobertos novamente com 2 mL de óleo mineral. A bandeja foi encaixada no aparelho de IEF (Protean[®] IEF Cell, Bio-Rad Laboratories) e o aparelho programado. O método de corrida utilizado para a realização da IEF está descrito no Quadro 2.

Após a corrida, o excesso de óleo mineral foi retirado de cada *strip* e estes foram colocados em uma bandeja de rehidratação e congelados a -20°C. Os *strips* foram posteriormente descongelados para a realização da corrida de segunda dimensão em gel de poliacrilamida.

QUADRO 2. Ajuste do aparelho de IEF.

Temperatura	20°C
Máxima μA / gel	50 μA
S1: <i>Conditioning step</i>	250 V por 15 minutos
S2: <i>Voltage ramping</i>	<i>Rapid</i> (4.000 V durante 2 horas)
S3: <i>Final focusing</i>	4.000 V até 20.000 V hora para <i>strips</i> de 7 cm
S4: <i>Hold step</i>	500 V

Segunda dimensão: SDS – PAGE

A corrida foi realizada em mini cubas (MiniVE[®], Amersham Biosciences) em gel de 12% de poliacrilamida. Os *strips* foram descongelados e colocados numa bandeja contendo 2,5 mL da solução de equilíbrio I [6 M uréia, 2% SDS, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 20% glicerol e 130 mM DTT] e permaneceram sob agitação constante durante 10 minutos. A solução de equilíbrio I foi retirada e 2,5 mL da solução de equilíbrio II [6 M uréia, 2% SDS, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 20% glicerol e 135 mM iodoacetamida] foi adicionada a cada *strip* e a bandeja agitada por 10 minutos.

Após o término do equilíbrio, um papel filtro (Eletrode wicks 10x5 mm) foi umedecido com 5 μL de um padrão de peso molecular (Full Range Rainbow[®], Recombinant Protein Molecular Weight Markers, 12 a 225 kDa, Amersham Biosciences), e então acomodado no canto esquerdo de cada gel. Os *strips* foram retirados da solução de equilíbrio II, imersos em tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% SDS) e colocados sobre o gel, lateral ao papel filtro com o padrão de peso molecular. O *strip* e papel filtro foram cobertos com agarose 0,5%, contendo 0,001% de bromofenol azul, em tampão de corrida.

Os módulos foram acoplados na cuba de eletroforese, preenchidos com tampão de corrida e ligados à fonte elétrica bipolar (EPS 300 Power Supply, Amersham Biosciences). A miliamperagem foi fixada em 15 mA/ gel e a voltagem permaneceu livre. O tempo de corrida para os géis variou de 100 a 130 minutos.

Os géis foram corados em solução de 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 0,1% de Coomassie Azul (Coomassie[®] Brilliant Blue R-250) durante 30 minutos. As imagens dos géis foram digitalizadas (ImageScanner II, GE Healthcare) e analisadas em *software* específico para leitura de eletroforese bidimensional (ImageMaster[®] 2D Platinum, version 7.0, GE Healthcare).

Resultados

RESULTADOS

1. Extração das proteínas espermáticas

1.1. Avaliação ultraestrutural

A partir das características ultraestruturais normais da região da cabeça dos espermatozoides (Figura 7) foram acompanhadas modificações morfológicas nessa região, as quais foram promovidas pelas etapas dos protocolos de extração das proteínas espermáticas do citosol e matriz perinuclear, tais como; congelação/ descongelação (Figura 8), sonicação (Figura 9) e incubação em carbonato de sódio (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Após a etapa de congelação/ descongelação das células espermáticas por imersão direta em nitrogênio líquido, previamente ao processo de extração das proteínas, foi comum o achado de espermatozoides com pontos de ruptura das membranas plasmática e acrossomal externa e, conseqüentemente, liberação do conteúdo acrossomal com preservação da matriz perinuclear e núcleo (Figura 8).

Por sua vez, o procedimento de sonicação dos espermatozoides levou a uma ruptura total das membranas plasmática e acrossomal externa, contudo sem causar danos estruturais à matriz perinuclear e ao núcleo das células espermáticas (Figura 9).

A etapa de incubação em carbonato de sódio promoveu a dissolução da matriz perinuclear em diferentes graus, levando em alguns casos a total ausência da mesma em determinadas porções da cabeça do espermatozoide (Figura 10). Na maioria dos espermatozoides ocorreu destacamento completo da matriz perinuclear com ruptura da membrana acrossomal interna e envelope nuclear e, conseqüentemente, desestruturação do núcleo e perda da coesão do material genético semelhante à descondensação da cromatina (Figuras 11, 12 e 13). Para algumas células espermáticas, nas quais há total ausência da matriz perinuclear, é possível observar apenas resquícios do material genético (Figura 11).

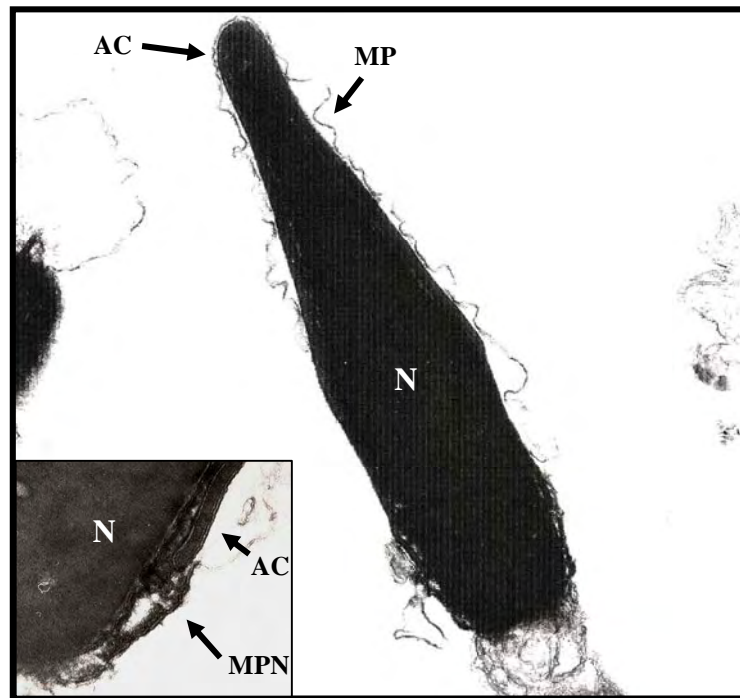


FIGURA 7. Espermatozóide íntegro antes do procedimento de extração das proteínas espermáticas. AC = conteúdo acrossomal, MP = membrana plasmática, MPN = matriz perinuclear, N = núcleo. Aumento de 31.500x.

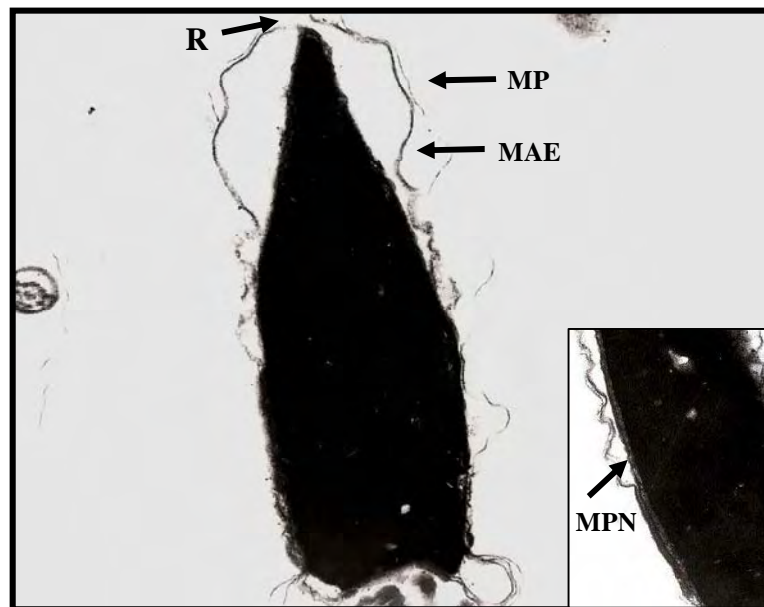


FIGURA 8. Espermatozóide após procedimento de congelação/ descongelação. MAE = membrana acrossomal externa, MP = membrana plasmática, MPN = matriz perinuclear. R = ruptura das membranas plasmática e acrossomal externa. Aumento de 31.500x.



FIGURA 9. Espermatozóide após procedimento de sonicação. Ruptura completa das membranas plasmática e acrossomal externa. MPN = matriz perinuclear. Aumento de 31.500x.

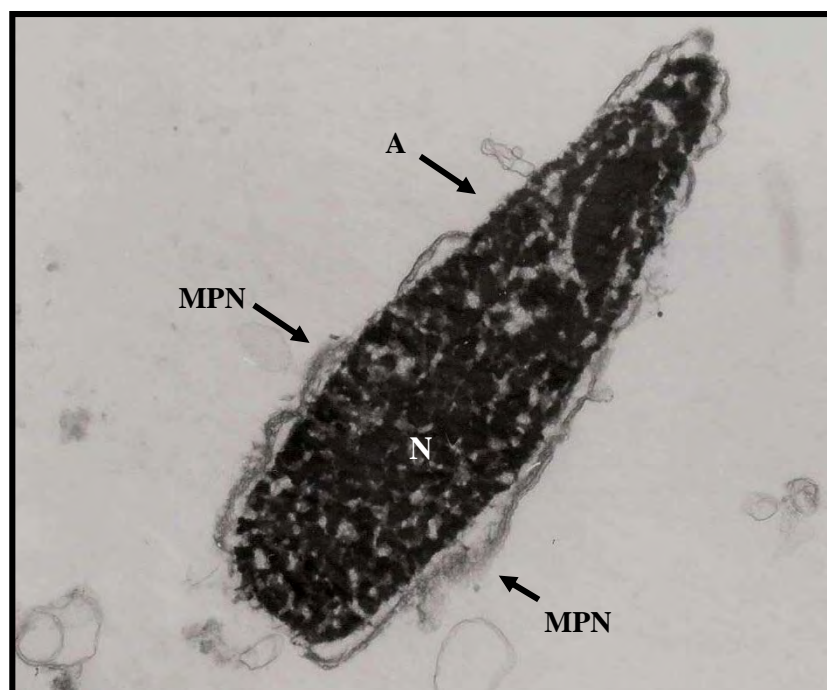


FIGURA 10. Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. Dissolução e ausência parcial da matriz perinuclear com desestruturação da cromatina. MPN = matriz perinuclear, A = ausência da MPN, N = núcleo. Aumento de 23.000x.

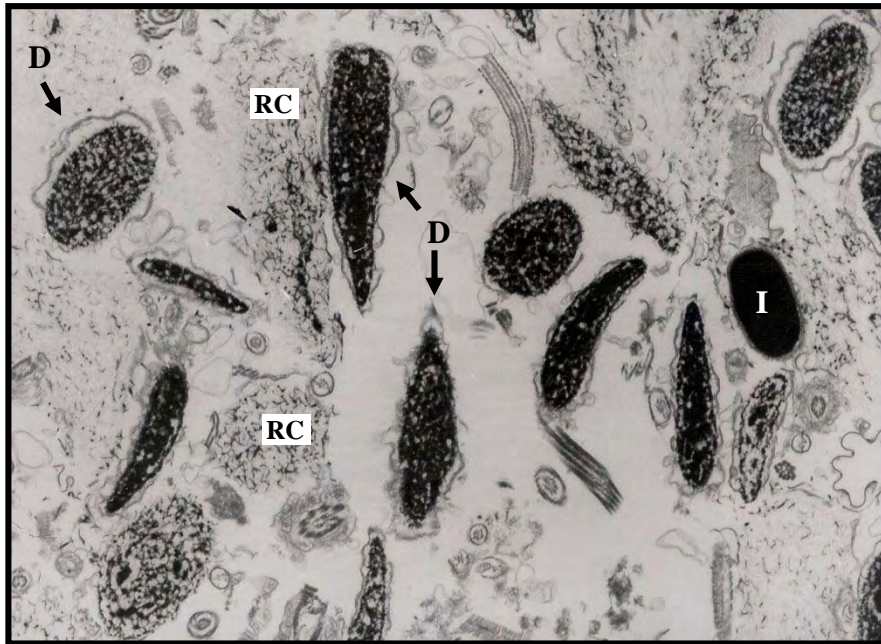
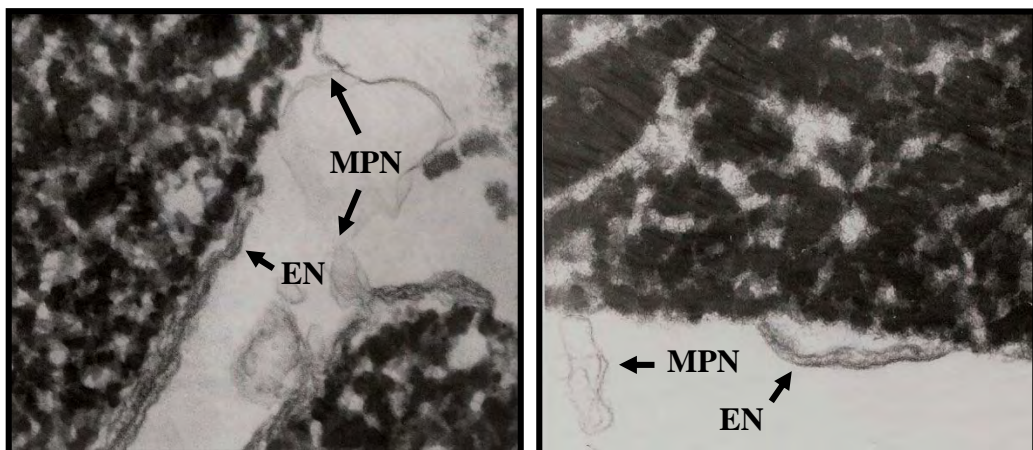


FIGURA 11. Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. D = destacamento da matriz perinuclear e desestruturação da cromatina, RC = resquícios de material genético, I = espermatozóide apresentando integridade da matriz perinuclear e do núcleo. Aumento de 9.750x.



FIGURAS 12 e 13. Espermatozóide após incubação em carbonato de sódio. MPN = matriz perinuclear, EN = envelope nuclear. Aumento de 107.500x (esquerda) e 77.500x (direita).

1.2. Total de proteína espermática recuperada

O protocolo utilizado para a extração das proteínas do citosol resultou em uma quantidade média de proteína total recuperada de $0,40 \pm 0,03$ μg por milhão de espermatozoides submetidos ao processo de extração. Por sua vez, a extração das proteínas da matriz perinuclear resultou em uma quantidade média de $0,033 \pm 0,01$ μg e $0,123 \pm 0,001$ μg de proteína total por milhão de espermatozoides antes e depois, respectivamente, da inclusão do agente redutor DTT ao protocolo de extração, o que levou a um aumento de 3,7 vezes na quantidade de proteína recuperada. Desta forma, a quantidade de proteína total recuperada da matriz perinuclear foi em média 3,3 vezes menor quando comparada à quantidade de proteína recuperada do citosol.

TABELA 2. Quantidade de espermatozoide utilizado, quantidade de proteína total recuperada e proporção de proteína total recuperada por quantidade de espermatozoides utilizados para os protocolos de extração das proteínas espermáticas do citosol (SE^{C}) e matriz perinuclear (SE^{MP}).

Tipo de amostra	Animal	Quantidade de espermatozoide ($\times 10^6$)	Quantidade de proteína total (μL)	Proteína total / espermatozoide ($\mu\text{g} / 10^6$)
SE^{C}	Gato 1	1768,5	732,5	0,414
	Normo Gato 2	1689,0	642,0	0,380
	Gato 3	1653,0	650,9	0,394
	Interm Gato 4	2019,0	796,3	0,394
	Gato 5	2073,5	907,2	0,438
	Terato Gato 6	1671,5	660,5	0,395
SE^{MP}	Normospermicos	7289,0	903,6	0,124
	Teratospermicos	5127,5	627,8	0,122

Normospermicos (Normo); qualidade seminal intermediária (Interm); teratospermicos (Terato).

