

ÂNGELA VALÉRIA COELHO TEIXEIRA

**ESTUDO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E DAS PROTEÍNAS
SEMINAIS DE CAPRINOS DA RAÇA ANGLO-NUBIANA NO
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Zootecnia da Universidade
Estadual Vale do Acaraú, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Zootecnia.

Área de Concentração: Manejo Reprodutivo.

Orientadora: Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

**SOBRAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS-UVA
EMBRAPA CAPRINOS**

2008

Teixeira, Ângela Valéria Coelho

Estudo dos parâmetros espermáticos e das proteínas seminais de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil./
Ângela Valéria Coelho Teixeira- Sobral: UVA / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, 2008.

61 f.: il.

Orientadora: Ângela Maria Xavier Eloy

Dissertação (Mestrado) - UVA, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Embrapa Caprinos, 2008.

1-. Sêmen. 2. Plasma seminal. 3. Proteínas I. Eloy, Ângela Maria Xavier. II Universidade Estadual Vale do Acaraú. III Título

CDD 636.39

ANGELA VALÉRIA COELHO TEIXEIRA

**ESTUDO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E DAS PROTEÍNAS
SEMINAIS DE CAPRINOS DA RAÇA ANGLO-NUBIANA NO
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
em Zootecnia da Universidade Estadual Vale
do Acaraú, Como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Manejo Reprodutivo.

Orientadora: Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

Dissertação defendida e aprovada em 14 de março de 2008
Pela Comissão Examinadora constituída por:

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ângela Maria Xavier Eloy
ORIENTADORA (EMBRAPA-CNPC)

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
CO-ORIENTADOR (UVA)

Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura
CONSELHEIRO (UFC)

Dr. Diônes Oliveira Santos
CONSELHEIRO (UVA)

Ao meu esposo, Marcílio, por todo o amor e carinho. Por nunca me deixar desistir, mesmo diante dos maiores desafios,

OFEREÇO

Aos meus pais Custódio e Maria do Carmo, pelo amor, estímulo, exemplo de vida que só uma família pode dar.

Aos meus irmãos, Jany, Márcia, Marta, Custódio, Neto e Efigênia, pela solidariedade constante,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar olhando e guiando meus passos, nunca me deixando desistir frente aos obstáculos.

À minha família, por todo amor, dedicação e incentivo durante esta jornada.

A minha orientadora e Pesquisadora da Embrapa Caprinos Dra. Ângela Maria Xavier Eloy pela confiança e orientação que me foram transmitidas.

Ao João Ricardo Furtado pelo enorme apoio e dedicação durante essa temporada e pela participação imprescindível neste experimento.

Ao co-orientador e Pesquisador da Embrapa Caprinos Dr. Raymundo Rizaldo pelas sugestões e correções da tese.

Ao Pesquisador da Embrapa Caprino Dr. Diônes Oliveira Santos, pelos ensinamentos profissionais e de vida que me foram transmitidos.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) pelos ensinamentos passados durante esses dois anos.

Ao Pesquisador da Embrapa Caprino Dr. Marcelo Alves de Araújo pelo auxílio e interpretação das análises estatísticas.

Aos Laboratoristas, José Nóbrega Medeiros, Helena Araújo e Osmarilda Maria Machado Alves por viabilizarem a realização das análises do sêmen e análises de proteínas.

Aos manejadores, Francisco Teixeira e Carlos Ramalho pela colaboração prestada.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro.

A todos os meus colegas, Almir, Luciana, Tallita, Tony, Mauricio, Humberto do Departamento de zootecnia que compartilharam comigo as experiências e dificuldades vividas nessa jornada.

As minhas amigas Alzira, Roberta, Lisa, Michelline, pela amizade e carinho.

Ao Ricardo, funcionário da FUNCEME pela amizade e cooperação.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia, – da UVA pela formação durante esse Curso.

EPIFASE

“Há homens que lutam um dia e são bons”.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
“Esses são os imprescindíveis.”

Bertolt Brecht.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	9
	LISTA DE GRÁFICOS.....	10
	LISTAS DE FIGURAS.....	11
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
	RESUMO.....	13
	ABSTRACT.....	14
Capítulo I	1- INTRODUÇÃO GERAL.....	16
Capítulo II	2- REVISÃO DE LITERATURA.....	18
	2.1- Sêmen.....	18
	2.1.1- Espermatozóide.....	18
	2.2- Plasma Seminal.....	19
	2.2.1- Composição do plasma seminal.....	19
	2.2.2- Função do plasma seminal.....	20
	2.3- Proteínas.....	20
	2.3.1- As proteínas e suas funções sobre os espermatozóide.....	20
	3.2- Métodos de estudos das proteínas.....	22
	4.0- REFERÊNCIAS.....	23
Capítulo III	EXPERIMENTO 1	
	Mapeamento eletroforético das proteínas seminais ao longo do ano de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil.	
	1.1- RESUMO.....	31
	1.2- ABSTRACT.....	31
	1.3- INTRODUÇÃO.....	32
	1.4- MATERIAL E MÉTODOS.....	33
	1.4.1- Dosagem de proteínas totais.....	33
	1.4.2- Eletroforese unidimensional.....	34
	1.4.3- Análise estatística.....	34
	5- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
	1.6- CONCLUSÃO.....	39
	1.7- REFERÊNCIAS.....	39
Capítulo IV	EXPERIMENTO 2	
	Variação sazonal dos parâmetros e das proteínas seminais de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil	
	1.1- RESUMO.....	43
	2- ABSTRACT.....	43
	1.3- INTRODUÇÃO.....	44
	1.4- MATERIAL E MÉTODO.....	45
	1.4.1- Avaliação do sêmen.....	46
	1.4.2- Análise estatística.....	46
	1.5- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
	1.6- CONCLUSÃO.....	51
	1.7- REFERÊNCIAS.....	52
	5 - CONCLUSÕES.....	55

6- ANEXOS	
Anexo 1.....	56
Anexo 2.....	57
Anexo 3.....	58
Anexo 4.....	59

LISTA DE TABELAS

Capítulo III **Experimento 1.**

TABELA 1- Dados meteorológicos referente ao período de abril/2006 a março /2007..... 33

TABELA 2 -Frequência das bandas protéicas agrupadas de acordo com a massa molecular, em gel SDS-PAGE a 12% ao longo dos meses do ano do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil..... 37

Capítulo IV **Experimento 2**

TABELA 1-Dados meteorológicos referente ao período chuvoso (abril, maio) e seco (outubro, novembro) 45

TABELA 2- Distribuição das médias de volume, concentração do sêmen, aspecto, vigor e motilidade observadas nos ejaculados nos períodos chuvoso e seco em caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil 47

TABELA 3- Distribuição das bandas protéicas de acordo com a massa molecular nos períodos chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) em caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil..... 50

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo III Experimento 1.

- GRÁFICO 1** - Média das concentrações de proteínas totais do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana ao longo do ano no semi-árido do Nordeste do Brasil 34
- GRÁFICO 2** - Distribuição das bandas protéicas de acordo com a massa molecular ao longo do ano no plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no semi-árido do Nordeste do Brasil 36
- GRÁFICO 3** - Distribuição do número de bandas protéicas em gel de SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana ao longo do ano no semi-árido do Nordeste no Brasil 36

Capítulo IV Experimento 2.

- GRÁFICO 1** - Média das proteínas totais do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no período chuvoso (abril, maio) e seco (outubro, novembro) no semi-árido do Nordeste do Brasil 48
- GRÁFICO 2** - Massa molecular (kDa) das bandas protéicas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no período chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) na região semi-árida do Nordeste do Brasil..... 50
- GRÁFICO 3** - Massa molecular (kDa) das bandas protéicas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no período chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) na região semi-árida do Nordeste.do Brasil..... 50

LISTA DE FIGURAS

Capítulo III **Experimento 1.**

FIGURA 1 - Gel de acrilamida 12% SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana nos meses de maio, julho, setembro, novembro, janeiro e março..... 35

FIGURA 2 - Gel de acrilamida 12% SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana nos meses de abril, junho, agosto, outubro, dezembro e fevereiro..... 35

Capítulo IV **Experimento 2.**

FIGURA 1 - Gel de acrilamida 12% SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana nos meses de abril, maio, outubro e novembro..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS

μm – micrômetro

μg – micrôgrama

μl - microlitro

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

CV – coeficiente de variação

DP – desvio padrão

g – grama

g/mL – grama por mililitro

GAs – glândulas sexuais acessórias

m – metro

mL – mililitro

mm/ano – milímetro por ano p – nível de significância

r – coeficiente de correlação de Pearson

R^2 – coeficiente de determinação do modelo de regressão

H_3PO_4 - ácido fosfórico

kDa Kilodaltons

NaOH – Hidróxido de Sódio

pI – Ponto isoelétrico

SDS -Dodecil Sulfato de sódio

TEMED- Tetrametilenodiamina

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as proteínas seminais e os parâmetros espermáticos e sua relação com os períodos chuvoso e seco, bem como observar a distribuição das bandas protéicas ao longo do ano e nos períodos chuvoso e seco em caprinos da raça Anglo-Nubiana na região semi-árido do Nordeste do Brasil. O primeiro estudo foi voltado para o mapeamento das proteínas e bandas protéicas ao longo do ano. Foram utilizados cinco machos caprinos da raça Anglo-Nubiana e feitos *pool* do plasma seminal de todos os animais de cada mês, correspondendo ao período de um ano, sendo o mesmo submetido à eletroforese unidimensional (*SDS-PAGE*). As proteínas seminais apresentaram variação significativa ($P < 0,05$) entre os meses do ano.