2. Eletroforese unidimensional

A eletroforese unidimensional das amostras de proteínas espermáticas revelou um total de 28 bandas protéicas em ambas as amostras provenientes da matriz perinuclear e 33 bandas protéicas em todas as amostras de proteína do citosol (Figura 14). Analisando as colunas das proteínas do citosol, quarta a nona coluna (Figura 14), é possível observar uma distribuição mais uniforme das bandas protéicas entre os diferentes pesos moleculares, sem diferença visível entre os animais. Em contrapartida, na segunda e terceira coluna da Figura 14, correspondentes às proteínas da matriz perinuclear, as bandas distribuem-se principalmente nas regiões de baixo peso molecular.

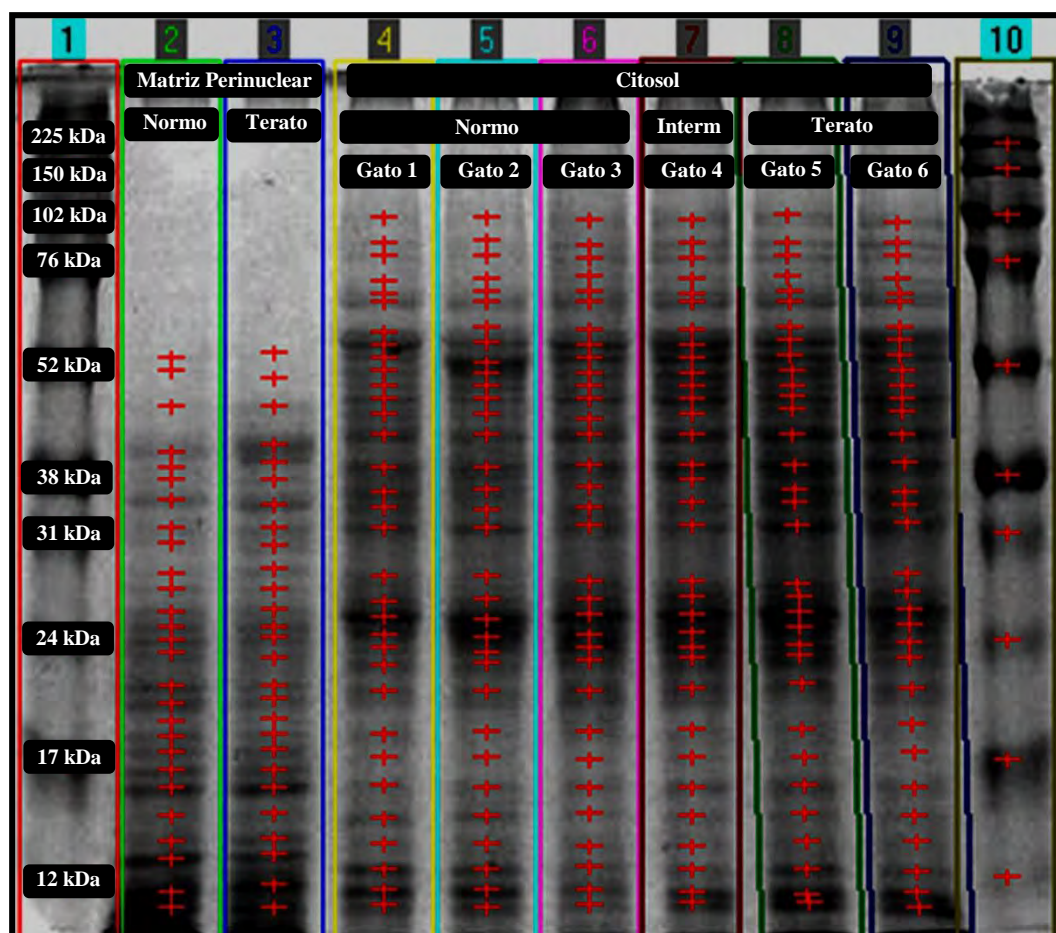


FIGURA 14. Gel de eletroforese unidimensional das proteínas espermáticas. Iniciando da segunda coluna da esquerda para a direita, as amostras correspondem ao SE^{MP} de animais normospermico (Normo) e teratospermico (Terato) e ao SE^C dos gatos 1 ao 6, sendo o gato 4 de qualidade seminal intermediária (Interm).

As amostras das proteínas espermáticas do citosol apresentaram maior quantidade de proteína nas bandas protéicas localizadas no intervalo de 0 a 40 kDa, seguido do intervalo de 40 a 60 kDa. Adicionalmente, a banda protéica de maior peso molecular, presente nas amostras das proteínas do citosol, foi de 100 kDa. Para as proteínas espermáticas provenientes da matriz perinuclear, o intervalo de peso molecular que apresentou maior quantidade de proteína foi de 0 a 30 kDa, com pronunciada redução nos intervalos de maior peso molecular. A banda protéica de maior peso molecular visualizada em ambas as amostras da matriz perinuclear foi de 54 kDa.

TABELA 3. Valores médios para peso molecular (kDa) e quantidade de proteína (μg) das bandas protéicas presentes na eletroforese unidimensional de amostras provenientes do citosol (SE^{C}) e matriz perinuclear (SE^{MP}).

Tipo de proteína	Banda	
	Peso molecular (kDa)	Quantidade de proteína (μg)
SE^{C}	79,6 \pm 0,71	0,34 \pm 0,06
	72,5 \pm 0,45	0,29 \pm 0,04
	69,1 \pm 0,33	0,25 \pm 0,05
	67,0 \pm 0,0	0,48 \pm 0,13
	34,4 \pm 0,39	0,67 \pm 0,26
SE^{MP}	54,0 \pm 1,41	0,17 \pm 0,10
	41,7 \pm 0,67	0,91 \pm 0,10
	39,6 \pm 0,45	0,40 \pm 0,28
	31,6 \pm 0,0	0,62 \pm 0,01
	24,8 \pm 0,0	0,60 \pm 0,05
	15,8 \pm 0,0	1,16 \pm 0,10

Nas bandas protéicas de ambas as amostras de proteínas da matriz perinuclear foram localizadas cinco bandas (Tabela 3) com peso molecular próximo ao de outras proteínas já descritas para a matriz perinuclear das células espermáticas de outras espécies.

Para as amostras de proteínas do citosol foi observado um total de quatro bandas protéicas no intervalo de peso molecular de 60 a 80 kDa, o qual provavelmente contém a proteína PLC ζ de 70 kDa (Figura 15). As quatro bandas protéicas foram encontradas em todas as amostras espermáticas utilizadas para extração, do gato 1 ao 6 (Tabela 3). A quantidade de proteína de cada banda foi semelhante entre animais normospérmicos (gatos 1, 2 e 3) e teratospérmicos (gatos 5 e 6) para as bandas de 69,1, 72,5 e 79,6 kDa, enquanto que a banda de peso molecular de 67,0 kDa foi ligeiramente maior para os animais normospérmicos. Em ambas as amostras de proteínas da matriz perinuclear não foi localizada nenhuma banda protéica no intervalo de 60 a 80 kDa.

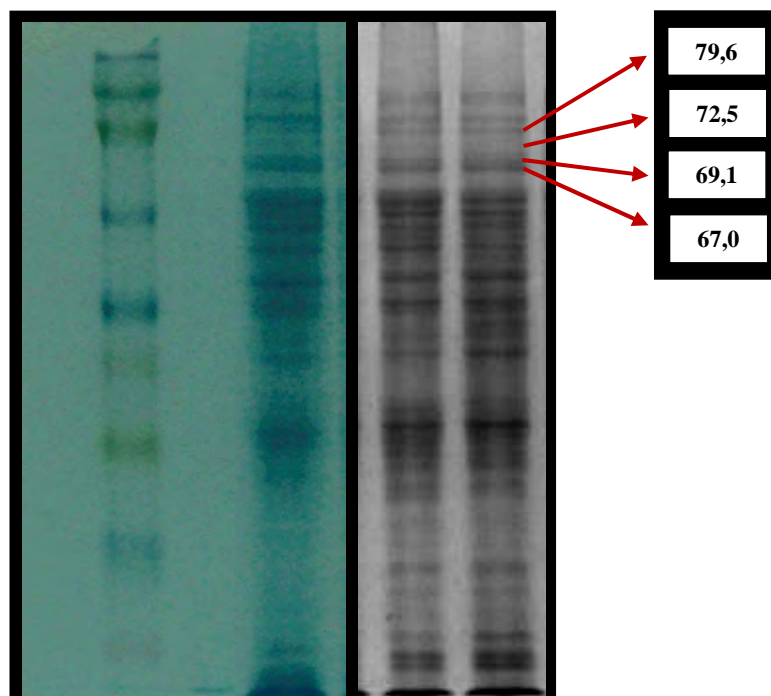


FIGURA 15. Gel de eletroforese unidimensional das proteínas espermáticas do citosol. Proteínas entre o intervalo de 60 a 80 kDa estão indicadas por seu peso molecular.

3. Eletroforese bidimensional

3.1. Número de spots e porcentagem de equivalência

Com o auxílio de *software* específico, os géis de diferentes amostras dentro de cada tipo de extrato, do citosol ou da matriz perinuclear, foram pareados e, assim, o grau de equivalência (*match*) foi determinado entre os pares de géis.

O número de *spots* encontrado em cada gel e a porcentagem de equivalência entre as amostras das proteínas do citosol estão presentes no Quadro 3. Em média, a porcentagem de equivalência dos gatos normospérmicos (1, 2, e 3) entre si, com os gatos teratospérmicos (5 e 6) e com o gato 4 foi de $33,5 \pm 4,1\%$, $26,9 \pm 5,1\%$ e $19,6 \pm 8,4\%$, respectivamente. Por sua vez, o grau de equivalência dos animais teratospérmicos entre si e com o gato 4 foi de 16,9% e $21,7 \pm 1,9\%$, respectivamente. Nas amostras de proteínas da matriz perinuclear foi encontrada uma quantidade de *spots* de 95 e 111 para a amostra *pool* dos animais normospérmicos e teratospérmicos, respectivamente, e 35,9% de equivalência entre ambas.

QUADRO 3. Número total de *spots* por gel (N° *Spots*), número de *spots* equivalentes por pareamento e porcentagem de equivalência entre o pareamento para as amostras de proteínas do citosol.

	Animal	Gato 1	Gato 2	Gato 3	Gato 4	Gato 5	Gato 6
Animal	N° <i>Spots</i>	75	125	120	118	176	203
Gato 1	75	75 (100)	43 (43,0)	29 (29,7)	12 (12,4)	31 (24,7)	25 (18,0)
Gato 2	125	43 (43,0)	125 (100)	34 (27,8)	35 (28,8)	62 (41,2)	24 (14,6)
Gato 3	120	29 (29,7)	34 (27,8)	120 (100)	21 (17,6)	48 (32,4)	49 (30,3)
Gato 4	118	12 (12,4)	35 (28,8)	21 (17,6)	118 (100)	30 (20,4)	37 (23,1)
Gato 5	176	31 (24,7)	62 (41,2)	48 (32,4)	30 (20,4)	176 (100)	32 (16,9)
Gato 6	203	25 (18,0)	24 (14,6)	49 (30,3)	37 (23,1)	32 (16,9)	203 (100)

3.2. Distribuição das proteínas por massa molecular e ponto isoelétrico

A quantidade (volume) e número total de proteínas presentes em cada gel foram divididos em intervalos de peso molecular (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 e acima de 100 kDa) e de ponto isoelétrico (3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10) e estão expressos em porcentagem para as proteínas do citosol (Figuras 16 e 17) e matriz perinuclear (Figuras 18 e 19).

Para as proteínas do citosol é possível observar dentro de cada intervalo, para os valores de massa molecular e ponto isoelétrico, uma correspondência entre o número de proteínas e a quantidade de proteína presente. As amostras provenientes do citosol apresentaram maior quantidade e número de proteína no intervalo entre 0 a 40 kDa com queda acentuada nos intervalos de maior peso molecular (Figura 16). Para o ponto isoelétrico, a maioria das proteínas se distribuiu na faixa de pH de 4 a 8 (Figura 17).

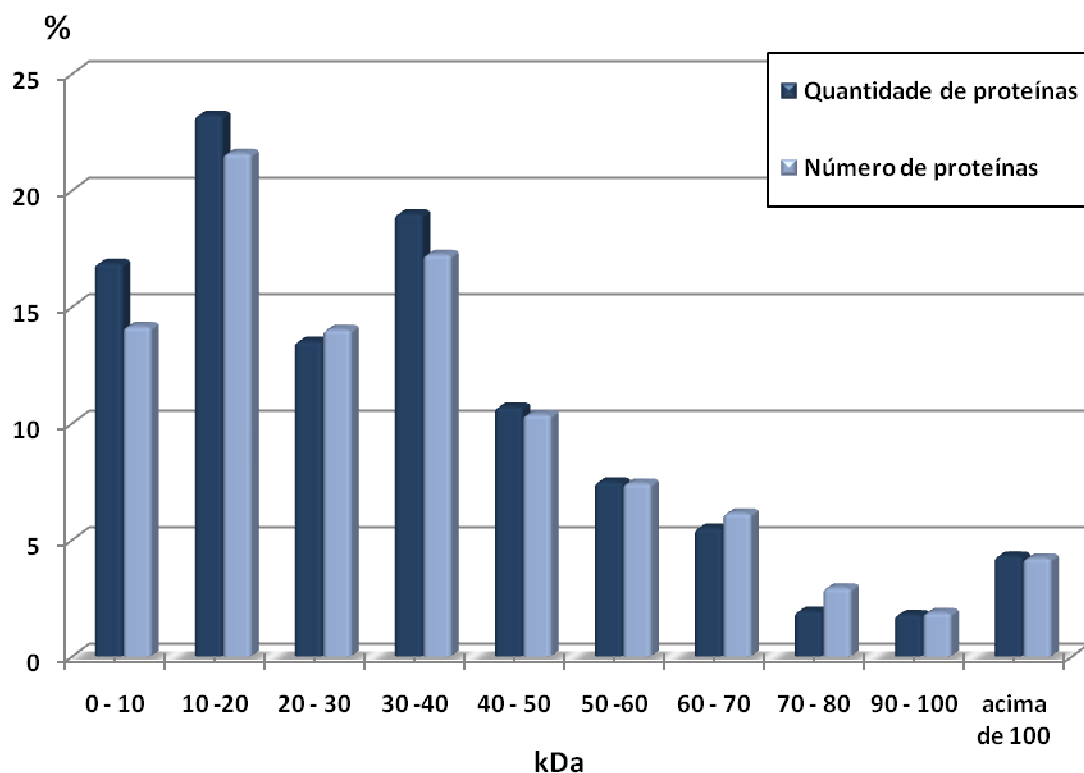


FIGURA 16. Distribuição em diferentes intervalos de peso molecular da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas do citosol.

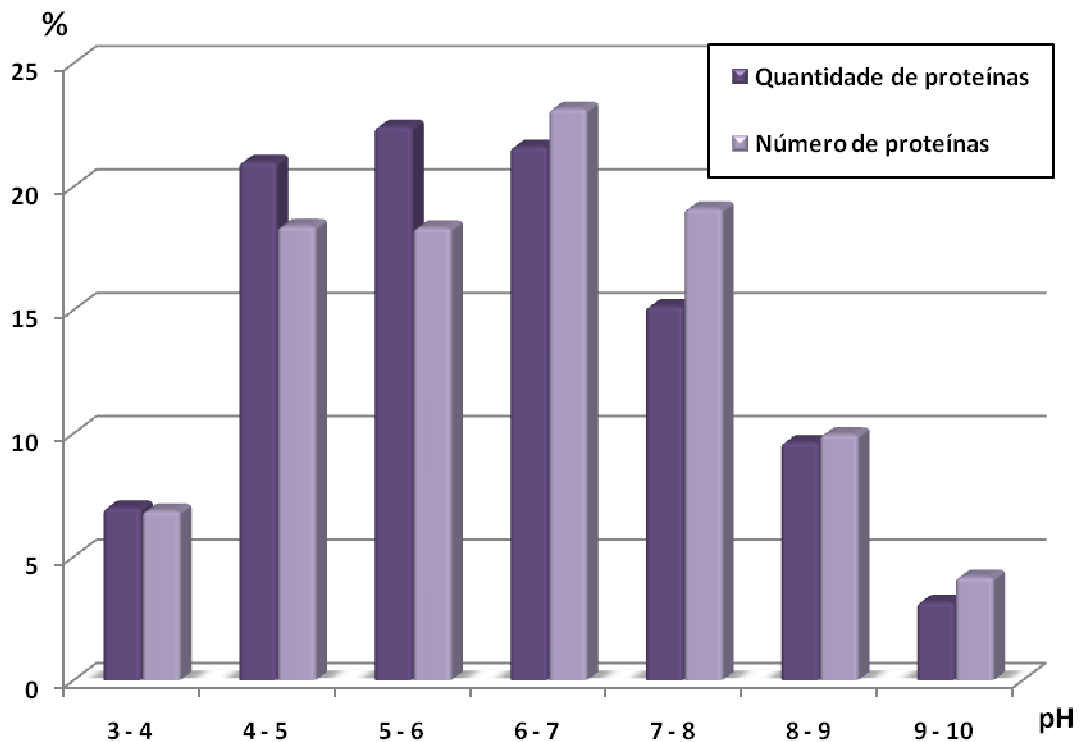


FIGURA 17. Distribuição em diferentes intervalos de ponto isoelétrico da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas do citosol.

Para as proteínas espermáticas provenientes da matriz perinuclear, mais de 50% da quantidade e número dessas proteínas está presente no intervalo de peso molecular de 0 a 20 kDa (Figura 18). A partir do peso molecular de 40 kDa é observada intensa redução na quantidade e número de proteínas. No intervalo de 0 a 10 kDa há grande diferença entre a quantidade de proteína e o número de *spots*, assim, as proteínas presentes nessa faixa apresentam maior volume de proteína. Essa situação reverte-se para as proteínas de maior peso molecular, dessa forma, no intervalo entre 40 até 100 kDa os *spots* presentes apresentam pequena quantidade de proteína.

Da mesma forma que evidenciado para as proteínas do citosol, as proteínas da matriz perinuclear distribuíram-se principalmente nos intervalos de ponto isoelétrico de 4 a 8 (Figura 19). As proteínas da matriz perinuclear no intervalo de pH de 4 a 5 apresentaram maior quantidade de proteína por *spot*.

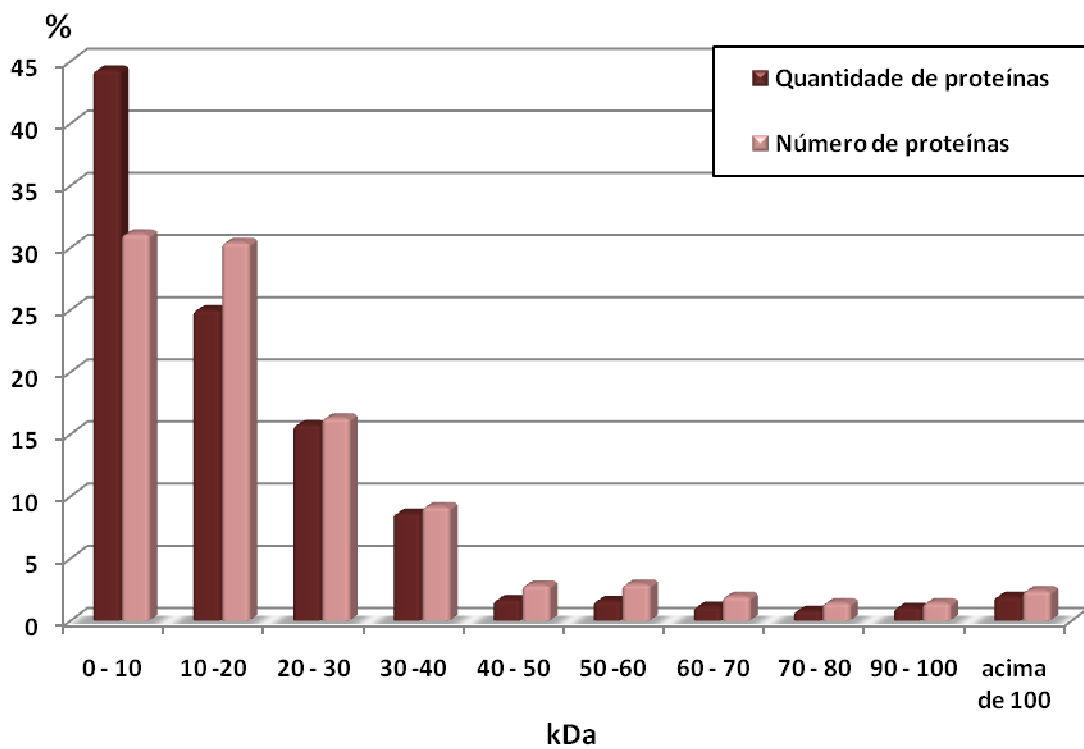


FIGURA 18. Distribuição em diferentes intervalos de peso molecular da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas da matriz perinuclear.

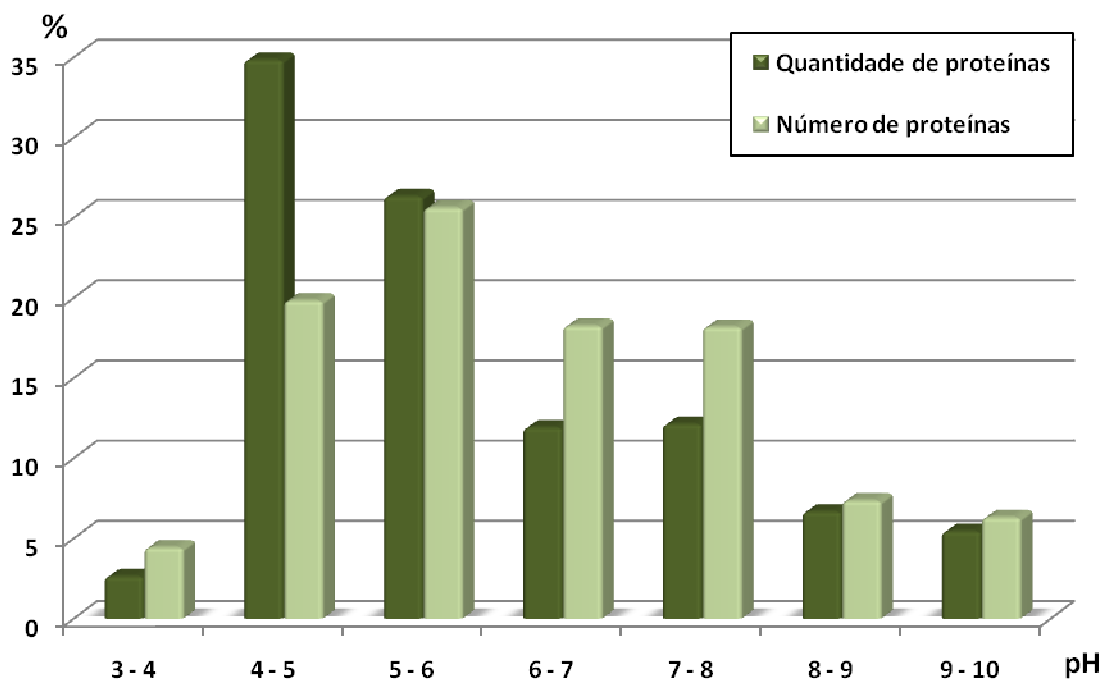


FIGURA 19. Distribuição em diferentes intervalos de ponto isoelétrico da quantidade e número das proteínas espermáticas extraídas da matriz perinuclear.

3.3. Proteínas espermáticas do citosol

Após leitura das amostras dos extratos espermáticos do citosol foi possível observar 16 *spots* no intervalo de peso molecular de 60 a 80 kDa, os quais estão presentes na maioria das amostras dos animais normospérmicos, teratospérmicos e gato 4. É importante ressaltar que nem todos os animais apresentaram os 16 *spots* e que essa variação foi independente da qualidade espermática (normospérmico ou teratospérmico). O intervalo de 60 a 80 kDa foi escolhido devido ao fato da proteína de interesse, a PLC ζ , apresentar em torno de 70 kDa. Os *spots* presentes nesse intervalo para todos os gatos foram agrupados e enumerados de acordo com sua localização no gel (Figura 20) e/ou pela equivalência entre eles, a qual foi determinada através do software (Tabela 4).

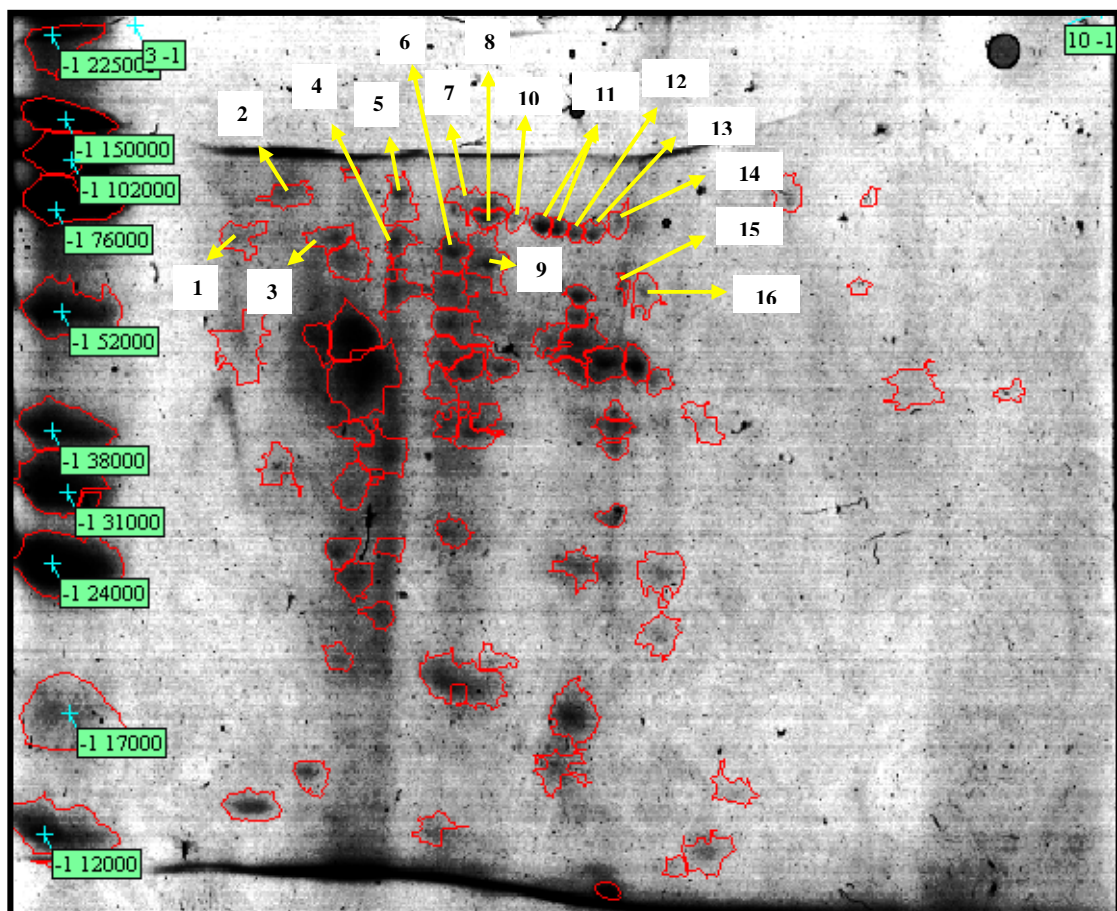


FIGURA 20. Gel de eletroforese bidimensional da amostra de proteína espermática do citosol para o gato 1. Os *spots* de interesse, entre 60 e 80 kDa, estão enumerados.

TABELA 4. Spots presentes na eletroforese bidimensional das proteínas espermáticas do citosol entre o intervalo de 60 a 80 kDa para todos os gatos. Spots equivalentes apresentam mesma numeração.

Spot	Amostra	Peso Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Quantidade de proteína (µg)
1	Gato 1	68,2	3,7	0,79
	Gato 2	71,1	3,6	0,23
	Gato 3	68,9	3,7	0,71
	Gato 4	54,1	3,9	0,31
	Gato 5	70,4	3,4	0,36
	Gato 6	69,2	3,8	0,62
	Média ± DP	67,0 ± 6,4	3,7 ± 0,2	0,50 ± 0,2
2	Gato 1	82,8	4,1	1,04
	Gato 2	71,6	4,0	0,66
	Gato 3	95,1	4,0	0,25
	Gato 5	61,8	3,8	0,61
	Média ± DP	77,8 ± 14,4	4,0 ± 0,1	0,64 ± 0,3
3	Gato 1	68,7	4,5	0,93
	Gato 2	77,2	4,6	0,29
	Gato 3	56,6	4,6	0,44
	Gato 5	69,0	4,4	0,20
	Gato 6	70,1	4,3	0,51
	Média ± DP	68,3 ± 7,4	4,5 ± 0,1	0,48 ± 0,3
4	Gato 1	67,7	4,9	0,85
	Gato 2	66,0	4,9	0,54
	Gato 4	59,4	5,0	2,30
	Gato 5	60,1	4,7	0,39
	Gato 6	63,1	4,5	0,32
	Média ± DP	63,2 ± 3,6	4,8 ± 0,2	0,88 ± 0,8
5	Gato 1	83,8	4,9	1,17
	Gato 2	87,4	4,9	0,14
	Gato 4	73,5	4,9	0,78
	Gato 5	76,0	4,7	0,21
	Gato 6	74,6	5,0	1,25
	Média ± DP	79,1 ± 6,2	4,9 ± 0,1	0,71 ± 0,5
6	Gato 1	65,1	5,3	1,02
	Gato 2	62,2	5,4	1,65
	Gato 3	59,0	5,5	1,33
	Gato 4	58,6	5,3	0,81
	Gato 5	68,5	5,2	0,40
	Gato 6	61,9	5,1	0,66
	Média ± DP	62,6 ± 3,8	5,3 ± 0,2	0,98 ± 0,5
7	Gato 1	78,8	5,6	1,26
	Gato 3	81,5	5,8	0,40
	Gato 4	70,6	5,5	0,66
	Gato 5	70,0	5,4	0,40
	Gato 6	71,9	5,6	0,92
	Média ± DP	74,6 ± 5,3	5,6 ± 0,2	0,73 ± 0,4
8	Gato 1	73,7	5,5	0,58
	Gato 2	74,9	5,3	1,26
	Gato 3	71,8	5,7	0,59
	Gato 4	62,7	5,5	0,73
	Gato 5	67,1	5,4	1,05
	Gato 6	71,0	5,7	0,75
	Média ± DP	70,2 ± 4,6	5,5 ± 0,1	0,83 ± 0,3

TABELA 4. Continuação.