As massas moleculares das bandas protéicas variaram de 12 kDa a 150 kDa, sendo as bandas de massas moleculares abaixo de 50 kDa as mais freqüentes ao longo do ano, vindo em seguida as bandas com valores entre 50 e 100 kDa e por último, as de massa acima de 100 kDa. Foram encontradas de 13 a 16 bandas protéicas nas amostras analisadas nos géis, sendo que todos os géis referentes à cada mês do ano não apresentaram menos de 13 bandas protéicas. Observou-se também que o maior número de bandas ocorreu nos meses de setembro e novembro. Observou-se distribuição uniforme, ao longo do ano, de bandas protéicas de massas moleculares que podem estar relacionadas com as proteínas ligadas à fertilidade, indicando possivelmente não variação na capacidade fecundante do sêmen ao longo do ano. Bandas protéicas que podem estar relacionadas com as proteínas identificadas como ligadas ao colesterol, apresentaram menor uniformidade, sugerindo períodos de maiores e menores congelabilidade ao longo do ano. A segunda etapa do trabalho visou estudar a sazonalidade dos parâmetros espermáticos, das proteínas seminais e a distribuição das bandas protéicas nos períodos chuvoso e seco. Utilizaram-se cinco caprinos da raça Anglo-Nubiana cujo sêmen foi colhido, em vagina artificial, durante os períodos chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) e foram avaliados os parâmetros espermáticos (aspecto, volume, concentração, motilidade e o vigor). O volume, a concentração e o aspecto apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) entre os períodos chuvosos e secos, enquanto o vigor e a motilidade não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$). A quantidade de proteínas totais no plasma seminal apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os períodos chuvoso e seco, apresentando média de $32,9 \pm 0,79 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ no período chuvoso e $14,43 \pm 4,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ no período seco. A temperatura apresentou correlação positiva moderada ($r = 0,48$) com o aspecto e com a concentração de proteínas ($r = 0,52$). A umidade apresentou correlação positiva moderada ($r = 0,45$) com o volume e com as proteínas totais ($r = 0,50$) e correlação negativa moderada ($r = -0,58$) com o aspecto e com a concentração espermática ($r = -0,67$). O volume apresentou correlação negativa moderada ($r = -0,57$) com o aspecto e com a concentração ($r = -0,56$) e correlação positiva moderada ($r = 0,68$) com as proteínas totais. A pluviosidade não apresentou correlação com os parâmetros seminais, no entanto, sua interferência provavelmente ocorra indiretamente através da umidade do ar e também por estimular o crescimento das pastagens, proporcionando maior oferta de alimentos. Segundo estes dados, conclui-se que os parâmetros espermáticos (aspecto, volume e concentração) sofrem influência da estação do ano no semi-árido, enquanto a motilidade e o vigor não sofrem. Como a variação não é grande, não afetando a qualidade do sêmen, os machos caprinos podem ser usados na reprodução nos períodos seco e chuvoso no semi-árido do Nordeste. Também as proteínas plasmáticas dos caprinos sofrem influência das estações seca e chuvosa no Nordeste do Brasil. Como a

distribuição das bandas protéicas apresenta variação nos períodos chuvoso e seco, e como as bandas de massas moleculares possivelmente relacionadas às proteínas ligadas à fertilidade encontram-se presentes nos dois períodos, enquanto uma banda possivelmente relacionada à congelação do sêmen está presente unicamente no período seco, leva-nos a sugerir que o caprino da raça Anglo-Nubiana pode ser usado em estações reprodutivas ao longo do ano e que para congelação de sêmen, recomenda-se seu uso no período seco, fato esse também observado na literatura.

Palavras-chave: Sêmen, Plasma seminal, Proteínas.