Spot	Amostra	Peso Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Quantidade de proteína (µg)
9	Gato 1	62,1	5,6	2,40
	Gato 2	63,6	5,7	1,61
	Gato 4	58,2	5,5	0,43
	Gato 5	58,9	5,5	0,96
	Gato 6	61,5	5,6	2,13
	Média ± DP	60,9 ± 2,3	5,6 ± 0,1	1,50 ± 0,8
10	Gato 1	73,1	5,8	0,35
	Gato 2	73,2	5,6	1,20
	Gato 3	63,3	5,8	0,34
	Gato 4	61,0	5,7	0,94
	Gato 5	66,2	5,7	0,64
	Gato 6	63,5	5,8	0,45
Média ± DP	66,7 ± 5,3	5,7 ± 0,1	0,65 ± 0,3	
11	Gato 1	70,9	6,1	0,58
	Gato 2	71,6	6,1	0,83
	Gato 3	69,9	6,0	1,06
	Gato 4	67,9	6,1	0,83
	Gato 5	65,3	6,0	1,11
	Gato 6	71,0	6,0	0,51
Média ± DP	69,4 ± 2,4	6,0 ± 0,1	0,82 ± 0,2	
12	Gato 1	69,3	6,2	0,34
	Gato 2	71,6	6,3	0,92
	Gato 3	70,3	6,3	0,35
	Gato 4	67,9	6,3	0,36
	Gato 5	65,3	6,2	0,52
	Gato 6	71,4	6,2	0,55
Média ± DP	69,3 ± 2,4	6,2 ± 0,1	0,51 ± 0,2	
13	Gato 1	69,3	6,3	0,52
	Gato 2	70,6	6,5	0,37
	Gato 4	67,0	6,4	0,65
	Gato 5	64,8	6,4	0,31
	Gato 6	71,0	6,4	1,05
	Média ± DP	68,5 ± 2,6	6,4 ± 0,1	0,58 ± 0,3
14	Gato 1	73,1	6,5	0,39
	Gato 2	72,7	6,6	0,65
	Gato 4	67,4	6,6	0,21
	Gato 5	67,6	6,6	0,69
	Gato 6	72,8	6,7	0,52
	Média ± DP	70,7 ± 2,9	6,6 ± 0,1	0,49 ± 0,2
15	Gato 1	57,5	6,5	0,19
	Gato 2	64,5	6,7	0,51
	Gato 3	54,6	6,3	0,71
	Gato 4	61,8	6,6	0,47
	Gato 5	53,8	6,7	0,34
	Gato 6	58,5	6,8	0,39
Média ± DP	58,5 ± 4,1	6,6 ± 0,2	0,43 ± 0,2	
16	Gato 1	55,8	6,7	0,79
	Gato 2	64,5	6,9	0,19
	Gato 3	55,0	6,6	0,56
	Gato 4	61,8	6,9	0,26
	Gato 5	53,5	6,8	0,44
	Gato 6	58,2	6,9	0,47
Média ± DP	58,1 ± 4,3	6,8 ± 0,1	0,45 ± 0,2	

3.4. Proteínas espermáticas da matriz perinuclear

As amostras das proteínas da matriz perinuclear apresentam um número pequeno de proteínas localizadas entre 60 a 80 kDa, com um total de 5 e 4 *spots* para os animais normospérmicos e teratospérmicos, respectivamente. A análise desses *spots* revelou 5 pares equivalentes para os dois tipos de amostra, as quais envolvem *spots* nesse intervalo (60 a 80 kDa) e alguns fora do mesmo (Tabela 5). *Spots* apresentando peso molecular próximo ao de outras proteínas já descritas para a matriz perinuclear foram separados por par de equivalência para as duas amostras e estão listados na Tabela 5. A localização dos *spots* presentes na Tabela 5 está indicada na Figura 21 através de seu número de identificação.

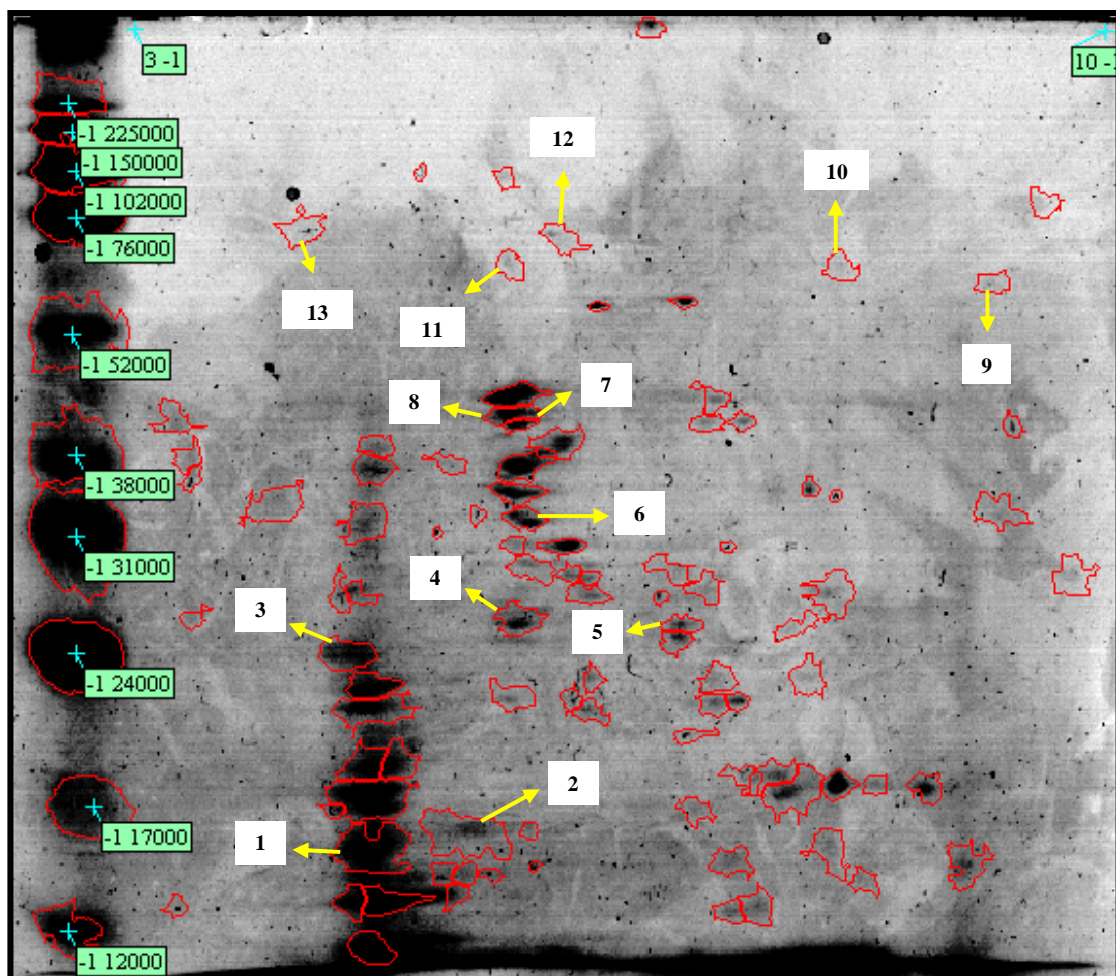


FIGURA 21. Gel de eletroforese bidimensional das proteínas espermáticas da matriz perinuclear dos animais normospérmicos. Os *spots* de interesse estão enumerados.

TABELA 5. Spots presentes na eletroforese bidimensional das proteínas espermáticas da matriz perinuclear de animais normospérmicos e teratospérmicos. Spots equivalentes apresentam mesma numeração.

Spot	Amostra	Massa Molecular kDa	Ponto Isoelétrico	Quantidade de proteína (µg)
1	N	15,0	4,7	5,73
	T	14,8	4,4	3,32
	Média ± DP	14,9 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,52 ± 1,7
2	N	15,9	5,4	2,77
	T	15,4	4,8	0,12
	Média ± DP	15,7 ± 0,4	5,1 ± 0,4	1,45 ± 1,9
3	N	23,9	4,5	2,35
	T	23,8	4,3	1,58
	Média ± DP	23,8 ± 0,1	4,4 ± 0,1	1,96 ± 0,5
4	N	25,5	5,8	1,12
	T	25,6	5,5	3,24
	Média ± DP	25,5 ± 0,1	5,7 ± 0,2	2,18 ± 1,5
5	N	25,5	6,9	1,04
	T	25,7	6,7	0,91
	Média ± DP	25,6 ± 0,1	6,8 ± 0,2	0,98 ± 0,1
6	N	32,3	5,8	1,25
	T	32,6	5,6	1,36
	Média ± DP	32,5 ± 0,2	5,7 ± 0,2	1,31 ± 0,1
7	N	41,0	5,8	0,79
	T	40,4	5,5	1,33
	Média ± DP	40,7 ± 0,4	5,7 ± 0,2	1,06 ± 0,4
8	N	42,1	5,7	1,03
	T	41,4	5,5	0,92
	Média ± DP	41,8 ± 0,5	5,6 ± 0,2	0,98 ± 0,1
9	N	61,2	9,2	0,39
	T	55,3	8,6	0,57
	Média ± DP	58,3 ± 4,1	8,9 ± 0,4	0,48 ± 0,1
10	N	65,0	8,1	0,47
	T	65,3	7,7	0,27
	Média ± DP	65,2 ± 0,2	7,9 ± 0,3	0,37 ± 0,1
11	N	65,5	5,7	0,49
	T	74,4	5,5	0,41
	Média ± DP	70,0 ± 6,3	5,6 ± 0,1	0,45 ± 0,1
12	N	71,0	6,0	0,54
	T	84,5	6,3	0,25
	Média ± DP	77,8 ± 9,5	6,2 ± 0,2	0,39 ± 0,2
13	N	72,5	4,3	0,85
	T	90,7	3,2	0,53
	Média ± DP	81,6 ± 12,9	3,8 ± 0,7	0,69 ± 0,2

Amostra de animais normospérmicos (N); amostra de animais teratospérmicos (T).

Discussão

DISCUSSÃO

Os protocolos descritos na literatura destinados à extração das proteínas espermáticas do citosol ou matriz perinuclear (WU et al., 1998; WU et al., 2001; KUROKAWA et al., 2005) mostraram-se eficientes quando adaptados para os espermatozóides dos gatos domésticos no presente trabalho. Essa afirmação baseia-se no fato de que a determinação da concentração protéica para ambos os extratos espermáticos, SE^C e SE^{MP}, revelou a presença de proteínas.

Inicialmente, a extração das proteínas espermáticas do citosol consistia no rompimento das membranas plasmáticas pelo processo de sonicação ou aplicação de repetidos ciclos de congelação/ descongelação em nitrogênio líquido, ambos seguidos pelo procedimento de ultracentrifugação, para a retirada de restos celulares (SWANN, 1990; GALIONE et al., 1997; WU et al., 1997; JONES et al., 1998b). Com a utilização desse protocolo foi relatada a obtenção de 10 a 20 µg de proteína total por milhão de espermatozóides em camundongos e suínos (SWANN, 1990).

Posteriormente, na tentativa de obter extratos espermáticos mais purificados e concentrados, Wu et al. (1998) testaram em suínos a precipitação das proteínas em solução de sulfato de amônio saturada a 50%. Para verificar a presença do fator espermático desencadeador da ativação oocitária, o *pellet* e sobrenadante resultantes da precipitação em sulfato de amônio foram injetados separadamente em oócito de camundongos. Com base na observação de que apenas o *pellet* foi capaz de causar OsCa²⁺_i, Wu et al. (1998) concluíram que a precipitação em sulfato de amônio foi eficiente para a purificação dos extratos espermáticos. Com a inclusão dessa etapa de purificação nos protocolos de extração das proteínas espermáticas do citosol, foi relatada a obtenção de uma quantidade de 2 µg ou de 5 a 8 µg de proteína por milhão de espermatozóides em suínos (WU et al., 1998; KUROKAWA et al., 2005) e de 2,5 a 4 µg de proteína por milhão de espermatozóides em camundongos (KUROKAWA et al., 2005).

No presente estudo, o protocolo de extração das proteínas espermáticas do citosol, adaptado de Wu et al. (1998), resultou em uma quantidade média de proteína total recuperada de $0,40 \pm 0,03$ μg por milhão de espermatozóides. Desta forma, a recuperação das proteínas espermáticas do citosol foi de 5 a 20 vezes e de 6 a 10 vezes menor quando comparada ao obtido em suínos e camundongos, respectivamente (WU et al., 1998; KUROKAWA et al., 2005). A diferença na quantidade de proteína recuperada pode estar relacionada à variação no tamanho e formato entre os espermatozóides das diversas espécies de mamíferos. Enquanto as dimensões da cabeça dos espermatozóides de suínos e camundongos são em média $8,5 \times 4,2$ μm e $7,9 \times 3,2$ μm (comprimento x largura) respectivamente, nos gatos domésticos estas dimensões são de $4,8 \times 2,6$ μm (CUMMINS e WOODALL, 1985). Portanto, a menor quantidade de proteína por milhão de espermatozóides recuperada neste estudo pode ser devido, provavelmente, ao fato do espermatozóide do gato ser menor quando comparado ao de outras espécies utilizadas para a extração das proteínas do citosol.

Os primeiros protocolos para a extração das proteínas da matriz perinuclear, voltados ao estudo do fator espermático responsável pela ativação oocitária, consistiam na incubação das cabeças dos espermatozóides em Triton X-100, um detergente não iônico, e, posteriormente, em meio com alta concentração de DTT, um forte agente redutor (PERRY et al., 1999; 2000; FUJIMOTO et al., 2004). Esse protocolo resultou na total recuperação do fator espermático causador das OsCa^{2+}_i em camundongos (PERRY et al., 1999), porém o mesmo não foi observado para os espermatozóides de suínos (KUROKAWA et al., 2005). Por essa razão, na tentativa de recuperar todo o fator espermático responsável pela ativação do oócito, os espermatozóides de suínos foram expostos à extração alcalina em carbonato (KUROKAWA et al., 2005), a qual é utilizada para a recuperação de proteínas associadas às membranas (FUJIKI et al., 1982).

Neste estudo, com a extração das proteínas da matriz perinuclear pelo método de incubação em meio alcalino de carbonato, foi recuperada uma quantidade de proteína total de $0,033 \pm 0,01$ μg por milhão de espermatozóides. Devido à baixa quantidade de proteína obtida, foi realizada a

suplementação da solução de neutralização com DTT e, desta forma, foi observado um aumento de 3,7 vezes na quantidade de proteína recuperada, sendo esta de $0,123 \pm 0,001 \mu\text{g}$ de proteína total por milhão de espermatozoides. Baseado nesses resultados, em gatos domésticos a quantidade recuperada de proteína total da matriz perinuclear foi em média 3,3 vezes menor quando comparada à quantidade de proteína recuperada do citosol. Esse resultado está de acordo com o relatado para espermatozoides de suínos, no qual a recuperação das proteínas da matriz perinuclear foi de duas a oito vezes menor quando comparada à quantidade de proteína do citosol (KUROKAWA et al., 2005).

O processo de extração das proteínas espermáticas foi acompanhado pela análise ultraestrutural dos espermatozoides. Com base nessa avaliação foi observada a eficiência do processo de sonicação em causar a ruptura das membranas plasmática e acrossomal externa e, conseqüentemente, liberação do conteúdo do citosol para o meio extracelular. É importante ressaltar que após a sonicação não foram observados danos visíveis à estrutura da matriz perinuclear e do núcleo das células espermáticas.

Em adição, a etapa de incubação em carbonato de sódio levou à dissolução da matriz perinuclear em diferentes graus, com alguns espermatozoides apresentando o citoesqueleto ainda íntegro e outros a total ausência do mesmo. Na maioria das células espermáticas foi possível observar uma desestruturação nuclear semelhante à descondensação da cromatina. Uma explicação plausível para esse achado pode residir no fato de que o processo de extração levou a alterações importantes na estrutura da matriz perinuclear que, entre outras funções, é responsável por manter a integridade do núcleo (EDDY, 2006). Essa hipótese é baseada na observação de que, após a extração das proteínas, ocorreu um destacamento visível da matriz perinuclear do núcleo e a visualização de resquícios da cromatina quando houve total dissolução da matriz.

O DNA nos espermatozoides é mantido em seu estado condensado devido à ação de moléculas de protamina, as quais são compostas por uma região central rica em arginina e extremidades ricas em cisteína, que através de pontes de dissulfureto fazem a ligação entre as protaminas adjacentes

(HUD et al., 1994; PRIETO et al., 1997). O DTT, por causar a quebra das pontes de dissulfureto, é conhecido por promover a redução na ligação entre as moléculas de protamina em espermatozóides intactos (TATENO e KAMIGUCHI, 1999; SZCZYGIEL e WARD, 2002). Apesar da verdadeira ação do DTT no processo de descondensação nuclear ainda ser contraditória, foi relatado que a utilização desse agente redutor em conjunto com detergentes, como o Triton X-100, é capaz de promover a quebra da cromatina em espermatozóides (SZCZYGIEL e WARD 2002; CHANG e ZIRKIN, 2005).

Nos testes iniciais realizados neste experimento, nos quais o DTT não foi utilizado, a desestruturação do núcleo também foi evidenciada, porém em menor grau. Com base nesse achado é importante ressaltar que não apenas a ação do DTT sobre as pontes de dissulfureto pode ser a responsável pelo aumento no grau de ruptura do arranjo nuclear, mas também a maior dissolução do citoesqueleto após a adição do DTT. Assim, talvez a ação conjunta de fatores como; o rompimento das membranas espermáticas, a perda do citoesqueleto e a ação do DDT, tenha contribuído para a descondensação da cromatina observada na análise ultraestrutural.

No presente estudo, utilizando as técnicas de eletroforese unidimensional e bidimensional, não foi observada diferença entre os animais normospérmicos (gatos 1, 2 e 3), teratospérmicos (gatos 5 e 6) e gato 4 quanto a distribuição das proteínas e porcentagem de equivalência calculada pelo *software*, para as amostras dos extratos espermáticos do citosol e da matriz perinuclear. Em contrapartida, comparando a distribuição das proteínas do citosol e da matriz perinuclear, foi observada grande diferença em ambas as técnicas de eletroforese. Enquanto que a maior parte das proteínas do citosol se localizaram na faixa de peso molecular de 0 a 40 kDa, mais de 50% das proteínas da matriz perinuclear foram visualizadas na faixa de 0 a 20 kDa. Essa maior quantidade de proteínas abaixo de 20 kDa nas amostras da matriz perinuclear também foi observada na eletroforese unidimensional.

A matriz perinuclear, também conhecida como teca perinuclear, é um citoesqueleto especializado que se localiza abaixo do acrossomo e circunda quase que completamente o núcleo espermático (DE JONGE e BARRATT, 2006). Até o momento, três classes de proteínas podem ser distinguidas na

matriz perinuclear de mamíferos; as proteínas estruturais, as histonas e as proteínas sinalizadoras (EDDY, 2006). Para os gatos domésticos, não há relatos na literatura a respeito da composição protéica da matriz perinuclear.

Em espermatozóides bovinos, após extração das proteínas da matriz perinuclear, 20 µg de proteína total foi submetida à técnica de eletroforese unidimensional SDS-PAGE e um total de 20 bandas protéicas, incluindo seis bandas proeminentes (15,5, 25, 28, 32, 36 e 60 kDa), foram identificadas (OKO e MARAVEI, 1994). No presente estudo, para as amostras da matriz perinuclear, foi encontrado um total de 28 bandas protéicas, localizadas abaixo de 54 kDa, com sete bandas proeminentes de peso molecular de 13, 15,8, 16,6, 20,5, 21,4, 34,6 e 41,7 kDa. A diferença observada entre o perfil protéico dos dois estudos pode ser devido à variação entre as espécies ou à utilização de métodos diferentes para extração das proteínas da matriz perinuclear. Oko e Maravei (1994) relataram diferentes perfis protéicos dependendo do método usado para a extração das proteínas da matriz perinuclear.

As proteínas estruturais pertencentes à matriz perinuclear já identificadas são; *calicin* (LONGO et al., 1987; VON BÜLOW, 1995; LECUYER et al., 2000), *cylicin* I e II (HESS et al., 1993; 1995) e Arp-T1 e Arp-T2 (família das proteínas relacionadas à actina) (HEID et al., 2002).

A proteína *calicin*, identificada como a proteína de banda proeminente de 60 kDa em bovinos (OKO e MARAVEI, 1994) e, posteriormente, descrita em espermatozóides de humanos e suínos, apresenta peso molecular (PM) de 60 a 66,9 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 7,9 a 8,1 (VON BÜLOW, 1995; LECUYER et al., 2000). Neste estudo, apesar de não ter sido identificada banda protéica acima de 54 kDa para as proteínas da matriz perinuclear, na eletroforese bidimensional foram identificados dois *spots* em ambas as amostras (normospérmicos e teratospérmicos) com médias de 58,3 / 8,9 e 65,2 / 7,9 (PM / pI).

Por sua vez, as proteínas *cylicin* I e II, descritas em espermatozóides bovino e humano, apresentam valores de pI acima de 10 (10,55) (HESS et al., 1993; 1995), sendo superior à faixa de pI utilizada neste experimento. Entretanto, a banda protéica de 54 kDa, observada na eletroforese unidimensional deste estudo, pode estar relacionada à *cylilin* II (PM = 53,7

kDa) (HESS et al., 1995). Segundo Heid et al. (2002), em bovinos, ambas as proteínas Arp-T1 e Arp-T2 apresentam PM de aproximadamente 40 kDa e pl de 5. Para os gatos domésticos, foram observadas duas bandas protéicas de 41,7 e 39,6 kDa e dois *spots* proeminentes de 40,7 / 5,7 e 41,8 / 5,6 (PM / pl) em ambas as amostras.

Dentre as proteínas semelhantes à histona, que estão presentes na matriz perinuclear, são incluídas a variante histona sub-acrossomal H2B (SubH2Bv) (15 kDa) (AUL e OKO, 2002), inicialmente designada como PT15 (OKO e MARAVEI, 1994), e as proteínas de núcleo somático; H3 (18 kDa), H2B (17 kDa), H2A (14,5 kDa) e H4 (14 kDa) (TOVICH e OKO, 2003), todas identificadas em bovinos. Entre outras possíveis funções, provavelmente, as histonas presentes na matriz perinuclear sirvam como uma rápida fonte para os primeiros estágios da formação do pró-núcleo masculino (SUTOVSKY et al., 2003).

A proteína SubH2Bv foi relatada ser a banda de 15 kDa previamente descrita por Oko e Maravei (1994) em bovinos. No presente estudo, também foi identificada uma banda protéica proeminente de 15,8 kDa, sendo a maior banda em ambas as amostras (normospérmicos e teratospérmicos). Na eletroforese bidimensional, foram localizados dois *spots* proeminentes com médias de 14,9 / 4,5 e 15,7 / 5,1 (PM / pl) que poderiam corresponder à proteína SubH2Bv. Entre a faixa de peso molecular de 14 a 18 kDa, foram encontrados bandas protéicas e *spots* proeminentes com pl médio de 4,4 a 4,7 em ambas as amostras, os quais podem estar relacionados às histonas de núcleo somático.

Em 2008, Mountjoy et al. identificaram a proteína de 24-25 kDa, previamente descrita entre as seis bandas protéicas proeminentes da matriz perinuclear de bovinos (OKO e MARAVEI, 1994), como a proteína RAB2A. Essa proteína, ligadora da GTP e pertencente a um subgrupo da superfamília Ras, provavelmente, está envolvida nas vias de fusão e transporte de vesículas (PEREIRA-LEAL e SEABRA, 2001). No presente estudo, foram encontrados uma banda protéica proeminente, de 24,8 kDa, e três *spots*, de 23,8 / 4,4, 25,5 / 5,7 e 25,6 / 6,8 (PM / pl), próximos ao descrito para a RAB2A.

Na tentativa de identificar o fator indutor da ativação oocitária, a proteína PT32, pertencente à matriz perinuclear, foi proposta como possível candidata (SUTOVSKY et al., 2001; 2002). Nas amostras de proteínas da matriz perinuclear avaliadas neste experimento, foram encontrados uma banda protéica de 31,6 kDa e um *spot* com 32,5 kDa e pl 5,7. Contudo, baseado em estudos já realizados em outras espécies, ainda não foi confirmada a real participação da proteína PT32 no desencadeamento da ativação dos oócitos.

A respeito das proteínas espermáticas provenientes do citosol, não existem relatos que descrevam o seu perfil protéico nos espermatozóides de mamíferos. É necessário salientar que, enquanto as proteínas que compõem a matriz perinuclear, acrossomo, membranas plasmáticas e acrossomais são extensivamente estudadas, devido a sua importância nas etapas de maturação espermática, fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (EDDY, 2006), as proteínas do citosol só ganharam destaque após o achado de que esta região do espermatozóide, provavelmente, contém o fator espermático responsável pela ativação oocitária (SWANN, 1990). Desta forma, os estudos sobre a composição do citosol espermático concentraram-se na identificação de uma possível candidata a fator espermático da ativação oocitária.

Neste estudo, foi possível observar uma maior quantidade de proteína total, bandas protéicas e *spots* nas amostras provenientes do citosol quando comparadas às amostras da matriz perinuclear. Entretanto, é essencial destacar que, para o processo de extração das proteínas do citosol, são utilizados espermatozóides que ainda apresentam o acrossomo. Desta forma, as proteínas solúveis que foram recuperadas podem fazer parte tanto da porção do citosol quanto do acrossomo. Esse fato soma-se as demais dificuldades em se estudar somente as proteínas que compõem o citosol. Assim, o protocolo utilizado neste estudo, para a extração das proteínas do citosol, visa especialmente recuperar o fator espermático protéico da ativação oocitária e não necessariamente a identificação das proteínas dessa região do espermatozóide.

A proteína *oscillin* (33 a 35 kDa), primeira candidata a fator espermático desencadeador da ativação oocitária, já foi identificada em extratos espermáticos do citosol de humanos, camundongos e suínos (PARRINGTON

et al., 1996; SWANN e LAI, 1997; WU et al., 1998). Para os gatos domésticos, nas amostras do extrato espermático do citosol deste estudo, foram localizados uma banda protéica proeminente de 34,4 kDa e dois *spots* com PM / pI médios de 33,0 / 5,6 e 33,8 / 4,8, os quais podem corresponder à proteína *oscillin*.

Atualmente, existem fortes evidências de que a proteína PLC ζ é a verdadeiro fator de ativação do oócito (SWANN et al., 2006). Essa proteína já foi localizada em extratos espermáticos do citosol de hamster, camundongo, suíno, equino e humano (SAUNDERS et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2004; KUROKAWA et al., 2005, GRADIL et al., 2006, GRASA et al., 2008) e nos extratos da matriz perinuclear de camundongo e suíno (FUJIMOTO et al., 2004; KUROKAWA et al., 2005). Adicionalmente, estudos do genoma identificaram homólogos da proteína PLC ζ em oito espécies de mamíferos; homem, macaco, camundongo, rato, touro, cachoço, cão e chimpanzé. Esses homólogos apresentaram peso molecular de 70 a 75 kDa e grande variação no ponto isoelétrico, de 5,29 em ratos a 9,14 em humanos (SWANN et al., 2006).

Neste estudo, nos extratos espermáticos do citosol dos gatos domésticos foram localizadas quatro bandas protéicas com peso molecular de 60 a 80 kDa, incluindo duas bandas com média de $69,1 \pm 0,33$ e $72,5 \pm 0,71$ kDa. Na técnica de eletroforese bidimensional foram observados 16 *spots* na faixa de 60 a 80 kDa. Cada um desses *spots* foi localizado na maioria das amostras, sendo sempre uma ao menos pertencente a gatos normospermicos e teratospérmicos. Os *spots* com peso molecular médio mais próximo ao descrito para a PLC ζ foram: 69,3 / 6,2, 69,4 / 6,0, 70,2 / 5,5, 70,7 / 6,6 e 74,6 / 5,6 (PM / pI).

Por sua vez, em ambas as amostras do extrato espermático da matriz perinuclear não foi encontrada banda protéica na faixa de 60 a 80 kDa, fato que pode estar relacionado à baixa quantidade de proteína presente nesse intervalo de peso molecular. Em contrapartida, na eletroforese bidimensional foram localizados 4 *spots* na faixa de 60 a 80 kDa, incluindo dois *spots* com médias mais próximas à PLC ζ : 70,0 / 5,6 e 77,8 / 6,1 (PM / pI).

Comparando os valores de PM e pI dos *spots* mais próximos à PLC ζ , dois *spots* do citosol (69,4 / 6,0 e 70,2 / 5,5) apresentaram grande proximidade a um *spot* da matriz perinuclear (70,0 / 5,6). A quantidade média de proteína

nesses *spots* foi de 0,45 µg para a matriz perinuclear e de 0,82 e 0,83 µg para o citosol. Considerando o total de proteína recuperada por espermatozóide utilizado é possível estimar a quantidade da proteína de cada *spot* que está presente em um único espermatozóide. A quantidade média de proteína por espermatozóide foi de 0,25 fg (0,27 fg normospérmicos e 0,22 fg teratospérmicos) para o *spot* da matriz perinuclear e de 1,46 fg (1,46 fg normospérmico e 1,45 fg teratospérmico) para o *spot* 69,4 / 6,0 e de 1,48 fg (1,45 fg normospérmicos e 1,61 fg teratospérmico) para o *spot* 70,2 / 5,5, ambos presentes nas amostras do citosol. Devido ao baixo número de animais e de repetição dos géis, é difícil concluir se há ou não diferença na quantidade de proteína por espermatozóide entre os animais normospérmicos e teratospérmicos. Contudo, é possível afirmar que os extratos da matriz perinuclear apresentaram 7,3 vezes menos proteína por espermatozóide em relação aos extratos do citosol.

A quantidade de proteína por espermatozóide das possíveis candidatas à PLCζ observadas neste estudo é inferior ao encontrado em extratos espermáticos do citosol de camundongo após quantificação por anticorpos, 20 a 50 fg e 40 a 50 fg de PLCζ (SAUNDERS et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2004). De acordo com Swann et al. (2006), o fato da PLCζ apresentar diferentes quantidades e potência entre as espécies pode indicar a existência de um ajuste preciso dentro de cada espécie da dose eficaz de PLCζ, contida em um único espermatozóide, ao tamanho e sensibilidade do oócito receptor.

Considerando que esses *spots* correspondem à PLCζ, pode-se concluir que esta proteína está distribuída em ambas as porções do espermatozóide dos gatos domésticos, porém em diferentes quantidades. É importante destacar que quanto maior a quantidade de proteína presente na porção do citosol, maior a sua solubilidade. Adicionalmente, diferenças na quantidade e solubilidade da PLCζ foram relatadas entre as espécies de mamíferos estudadas até o momento (SWANN et al., 1996).

Não obstante, apesar de localizados bandas e *spots* de peso molecular próximo ao descrito para a PLCζ, não é possível afirmar se esta proteína está realmente presente nos extratos espermáticos do citosol e matriz perinuclear dos gatos domésticos. Para isso, seriam necessários métodos mais precisos

de identificação, como as técnicas de *Western Blot* e imunolocalização, as quais se baseiam na utilização de anticorpos. Entretanto, pelo fato da PLC ζ ter sido identificada apenas recentemente, não há anticorpos comercialmente disponíveis contra essa proteína. Adicionalmente, os anticorpos contra a PLC ζ de camundongo (número de acesso NP_473407; SAUNDERS et al., 2002) e suíno (número de acesso BAC78817; KUROKAWA et al., 2005), produzidos exclusivamente em experimentos, poderiam não ser capazes de localizar a PLC ζ em gatos, uma vez que falhas na ligação desses anticorpos à PLC ζ de outras espécies já foram relatadas (KUROKAWA et al., 2005; GRADIL et al., 2006).

Recentemente, estudos destinados a identificação e quantificação da proteína PLC ζ têm demonstrado a importância dessa proteína na determinação da fertilidade dos animais. Em eqüinos, animais classificados como sub-férteis apresentaram menor quantidade de PLC ζ quando comparados aos animais férteis (GRADIL et al., 2006). Em adição, estudos em homens inférteis, que falham durante o procedimento de ICSI, demonstraram que esses pacientes não apenas apresentam espermatozóides com menor quantidade de PLC ζ (YOON et al., 2008), mas também expressam uma maior quantidade de formas anormais desta proteína (HEYTENS et al., 2009).

Nesse contexto, a utilização da PLC ζ , proveniente dos extratos espermáticos ou de RNAm, tem produzido bons resultados nos procedimentos de ICSI (BEDFORT et al., 2003; YOON et al., 2008). Não menos importante, estudos envolvendo a transferência nuclear têm demonstrado que o uso da ativação semelhante à fertilização pode melhorar alguns aspectos da reprogramação nuclear (KNOTT et al., 2002; ROSS et al., 2009). Desta forma, o estudo da PLC ζ em gatos domésticos não apenas poderá indicar a deficiência desta proteína em animais sub-férteis e inférteis, mas também trazer benefícios com a utilização dos extratos espermáticos, ou da própria proteína, nos procedimentos de ICSI e transferência nuclear em programas de reprodução assistida destinados à conservação das espécies de felídeos selvagens.

Conclusão

CONCLUSÃO

Nos extratos espermáticos do citosol e matriz perinuclear de gatos domésticos normospermicos e teratospermicos foram localizadas proteínas apresentando peso molecular semelhante ao previamente descrito para a proteína PLC ζ em outras espécies de mamíferos.

Em adição, podemos concluir que:

- Os protocolos utilizados neste estudo foram eficientes para a extração das proteínas do citosol e matriz perinuclear dos espermatozoides de gatos domésticos, com maior quantidade de proteína recuperada nas amostras provenientes do citosol.
- O perfil protéico entre as amostras do citosol e matriz perinuclear foi diferente em ambas as técnicas de eletroforese, enquanto que a distribuição das proteínas e porcentagem de equivalência não foram diferentes entre os animais normospermicos e teratospermicos.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

ABASSI, Y.A.; CARROLL, D.J.; GIUSTI, A.F.; BELTON, R.J.; FOLTZ, K.R. Evidence that Src-type tyrosine kinase activity is necessary for initiation of Ca²⁺ release at fertilization in sea urchin eggs. *Dev. Biol.*, v.218, p.206–219, 2000.

ALBERIO, R.; ZAKHARTCHENKO, V.; MOTLIK, J.; WOLF, E. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.*, v.45, p.797-809, 2001.

AUL, R.B.; OKO, R.J. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev. Biol.*, v.242, p.376-387, 2002.

AYABE, T.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R.M. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose in uninseminated and inseminated eggs. *Development*, v.121, p.2233–2244, 1995.

BEDFORT, S.J.; KUROKAWA, M.; HINNRICHS, K.; FISSORE, R.A. Intracellular calcium oscillations and activation in horse oocytes injected with stallion sperm extracts or spermatozoa. *Reproduction*, v.126, p.489-499, 2003.

CAMPBELL, K.D.; REED, W.A.; WHITE, K.L. Ability of integrins to mediate fertilisation, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1702-1709, 2000.

CHANG, T.S.K.; ZIRKIN, B.R. Proteolytic degradation of protamina during thiol-induced nuclear decondensation in rabbit spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, v.204, p.283-289, 2005.

CHO, C.; O'DELL BRUNCH, D.; FAURE, J.E.; GOULDING, E.H.; EDDY, E.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. Fertilisation defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science*, v.281, p.1857-1859, 1998.

CHOI, D.; LEE, E.; HWANG, S.; JUN, K.; KIM, D.; YOON, B.K.; SHIN, H.S.; LEE, J.H. The biological significance of phospholipase C β 1 gene mutation in mouse sperm in the acrosome reaction, fertilization, and embryo development. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.18, p.305–310, 2001.

CIAPA, B.; CHIRI, S. Egg activation: Upstream of the fertilization calcium signal. *Biol. Cell*, v.92, p.215-233, 2000.

COMIZZOLI, P.; WILD, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology*, v. 66, p.1659-1663, 2006.

COX, L.J.; LARMAN, M.G.; SAUNDERS, C.M.; HASHIMOTO, K.; SWANN, K.; LAI, F.A. Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca^{2+} oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction*, v.124, p.611–623, 2002.

CRAN, D.G.; MOOR, R.M.; IRVINE, R.F. Initiation of the cortical reaction in hamster and sheep oocytes in response to inositol trisphosphate. *J. Cell. Sci.*, v.91, p.139–144, 1988.

CROSSLEY, I.; WHALLEY, T.; WHITAKER, M. Guanosine 5'-thiotriphosphate may stimulate phosphoinositide messenger production in sea urchin eggs by a different route than the fertilization sperm. *Cell. Regul.*, v.2, p.121–133, 1991.

CUMMINS, J.M.; WOODALL, P.F. On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.*, v.75, p.153-175, 1985.

DALE, B.; DEFELICE, L.J.; EHRENSTEIN, G. Injection of a soluble sperm fraction into sea urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia*, v.41, p.1068-1070, 1985.

DEGUCCHI, R.; SHIRAKAWA, H.; ODA, S.; MOHRI, T.; MIYAZAKI, S. Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. *Dev. Biol.*, v.218, p.299-313, 2000.

DE JONGE, C.; BARRATT, C. The sperm cell: production, maturation, fertilization, degeneration. 1.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 372p.

DONOGHUE, A.M.; HOWARD, J.G.; BYERS, A.P.; GOODROWE, K.L.; BUSH, M.; BLUMER, E.; LUCAS, J.; STOVER, J.; SNODGRASS, K.; WILDT, D.E. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod.*, v.46, p.1047-1056, 1992.

DUCIBELLA, T.; HUNEAU, D.; AGELICHIO, E.; XU, Z.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S.; FISSORE, R.A.; MADOUX, S.; OZIL, J.P. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev. Biol.*, v.250, p.280-291, 2002.

DUPONT, G.; MCGUINNESS, O.M.; JOHNSON, M.H.; BERRIDGE, M.J.; BORGESE, F. Phospholipase C in mouse oocytes; characterization of β and gamma isoforms and their possible involvement in sperm-induced Ca^{2+} spiking. *Biochem. J.*, v.316, p.583-591, 1996.

EDDY, E.M. The spermatozoon. In: NEILL, J.D. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3.ed. London: Elsevier Academic Press, 2006. v.1, p.3-54.

FISSORE, R.A.; ROBL, J.M. Mechanism of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. *Dev. Biol.*, v.166, p.634-642, 1994.

FISSORE, R.A.; DOBRINSKY, J.R.; BALISE, J.J.; DUBY, R.T.; ROBL, J.M. Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol. Reprod.*, v.47, p.960–969, 1992.

FUJIKI, Y.; HUBBARD, A.L.; FOWLER, S.; LAZAROW, P.B. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, v.93, p.97-102, 1982.

FUJIMOTO, S.; YOSHIDA, N.; FUKUI, T.; AMANAI, M.; ISOBE, T.; ITAGAKI, C.; IZUMI, T.; PERRY, A.C.F. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev. Biol.*, v.274, p.370–383, 2004.

FUKAMI K, NAKAO K, INOUE T, KATAOKA Y, KUROKAWA M, FISSORE RA, NAKAMURA, K.; KATSUKI, M.; MIKOSHIBA, K.; YOSHIDA, N.; TAKENAWA, T. Requirement of phospholipase C δ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science*, v.292, p.920–923, 2001.

GALIONE, A.; JONES, K.T.; LAI, F.A.; SWANN, K. A cytosolic sperm protein factor mobilizes Ca^{2+} from intracellular stores by activating multiple Ca^{2+} release mechanisms independently of low molecular weight messengers. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.28901–28905, 1997.

GÓMEZ, M.C.; POPE, C.E.; HARRIS, R.F.; DAVIS, A.; MIKOTA, S.; DRESSER, B.L. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.12, p.423-433, 2000.

GOODROWE, K.L.; MILLER, A.M.; WILDT, D.E. In vitro fertilization of gonadotrophin-stimulated Leopard Cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. *J. Exp. Zool.*, v.252, p.89-95, 1989.

GORDO, A.C.; WU, H.; HE, C.L.; FISSORE, R.A. Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and oocyte age. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1370-1379, 2000.

GRADIL, C.; YOON, S.Y.; BROWN, J.; HE, C.; VISCONTI, P.; FISSORE, R. PLC ζ : a marker of fertility for stallions? *Anim. Reprod. Sci.*, v.94, p.23-25, 2006.

GRASA, P.; COWARD, K.; YOUNG, C.; PARRINGTON, J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.23, p.2513-2522, 2008.

HALET, G.; TUNWELL, R.; PARKINSON, S.J.; CARROLL, J. Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca^{2+} oscillations at fertilization in mouse eggs. *J. Cell. Biol.*, v.164, p.1033-1044, 2004.

HEID, H.; FIGGE, U.; WINTER, S.; KUHN, C.; ZIMBELMANN, R.; FRANKE, W. Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp. Cell Res.*, v.279, p.177-187, 2002.

HESS, H.; HEID, H.; FRANKE, W.W. Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, v.122, p.1043-1052, 1993.

HESS, H.; HEID, H.; ZIMBELMANN, R.; FRANKE, W.W. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cylicin II. *Exp. Cell Res.*, v.218, p.174-182, 1995.

HEYTENS, E.; PARRINGTON, J.; COWARD, K.; YOUNG, C.; LAMBRECHT, S.; YOON, S.Y.; FISSORE, R.A.; HAMER, R.; DEANE, C.M.; RUAS, M.; GRASA, P.; SOLEIMANI, R.; CUVELIER, C.A.; GERRIS, J.; DHONT, M.;

DEFORCE, D.; LEYBAERT, L.; SUTTER, P.D. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.*, doi:10.1093/humrep/dep207, 2009.

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones and improvement of spermatozoal motility and morphology after swimming up processing. *J. Androl.*, v.11, p.204-215, 1990.

HUD, N.V.; MILANOVICH, F.P.; BALHORN, R. Evidence of novel secondary structure in DNA-Bound protamine is revealed by raman spectroscopy. *Biochemistry*, v.33, p.7528-7535, 1994.

HYSLOP, L.A.; CARROLL, M.; NIXON, V.L.; McDOUGALL, A.; JONES, K.J. Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilisation. *Dev. Biol.*, v.234, p.216-230, 2001.

HYSLOP, L.A.; NIXON, V.L.; LEVASSEUR, M.; CHAPMAN, F.; CHIBA, K.; MCDUGALL, A.; VENABLES, J.P.; ELLIOTT, D.J.; JONES, K.T. Ca²⁺ promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Dev. Biol.*, v.269, p.206–219, 2004.

ITO, M.; SHIKANO, T.; ODA, S.; HORIGUCHI, T.; TANIMOTO, S.; AWAJI, T.; MITANI, H.; MIYAZAKI, S. Difference in Ca²⁺ oscillation-inducing activity and nuclear translocation ability of PLC ζ 1, an egg-activating sperm factor candidate, between mouse, rat, human, and medaka fish. *Biol. Reprod.*, v.78, p.1081-1090, 2008.

JAFFE, L. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev. Biol.*, v.99, p.256-276, 1983.

JONES, K.T. Ca^{2+} oscillations in the activation of the egg and development of the embryo in mammals. *Int. J. Dev. Biol.*, v.42, p.1–10, 1998.

JONES, K.T.; SOELLER, C.; CANNELL, M. The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development*, v.125, p.4627-4635, 1998a.

JONES, K.T.; CRUTTWELL, C.; PARRINGTON, J.; SWANN, K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett.*, v.437, p.297–300, 1998b.

JONES, K.T.; MATSUDA, M.; PARRINGTON, J.; KATAN, M.; SWANN K. Different Ca^{2+} release abilities of sperm extracts compared with tissue extract and PLC isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem. J.*, v.346, p.743–749, 2000.

KAJI, K.; ODA, S.; SHIKANO, T.; OHNUKI, T.; UEMATSU, Y.; SAKAGAMI, J.; TADA, N.; MIYAZAKI, S.; KUDO, A. The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat. Genet.*, v.24, p.279–282, 2000.

KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, v.52, p.709–720, 1995.

KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R.; KURETAKE, S.; BORTKIEWICZ, H.; PERRY, A.C.; YANAGIMACHI, H. Analysis of mouse oocytes activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.*, v.58, p.1407–1415, 1998.

KLINE, D.; KLINE, J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.*, v.149, p.80–89, 1992.

KLINE, D.; SIMONCINI, L.; MANDEL, G.; MAUE, R.A.; KADO, R.T.; JAFFE, L.A. Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in *Xenopus* eggs. *Science*, v.241, p.464-467, 1988.

KNOTT, J.G.; POOTHAPILLAI, K.; WU, H.; HE, C.L.; FISSORE, R.A. Porcine sperm factor supports activation and development of bovine nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.*, v.66, p.1095-1103, 2002.

KNOTT, J.G.; KUROKAWA, M.; FISSORE, R.A.; SCHULTZ, R.M.; WILLIAMS, C.J. Transgenic RNAi reveals role for mouse sperm phospholipase C ζ in triggering Ca²⁺ oscillations during fertilization. *Biol. Reprod.*, v.72, p.992–996, 2005.

KOUCHI, Z.; FUKAMI, K.; SHIKANO, T.; ODA, S.; NAKAMURA, Y.; TAKENAWA, T.; MIYAZAKI, S. Recombinant phospholipase C zeta has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *J. Biol. Chem.*, v.279, p.10408–10412, 2004.

KUO, R.C.; BAXTER, G.T.; THOMPSON, S.H.; PATTON, C.; BONAVENTURA, J.; EPEL, D. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilisation. *Nature*, v.406, p.633-636, 2000.

KURETAKE, S.; KIMURA, Y.; HOSHI, K.; YANAGIMACHI, R. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.*, v.55, p.789-795, 1996.

KUROKAWA, M.; FISSORE, R.A. ICSI-generated mouse zygotes exhibit altered calcium oscillations, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 down-regulation, and embryo development. *Mol. Hum. Reprod.*, v.9, p.523-533, 2003.

KUROKAWA, M.; SATO, K.; SMYTH, J.; WU, H.; FUKAMI, K.; TAKENAWA, T.; FISSORE, R.A. Evidence that activation of Src family kinase is not required for

fertilization associated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse eggs. *Reproduction*, v.127, p.441–454, 2004.

KUROKAWA, M.; SATO, K.; WU, H.; HE, C.; MALCUIT, C.; BLACK, S.J.; FUKAMI, K.; FISSORE, R.A. Functional, biochemical and chromatographic characterization of the complete $[Ca^{2+}]_i$ oscillation-inducing activity of porcine sperm. *Dev. Biol.*, v.285, p.376–392, 2005.

LARMAN, M.G.; SAUNDERS, C.M.; CARROLL, J.; LAI, F.A.; SWANN, K. Cell cycle-dependent Ca^{2+} oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLC ζ . *J. Cell. Sci.*, v.117, p.2513–2521, 2004.

LAWRENCE, Y.; WHITAKER, M.; SWANN, K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development*, v.124, p.233–241, 1997.

LECUYER, C.; DACHEUX, J.L.; HERMAND, E.; MAZEMAN, E.; ROUSSEAUX, J.; ROUSSEAUX-PREVOST, R. Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1801-1810, 2000.

LEE, W.K.; KIM, J.K.; SEO, M.S.; CHA, J.H.; LEE, K.J.; RHA, H.K.; MIN, D.S.; JO, Y.H.; LEE, K.H. Molecular cloning and expression analysis of a mouse phospholipase C- δ 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.261, p.393–399, 1999.

LONGO, F.J.; KROHNE, G.; FRANKE, W.W. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell Biol.*, v.105, p.1105-1120, 1987.

LUDWIG, M. Impact of intracytoplasmic sperm injection on the activation and fertilization process of oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, v.3, p.230-240, 2001.

MACHÁTY, Z.; PRATHER, R. Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.599-613, 1998.

MACHÁTY, Z.; MAYES, M.A.; PRATHER, R.S. Parthenogenetic activation of porcine oocytes with guanosine-5'-O-(3'-thiotriphosphate). *Biol. Reprod.*, v.52, p.753-758, 1995.

MACHÁTY, Z.; MAYES, M.A.; KOVACS, L.G.; BALATTI, P.A.; KIM, J.H.; PRATHER, R.S. Activation of porcine oocytes via an exogenously introduced rat muscarinic M1 receptor. *Biol. Reprod.*, v.57, p.85-91, 1997.

MEHLMANN, L.M.; CARPENTER, G.; RHEE, S.G.; JAFFE, L.A. SH2 domain-mediated activation of phospholipase C gamma is not required to initiate Ca²⁺ release at fertilization of mouse eggs. *Dev. Biol.*, v.203, p.221–232, 1998.

MEHLMANN, L.M.; CHATTOPADHYAY, A.; CARPENTER, G.; JAFFE, L.A. Evidence that phospholipase C from the sperm is not responsible for initiating Ca²⁺ release at fertilization in mouse eggs. *Dev. Biol.*, v.236, p.492–501, 2001.

MELLEN, J.D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp.): a multiple regression analysis. *Zoo. Biol.*, v.10, p.95-110, 1991.

MILLER, A.M.; ROELKE, M.E.; GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.*, v.88, p.249-258, 1990.

MIYAZAKI, S. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell Biol.*, v.106, p.345–353, 1988.

MIYAZAKI, S. Thirty years of calcium signals at fertilization. *Seminars Cell Dev. Biol.*, v.17, p.233-243, 2006.

MIYAZAKI, S.; HASHIMOTO, N.; YOSHIMOTO, Y.; KISHIMOTO, T.; IGUSA, Y.; HIRAMOTO, Y. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilisation of golden hamster eggs. *Dev. Biol.*, v.118, p.259-267, 1986.

MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKADA, K.; HONDA, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.*, v.158, p.62–78, 1993.

MOORE, G.D.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R.M. Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Dev. Biol.*, v.159, p.669-678, 1993.

MOUNTJOY, J.R.; XU, W.; MCLEOD, D.; HYNDMAN, D.; OKO, R. RAB2A: A major subacrosomal protein of bovine spermatozoa implicated in acrosomal biogenesis. *Biol. Reprod.*, v.79, p.223-232, 2008.

NAKANO, Y.; SHIRAKAWA, H.; MITSUHASHI, N.; KUWABARA, Y.; MIYAZAKI, S. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol. Hum. Reprod.*, v.3, p.1087-1093, 1997.

NOWELL, K.; JACKSON, P. Status Survey and Conservation Action Plan: Wild Cats. In:____. *IUCN/SSC Cat Specialist Group*. Gland: Suíça, 1996. p.149-179.

ODA, S.; DEGUCHI, R.; MOHRI, T.; SHIKANO, T.; NAKANISHI, S.; MIYAZAKI, S. Spatiotemporal dynamics of the $[\text{Ca}_{2+}]_i$ rise induced by microinjection of sperm extract into mouse eggs: preferential induction of a Ca^{2+} wave from the cortex mediated by the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Dev. Biol.*, v.209, p.172–185, 1999.

OKO, R.; MARAVEI, D. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.50, p.1000-1014, 1994.

OZIL, J.P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, v.109, p.117–127, 1990.

OZIL, J.P.; HUNEAU, D. Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca^{2+} signal regime on development. *Development*, v.128, p.917–928, 2001.

OZIL, J.P.; MARKOULAKI, S.; TOTH, S.; MATSON, S.; BANREZES, B.; KNOTT, J.G.; SCHULTZ, R.M.; HUNEAU, D.; DUCIBELLA, T. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal in the mouse. *Dev. Biol.*, v.282, p.39–54, 2005.

PARRINGTON, J.; SWANN, K.; SHEVCHENKO, V.I.; SESAY, A.K.; LAI, F.A. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, v.379, p.364–368, 1996.

PARRINGTON, J.; BRIND, S.; DE SMEDT, H.; GANGESWARAN, R.; LAI, F.A.; WOJCIKIEWICZ, R.; CARROLL, J. Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse oocytes and early embryos: The type I isoform is upregulated in oocytes and downregulated after fertilization. *Dev. Biol.*, v.203, 451–461, 1998.

PENFOLD, L.; JOST, L.; EVENSON, D.P.; WILDT, D.E. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, v.69, p.1730-1735, 2003.

PEREIRA-LEAL, J.B.; SEABRA, M.C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.*, v.313, p.889-901, 2001.

PERRY, A.C.F.; WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol. Reprod.*, v.60, p.747-755, 1999.

PERRY, A.C.F.; WAKAYAMA, T.; COOKE, I.M.; YANAGIMACHI, R. Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev. Biol.*, v.217, p.386–393, 2000.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J. Zoo Wildlife Med.*, v.22, p.87-95, 1991.

POPE, C.E.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, in vitro development cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.47, p.189-201, 1993.

POPE, C.E.; JOHNSON, C.A.; McRAE, M.A.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cats oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.53, 221-236, 1998.

PRIETO, M.C.; MAKI, A.H.; BALHORN, R. Analysis of DNA–protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. *Biochemistry*, v.36, p.11944-11951, 1997.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.57, p.423-433, 2001.

RHEE, S.G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase. *C. Annu. Rev. Biochem.*, v.70, p.281–312, 2001.

ROGERS, N.T.; HOBSON, E.; PICKERING, S.; LAI, F.A.; BRAUDE, P.; SWANN, K. PLC ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*, v.128, p.697–702, 2004.

ROSS, P.J.; RODRIGUEZ, R.M.; IAGER, A.E.; BEYHAN, Z.; WANG, K.; RAGINA, N.P.; YOON, S.Y.; FISSORE, R.A.; CIBELLI, J.B. Activation of bovine somatic cell nuclear transfer embryos by PLCZ cRNA injection. *Reproduction*, v.137, p.427–437, 2009.

RUNFT, L.L.; JAFFE, L.A.; MEHLMANN, L.M. Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev. Biol.*, v.245, p.237–254, 2002.

RUNFT, L.L.; CARROLL, D.J.; GILLETT, J.; GIUSTI, A.F.; O'NEILL, F.J.; FOLTZ, K.R. Identification of a starfish egg PLC-gamma that regulates Ca²⁺ release at fertilization. *Dev. Biol.*, v.269, p.220–236, 2004.

SAUNDERS, C.M.; LARMAN, M.G.; PARRINGTON, J.; COX, L.J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L.M.; SWANN, K.; LAI, F.A. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, v.129, p.3533–3544, 2002.

SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v.30, p.21–62, 1995.

SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HOFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. *Eur. J. Biochem.*, v.269, p.1333–1355, 2002.

SETTE, C.; BEVILACQUA, A.; BIANCHINI, A.; MANGIA, F.; GEREMIA, R.; ROSSI, P. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development*, v.124, p.2267–2274, 1997.

SHEVCHENKO, V.; HOGBEN, M.; EKONG, R.; PARRINGTON, J.; LAI, F.A. The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organisation and chromosomal localization. *Gene*, v.216, p.31-38, 1998.

SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J. LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, v.415, p.859, 2002.

STRICKER, S.A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.*, v.211, p.157–176, 1999.

SUTOVSKY, P.; OKO, R.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Biol.*, v.188, p.75-84, 1997.

SUTOVSKY, P.; WU, A.; TAKAHASHI, D.; BENMUSA, A.; SCHATTEN, G.; DOMINKO, T.; OKO, R. Oocyte activation by mammalian sperm perinuclear theca proteins PT32 and tyrosine kinase c-Yes. *Mol. Biol. Cell (Suppl)*, v.12, p.114a, 2001.

SUTOVSKY, P.; WU, A.; PARK, K.W.; PRATHER, R.S.; CARTER, D.B.; TAKAHASHI, D.; DOMINKO, T.; SUTOVSKY, M., OKO, R. PT32: Sperm perinuclear theca protein with properties of the sperm-borne, oocyte activating factor. *Biol. Reprod. (Suppl)*, v.66, p.275, 2002.

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G.; WU, A.; OKO, R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc. Res. Techniq.*, v.61, p.362-378, 2003.

SWANN, K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increase and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, v.110, p.1295–1302, 1990.

SWANN, K.; OZIL, J.P. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.*, v.152, p.183–222, 1994.

SWANN, K.; LAI, F.A. A novel signaling mechanism for generating Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals. *BioEssays*, v.19, p.371-378, 1997.

SWANN, K.; SAUNDERS, C.M.; ROGERS, N.T. LAI, F.A. PLC ζ (zeta): A sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v.17, p.264–273, 2006.

SZCZYGIEL, M.A.; WARD, W.S. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1532-1537, 2002.

TATENO, H.; KAMIGUCHI, Y. Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. *Zygote*, v.7, p.321–327, 1999.

TESARIK, J.; SOUSA, M.; TESTART, J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, v.9, p.511-518, 1994.

TOVICH, P.R.; OKO, R.J. Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.32431-32438, 2003.

VILLAVERDE, A. I. S. B.; MELO, C. M.; MARTIN, I.; FERREIRA, T. H.; PAPA, F. O.; TACONELI, C. A.; LOPES, M. D. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Anim. Reprod. Sci.*, v.114, p.434 - 442, 2009.

VON BULOW, M.; HEID, H.; HESS, H.; FRANKE, W.W. Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Exp. Cell Res.*, v.219, p.407-413, 1995.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.G.; O'BRIEN, S.J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDES, H.; BRAND, D.J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol. Reprod.*, v.29, p.1019-1025, 1983.

WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology – or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, v.37, p.161-184, 1992.

WILLIAMS, C.J.; MEHLMANN, L.M.; JAFFE, L.A.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R.M. Evidence that Gq family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev. Biol.*, v.198, p.116–127, 1998.

WU, H.; HE, C.L.; FISSORE, R.A. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol. Hum. Reprod.*, v.46, p.176-189, 1997.

WU, H.; HE, C.L.; JEHN, B.; BLACK, S.J.; FISSORE, R.A. Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev. Biol.*, v.203, p.369–381, 1998.

WU, A.; SUTOVSKY, P.; DOMINKO, T.; SCHATTEN, G.; GONG, J.; OKO, R. PT32, a candidate for a sperm borne-egg activating factor. *J. Androl. Suppl.*, v.22, p.95, 2001.

XU, Z.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R.M. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} release in early and late events of mouse egg activation. *Development*, v.120, p.1851–1859, 1994.

YODA, A.; ODA, S.; SHIKANO, T.; KOUCHI, Z.; AWAJI, T.; SHIRAKAWA, H.; KINOSHITA, K.; MIYAZAKI, S. Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev. Biol.*, v.268, p.245–257, 2004.

YOON, S.Y.; FISSORE, R.A. Release of phospholipase C ζ and $[Ca^{2+}]_i$ oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction*, v.134, p.695-704, 2007.

YOON, S.Y.; JELLERETTE, T.; SALICIONI, A.M.; LEE, h.C.; YOO, M.S.; COWARD, K.; PARRINGTON, J.; GROW, D.; CIBELLI, J.B.; VISCONTI, P.E.; MAGER, J.; FISSORE, F.A. Human sperm devoid of PLC zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.*, v.118, p.3671-3681, 2008.

YU, C.; WHITE, K.L.; REED, W.A.; BUNCH, T.D. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development*, v.121, p.2645–2654, 1995.

Trabalho publicado na revista **Reproduction in Domestic Animal**

Effect of Progesterone and Ionomycin on Domestic Cat Sperm Motility Patterns and Acrosome Reaction

AISB Villaverde, EG Fioratti, FC Landim-Alvarenga, JC de Carvalho Balieiro, CM Melo, FO Papa and MD Lopes

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, College of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, Brazil

Contents

This study was aimed at assessing the changes in sperm motion patterns and the percentage of acrosome reaction (AR) in domestic cat semen after treatment with either ionomycin or progesterone (P_4). Ten ejaculates were collected from five tomcats using an artificial vagina, and were diluted, centrifuged and resuspended in a capacitation medium. Samples were evaluated and divided into seven equal aliquots and, after 2 h at 25°C, were incubated for 30 min at 38°C in 5% CO₂ and then analyzed. Computer-assisted sperm analysis and a combination of three fluorescent probes were used to assess sperm plasma, acrosomal membrane integrity and mitochondrial transmembrane potential. Thirty minutes after the start of incubation, P_4 was added (10 µg/ml) to the P1 group. Groups P2 and P3 were supplemented with P_4 (10 and 20 µg/ml, respectively) only after 2 h of incubation, and groups I1 and I2 were supplemented with ionomycin (4 and 8 µM, respectively) 2 h after incubation. Group E was supplemented with ethanol (0.6%) at 2 h after incubation and group C received no supplementation. Ionomycin and P_4 treatments led to a hyperactivation-like sperm motion and an increase ($p < 0.05$) in the percentage of AR. Although a higher ($p < 0.05$) percentage of AR was obtained in group I2 when compared with all P_4 groups, a decrease ($p < 0.05$) in total and progressive motility was observed in I2 group. As I1 group was similar to I2 to induce AR without diminishing sperm motility, we can conclude that ionomycin at 4 µM seems to be more suitable to trigger AR in domestic cat sperm.

Introduction

Sperm capacitation, which involves changes in motility patterns and subsequent acrosome reaction (AR), is an essential process for fertilization success (Yanagimachi 1994). Using computer-assisted sperm analysis (CASA), the changes in sperm motion because of the process of capacitation, also known as hyperactivation, can be assessed in a sperm population. Hyperactivation is mainly characterized by alterations in sperm linearity, velocity and head displacement (Kay and Robertson 1998).

Capacitation of domestic cat sperm appears different to other species (Rota et al. 1999; Cancel et al. 2000; Ramió et al. 2008), including the ability to capacitate at room temperature with shorter *in vitro* incubation periods (2–2.5 h) and there is also a very low spontaneous acrosomal loss *in vitro* (Long et al. 1996). These species-specificities emphasize the need to study each species individually.

Further studies on domestic cat sperm would increase our knowledge about: *in vitro* manipulation of sperm function, which is important for the successful application of assisted reproduction techniques; teratospermia that compromises sperm *in vitro* capacitation (Long

et al. 1996) and is a very important sperm alteration in wild felines (Howard et al. 1984); and the changes which occur during cold-storage, once they lead to a reduction in the physiological AR (Rossato et al. 2000; Cheng et al. 2005).

The purpose of this study was to evaluate the changes in sperm motion and AR of capacitated domestic cat sperm exposed to either ionomycin or progesterone (P_4).

Materials and Methods

Animals

Five adult mixed-breed male cats, 2–6 years old, and previously classified as normospermic, were used as semen donors. Animals were kept in rooms measuring 5 m × 2 m and exposed to more than 12 h of natural daylight per day. Males were provided with dry commercial cat food (FIT 32, Royal Canin, Descalvado, Brazil) and water *ad libitum*.

Semen collection, analysis and processing

Semen was collected twice from five tomcats using an artificial vagina ($n = 10$). Samples were diluted with 1 ml of a capacitation medium (CM; 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 1.1 mM KH₂PO₄, 1.1 mM MgSO₄, 6 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM cysteine, 1 mM pyruvate, 1 mM glutamine, 25 mM lactate, 20 mM Hepes and 0.6% BSA, in distilled water; pH 7.4 and 310 mOsm; all chemicals from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged at 300 × *g* for 10 min. Supernatant was discarded and the pellet resuspended with CM to a final concentration of 20 × 10⁶ sperm/ml. Sperm samples were analyzed, divided into seven equal aliquots and incubated at room temperature (25°C) for 2 h.

In group P1, P_4 (P0130; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was added to a final concentration of 10 µg/ml after 30 min of incubation at 25°C and then incubated for an additional 90 min. After the incubation for 2 h at 25°C, groups P2 and P3 were supplemented with P_4 (10 and 20 µg/ml, respectively), groups I1 and I2 with ionomycin (I0634; Sigma Chemical Co.; 4 and 8 µM, respectively) and group E with ethanol (0.6%). Group C received no supplementation. Both P_4 and ionomycin solutions were freshly prepared by a first dilution in ethanol and, afterwards, in CM. Final concentration of ethanol in the CM did not exceed 0.6% in all P_4 and ionomycin groups.

After the 2-h incubation at 25°C, all samples were incubated for 30 min at 38°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Later, samples were randomly

analyzed. All evaluations consisted of sperm motion, plasma membrane integrity (PMI), acrosomal membrane integrity (AMI) and mitochondrial transmembrane potential (MTP) assessment.

Sperm motion parameters were assessed for at least 800 sperm cells using CASA (HTM – IVOS 12; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) set up for cats (Villaverde et al. in press). Analysis included all progressive, hyperactivated, transitional and non-motile sperm.

A combination of three fluorescent probes was used to evaluate PMI, AMI and MTP. For each sample, an aliquot of 40 μl was incubated with 0.5 μl of iodide propidium (500 $\mu\text{g/ml}$; P-4170; Sigma Chemical Co.) and 1 μl of JC-1 (76.5 μM ; T3168; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 3 min at 37°C and sheltered from light. After incubation, 20 μl of FITC-PSA (55 $\mu\text{g/ml}$; L-0770; Sigma Chemical Co.) was added to the solution. A 10- μl drop was placed between a slide and a cover slip and evaluated using an epifluorescent microscopy. A total of 100 cells were assessed for each sample. Live spermatozoa stained green while dead spermatozoa stained red or were both red and green. Intact acrosomes were not stained, whereas reacted acrosomes stained green over the acrosomal region. Sperms were considered with MTP when at least a red or orange stain was observed in the middle piece, with no connection to its size.

Statistical analysis

Data for all sperm motion parameters, PMI, AMI and MTP were compared before and after incubation and among all groups after incubation using ANOVA and the Tukey test, with $p < 0.05$ taken as significant. Data are expressed as means \pm SD.

Results

Data for sperm quality in control and treatment groups (ionomycin or P₄) are shown in Table 1. Comparing all

the results obtained prior to incubation and the control group (after incubation), there was no statistical difference ($p < 0.05$). For all evaluated parameters, there was no statistical difference ($p < 0.05$) between groups C and E.

Treatment groups (ionomycin and P₄) exhibited an increase ($p < 0.05$) in beat cross frequency (BCF), amplitude of lateral head (ALH) displacement and percentage of reacted acrosome with intact plasma membrane (ACR), a decrease ($p < 0.05$) in linearity (LIN) and straight line velocity (VSL) and no difference ($p < 0.05$) in curvilinear velocity (VCL) compared with the control group. Groups I2 and P3 had lower ($p < 0.05$) values for average path velocity (VAP) when compared with control. Comparing groups I2 and control, lower ($p < 0.05$) values for total motility (MOT), progressive motility (PMOT), straightness and PMI were obtained in the ionomycin-treated group.

Among P₄-treated groups, no statistical difference ($p < 0.05$) was observed for all evaluated parameters. Comparing both groups treated with ionomycin, I2 had lower ($p < 0.05$) values for MOT, PMOT, rapid (VAP > medium VAP cut-off), LIN and AMI than I1. Group I2 exhibited lower ($p < 0.05$) percentage for MOT, PMOT and AMI, and higher ($p < 0.05$) percentage for ACR compared with all P₄ groups.

Discussion

The incubation of fresh domestic cat sperm in capacitation conditions either with ionomycin or P₄ led to hyperactivation-like alterations in sperm motility and the induction of AR. Interestingly, incubation of fresh cat sperm for 2.5 h in CM without stimulants did not induce sperm motion alteration in this study. Conversely, in studies performed with other species, such as dog, boar and rat, incubation in CM without stimulants was sufficient to induce sperm hyperactivation (Rota et al. 1999; Cancel et al. 2000; Ramíó et al. 2008). Because incubated sperm displayed AR when stimulated, we believe that, sperm capacitation had indeed

Table 1. Mean \pm SD values for sperm motion parameters and membranes integrity after treatment of domestic cat sperm with either ionomycin or progesterone at different concentrations and time exposure (n = 10)

	Ionomycin			Progesterone		
	Control	I1 (4 μM ; 30 min)	I2 (8 μM ; 30 min)	P1 (10 $\mu\text{g/ml}$; 2 h)	P2 (10 $\mu\text{g/ml}$; 30 min)	P3 (20 $\mu\text{g/ml}$; 30 min)
MOT (%)	85.2 \pm 5.4 ^a	85.4 \pm 3.7 ^a	68.0 \pm 25.6 ^b	85.7 \pm 7.0 ^a	85.4 \pm 4.9 ^a	84.0 \pm 6.4 ^a
PMOT (%)	64.4 \pm 3.9 ^a	60.1 \pm 6.5 ^a	42.9 \pm 18.6 ^b	60.3 \pm 7.4 ^a	61.1 \pm 5.6 ^a	59.1 \pm 6.3 ^a
VAP ($\mu\text{m/s}$)	185.1 \pm 16.4 ^a	172.1 \pm 11.6 ^{ab}	151.1 \pm 9.2 ^b	161.4 \pm 23.2 ^{ab}	158.2 \pm 19.3 ^{ab}	156.8 \pm 20.4 ^{ab}
VSL ($\mu\text{m/s}$)	165.5 \pm 15.5 ^a	147.4 \pm 12.0 ^{ab}	124.0 \pm 13.1 ^b	138.8 \pm 21.9 ^b	136.9 \pm 19.5 ^b	135.5 \pm 20.3 ^b
VCL ($\mu\text{m/s}$)	232.5 \pm 14.3 ^a	259.2 \pm 24.2 ^a	255.2 \pm 18.9 ^a	258.9 \pm 30.3 ^a	247.1 \pm 27.0 ^a	248.7 \pm 30.9 ^a
ALH (μm)	6.0 \pm 0.5 ^a	7.3 \pm 0.9 ^b	7.6 \pm 0.7 ^b	7.5 \pm 0.6 ^b	7.2 \pm 0.8 ^b	7.2 \pm 0.8 ^b
BCF (Hz)	19.6 \pm 3.2 ^a	27.2 \pm 5.8 ^b	27.8 \pm 3.1 ^b	31.1 \pm 4.9 ^b	29.2 \pm 6.3 ^b	31.0 \pm 6.3 ^b
STR (%)	87.3 \pm 1.6 ^a	84.3 \pm 3.7 ^{ab}	80.8 \pm 4.8 ^b	84.5 \pm 2.6 ^{ab}	84.5 \pm 3.0 ^{ab}	84.6 \pm 3.1 ^{ab}
LIN (%)	70.7 \pm 4.5 ^a	57.8 \pm 5.6 ^b	49.5 \pm 4.4 ^c	54.0 \pm 4.9 ^{bc}	55.6 \pm 5.5 ^{bc}	54.9 \pm 5.3 ^{bc}
Rapid (%)	80.2 \pm 6.3 ^{ab}	81.4 \pm 3.7 ^a	64.1 \pm 25.1 ^b	81.7 \pm 8.2 ^a	81.0 \pm 5.6 ^{ab}	79.7 \pm 6.8 ^{ab}
PMI (%)	65.0 \pm 6.3 ^a	58.8 \pm 11.1 ^{ab}	49.3 \pm 16.4 ^b	56.4 \pm 12.0 ^{ab}	58.5 \pm 7.8 ^{ab}	57.0 \pm 9.6 ^{ab}
AMI (%)	74.4 \pm 5.9 ^a	42.2 \pm 8.6 ^b	24.7 \pm 12.3 ^c	52.7 \pm 13.2 ^b	55.9 \pm 11.4 ^b	45.6 \pm 12.0 ^b
ACR (%)	2.4 \pm 2.9 ^a	24.4 \pm 8.5 ^{bc}	31.5 \pm 10.5 ^b	14.1 \pm 9.0 ^{cd}	10.5 \pm 7.2 ^d	18.4 \pm 12.7 ^{cd}
MTP (%)	75.1 \pm 6.5 ^a	72.1 \pm 7.2 ^a	65.2 \pm 13.8 ^a	73.6 \pm 6.6 ^a	73.1 \pm 7.0 ^a	72.3 \pm 7.7 ^a

MOT, total motility; PMOT, progressive motility; VAP, average path velocity; VSL, straight line velocity; VCL, curvilinear velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity; rapid, VAP > medium VAP cut-off; PMI, plasma membrane integrity; AMI, acrosomal membrane integrity; ACR, sperm with reacted acrosome and intact plasma membrane; MTP, mitochondrial transmembrane potential.

Within lines, values without a common superscript (a–d) are different ($p < 0.05$).

been initiated prior to the AR induction. Therefore, perhaps a longer incubation period or the use of either a physiological or an artificial stimulant may be required by the domestic cat sperm to exhibit a hyperactivation-motion pattern.

In the present study, hyperactivation-like alterations in the sperm motility pattern after stimulation with either ionomycin or P₄ included ALH and BCF increase and VSL and LIN decrease. However, VCL values, commonly increased in hyperactivated sperm from other species (Rota et al. 1999; Ramió et al. 2008) and even in cat sperm stimulated with caffeine or pentoxifylline (Stachecki et al. 1994), remained the same among treatments. Using CASA, we evaluated the mean motility parameters, comprising all hyperactivated, progressive, transitional and non-motile sperm. Individual evaluation of these subpopulations seems to be more efficient to assess hyperactivation-like changes and also the percentage of hyperactivated sperm within a population (Burkman 1991; Cancel et al. 2000; Ramió et al. 2008). Although we did not assess the subpopulations, few hyperactivated spermatozoa and a great number of transitional sperm were seen. These findings are in accordance with a previous report in domestic cat (Stachecki et al. 1994).

To the authors' knowledge, this is the first report using P₄ in cats to induce capacitation and AR. Because AR was obtained after stimulation, P₄ receptors might be found in the acrosome region of the cat sperm plasma membrane, as in other species (Wu et al. 2005, 2006). In dog sperm, the P₄ effect is dose-dependent with maximum AR at 10 µg/ml (Wu et al. 2005). No improvement on P₄ effect was observed using twofold the maximum dose (20 µg/ml) in this trial, hence a dose of 10 µg/ml P₄ may be appropriate for cat sperm. In addition, we observed that increasing the time of exposure to P₄ at 10 µg/ml for more than 30 min had no effect upon the efficiency of P₄ to induce AR in cats.

Ionomycin, a calcium ionophore, is used to facilitate the passage of calcium ions across the plasma membrane and, thus, artificially mimic the physiological events during AR (Liu and Hermann 1978). Successful induction of AR with 4 µM of calcium ionophore A23187 (CaI) was reported in cats (Long et al. 1996). We tested two doses of ionomycin, 4 and 8 µM, and instead of an improvement on the percentage of AR, we observed a reduction in MOT, PMOT, rapid and LIN when using the higher concentration. This way, cat spermatozoa seem to be sensitive to ionomycin in a dose-dependent manner, and considering the high standard deviation, this sensitivity might vary among individuals.

In cats, the use of CaI was more efficient to induce AR when compared with solubilized zona pellucidae (Long et al. 1996). In the present study, concerning the capacity to trigger AR, ionomycin at 4 µM was similar to P₄ at 10 µg/ml for a 2-h incubation and 20 µg/ml for a 30-min incubation. It is noteworthy that ionomycin 8 µM caused a greater induction of the AR than all P₄ treatments, yet, a decrease in MOT and PMOT occurred only when using ionomycin at this dose.

We conclude that, domestic cat sperm: exhibit hyperactivation-like motion pattern when stimulated with either ionomycin or P₄, are capable of acrosome-react in

response to P₄ or ionomycin and are sensitive in a dose-dependent manner to ionomycin exposure. Moreover, as I1 group was similar to I2 to induce AR without diminishing sperm motility, ionomycin at 4 µM seems to be more suitable to trigger AR in domestic cat sperm.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP for the financial support and Royal Canin and Fort Dodge for food and medical supplies.

Author contributions

All authors contributed equally to this work.

Conflicts of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Burkman LJ, 1991: Discrimination between non-hyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril* **55**, 363–371.
- Cancel AM, Lobdell D, Mendola P, Perreault SD, 2000: Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using CASA. *Hum Reprod* **15**, 1322–1328.
- Cheng FP, Wu JT, Tsai PS, Chang CLT, Lee SL, Lee WM, Fazeli A, 2005: Effects of cryo-injury on progesterone receptor(s) of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology* **64**, 844–854.
- Howard JG, Bush M, Hall LL, Wildt DE, 1984: Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of nondomestic felids. In: *Proceedings of the 10th Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. 2*. University of Illinois, Urbana-Champaign, pp. 40–55.
- Kay VJ, Robertson L, 1998: Hyperactivation motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* **4**, 776–786.
- Liu CM, Hermann TE, 1978: Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* **253**, 5892–5894.
- Long JA, Wildt DE, Wolfe BA, Critser JK, DeRossi RV, Howard JG, 1996: Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic cats. *Biol Reprod* **54**, 638–646.
- Ramió L, Rivera MM, Ramírez A, Concha II, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, 2008: Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to in vitro capacitation and further in vitro acrosome reaction. *Theriogenology* **69**, 501–512.
- Rossato M, Zorzi M, Ferlin A, Garolla A, Foresta C, 2000: Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod* **15**, 1739–1743.
- Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez ???, 1999: In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* **57**, 199–215.
- Stachecki JJ, Ginsburg K, Armant DR, 1994: Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. *J Androl* **15**, 157–164.

- Villaverde AISB, Melo CM, Martin I, Ferreira TH, Papa FO, Taconeli CA, Lopes MD, in press: Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.008.
- Wu JT, Tsai PS, Lee SL, Cheng FP, 2005: Characterisation of the progesterone receptor on canine spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **17**, 733–737.
- Wu JT, Chiang KC, Cheng FP, 2006: Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **93**, 34–45.
- Yanagimachi R, 1994: Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds), *Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189–317.

Submitted: 30 June 2008

Author's address (for correspondence): Ana Izabel Silva Balbin Villaverde. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/no, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil. E-mail: aivillaverde@hotmail.com

Reproduction in Domestic Animals

Official Organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR),
the European Veterinary Society of Small Animal Reproduction (EVSSAR) and the
Spanish Society of Animal Reproduction

Edited by:

H. Rodriguez-Martinez

Print ISSN: 0936-6768

Online ISSN: 1439-0531

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 45 / 2010

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2009: Reproductive Biology: 19 / 26;
Agriculture, Dairy & Animal Science: 11 / 49; Veterinary Sciences: 25 / 141

Impact Factor: 1.606

Author Guidelines**1. General**

Reproduction in Domestic Animals is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. *Reproduction in Domestic Animals* is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Feature articles or reviews should summarise work in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Please mark these submissions as 'Urgent Short Communication' and provide a brief explanation of the urgency. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers

are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

2. Manuscript submission

*The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website wileyonlinelibrary.com/journal/rda. Please note that it is compulsory to include include all authors with their affiliation and valid email addresses.*

Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.

2.1. Licence to publish

Additionally, the corresponding author **MUST** submit a Copyright Transfer Agreement. This form includes, among other items, your complete corresponding address, the number of your submission (Manuscript number) and the copyright transfer agreement. The form is to be retrieved, filled and signed, and then scanned in .pdf format to be uploaded in the submission of your manuscript, alongside with the other manuscript files. Please mark this CTA as supplementary file. The CTA will thereafter follow the handling of your manuscript and only become effective if the manuscript is accepted for publication. Please note that a missing CTA in the submission will mean that the paper shall not be processed.

2.2. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Reproduction in Domestic Animals adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.

Acknowledgements: Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors must acknowledge any

assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

Conflict of interest: A subheading "Conflict of interest statement" must be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

Funding sources: All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

Use of non-commercially available instrumentation, substances , antibodies or assays: When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

3. Manuscript Requirements

3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing *throughout* and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word),.doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

3.2. Length

Original papers, including figures, tables and references, should not exceed 25 typed or computer-written DIN A4 pages. Review articles can have an extended length. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 6 manuscript pages including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum.

3.3. Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®. When non-commercially available substances or reagents are used, the following text must be provided: "[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]"

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore).

Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Please direct queries to the Production Editor at rda@wiley.com.

Tables should be created using the table function.

3.5. References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication. Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumonie der Stewing. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 102 6-11. Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J. Vet. Med. A 35 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

NEW: References in Articles - We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager to reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.Endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

3.6. *Laboratory animals*

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

4. **Copyright Assignment**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. A completed Copyright Transfer Agreement (CTA), found at www.wiley.com/go/ctaaglobal, must be included as described in 2.1 as supplementary file when the manuscript is submitted.

5. **Proof correction and offprints**

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them electronically to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as e-annotated proofs. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To view, print and annotate the proofs of your article you will need Adobe Reader version 7 (or higher). This software can be downloaded (free of charge) for a whole series of platforms that include PC, Mac, and UNIX and can be downloaded from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>

Further instructions will be sent with the proof. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

6. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

7. Supplements

As the official organ of the ESDAR, the EVSSAR and AERA, the journal publishes the proceedings (fully refereed main papers and abstracts) of the societies' Annual Meetings. Other Proceedings, as hard copy and/or online, can be published as Supplements following agreement with the Editor-in-Chief (for contents and scope) and the publisher (for terms and cost).

Wiley-Blackwell's Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Reproduction in Domestic Animals is covered by Wiley Online Library's Early View online service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.