ABSTRACT

The present work had the objective to study the seminal proteins and spermatic parameters and its relation to rainy and dry season, as well to observe the proteins bands distribution along of the year and in the rainy and dry periods in Anglo-Nubian goats from Northeast of Brazil. The first study intended to map the proteins bands along the year. It were used five Anglo-Nubian male goats and the pool of plasma samples from each animal from each month, during a year, were submitted to one dimension electrophoresis (SDS-PAGE). The seminal proteins showed significant ($P<0,05$) variation between the months of the year. The mass molecular bands varied from 12 kDa to 150 kDa being the mass molecular bands below 50 kDa the most numerous along the year, following by the bands with values between 50kDa and 100 kDa and finally the bands upper 100 kDa. It were found proteins bands of 13 kDa to 16 kDa in samples analysed from gels, being all gels concerning to each month of the year didn't show less than 13 bands. Is was observed also that the most numerous bands happened at September and November. Also it was observed the uniforme distribution along the year of mass molecular bands that can be related to proteins linked to fertility indicating that there no semen fecundity variation along the year in goats from semiarid area.

Proteins bands that can be related to proteins identified as involved to cholesterol, showed minor uniformed distribution suggesting periods more suitable and less suitable to semen cry preservation along the year. The second study aimed to study the seasonality of the spermatic parameters, seminal proteins and distribution of proteins bands in rainy and dry periods. It were used five Anglo-Nubian goats which semen were collected through artificial vagina during the rainy (April and May) and dry (October and November) periods in which it were evaluated the spermatic parameters (aspect, volume, concentration and vigor). The volume, concentration and aspect showed statistical difference ($P<0,05$) between the rainy and dry periods, while the vigor and motility didn't show statistical difference ($P>0,05$). The total proteins in seminal plasma showed statistical difference ($P<0,05$) between the rainy and dry periods showing media of $32,9 \pm 0,79 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in rainy $43 \pm 4,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ and dry periods. The temperature showed positive moderate correlation ($r= 0,48$) with aspect and with proteins concentration ($r= 0,52$). The humidity showed positive moderate correlation ($r = 0,45$) with volume and with total proteins ($r= 0,50$) and negative moderate correlation ($r= -0,58$) with aspect

and with spermatic concentration ($r = -0.67$). The volume showed negative moderate correlation ($r = -0,57$) with aspect and with spermatic concentration ($r = -0,56$) and positive moderate correlation ($r = 0,68$) with total proteins. The rainy index didn't show correlation with seminal parameters, although its interference probably happens indirect through air humidity and also by growing stimulation of grass and plans proportioned more feed disposable. According to these data, it is concluded that spermatic parameters (aspect, volume and concentration) suffer influence of the rainy and dry season in semi arid area, while the motility and vigor didn't. As the variation is not big enough to affects the semen quality, it is suggested that the male goats can be used to reproduction in the rainy and dry periods in Northeast. Also the plasmatic proteins from goats suffer influence of the dry and rainy seasons in Northeast of Brazil. As the proteins bands distribution shows variation between the periods studied and take into consideration that mass molecular bands possible related to proteins, already known, involved to fertility are present in both rainy and dry periods, while a band was found in dry period, possible related to cholesterol that is linked to semen freezing process, let us to suggest that Anglo Nubian goats in semi arid region of Northeast can be used along the year in reproductions seasons, but in order to obtain freezing semen viability its is recommended to use the animals in dry season.

Key-words: Semen, seminal plasma, Proteins.

1- INTRODUÇÃO

A espécie caprina está em ampla expansão no Brasil, sendo identificados mercado antes desconhecidos e inexistentes. Como as importações têm sido uma constante nessa exploração, visando o melhoramento genético com a introdução de diferentes linhagens, auxiliado pelas biotecnias da reprodução, tais como inseminação artificial e transferência de embrião, houve uma melhora do plantel, apesar de também terem surgido problemas, como a de introdução de doenças até de linhagens com baixas fertilidades, não adaptadas às nossas condições climáticas. Aliado a esse quadro, encontra-se ainda incipiente estudos mais avançados de critérios de seleção de reprodutores caprinos que permitam a realização de seleção mais precisa e acurada.

Costuma-se utilizar critérios técnicos testados em outras espécies, realizando-se uma adequação à espécie caprina, provavelmente pelo fato desta espécie ser mais explorada nas regiões mais pobres do planeta, cujo investimento em pesquisa ainda são escassos. Portanto, levando-se em consideração as particularidades desta espécie, os avanços tecnológicos precisam ser direcionados e explorados o mais breve possível com o intuito de evitar que padrões indesejáveis se instalem, afetando a exploração como um todo.

Dentre as avaliações de rotina do sêmen realizadas nas centrais de inseminação artificial, destacam-se a determinação do volume, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, servindo para a diluição e processamento do sêmen. Rodriguez –Matinez et al., (1997).

O uso de reprodutores testados e com alta capacidade fertilizante é de fundamental importância para garantir boa eficiência reprodutiva e produtiva dos animais. Desse modo, a busca por indicadores da fertilidade de reprodutores tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos, segundo Killian et al. (1993). No entanto, apesar dos avanços no setor da biotecnologia da reprodução, ainda se tem pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos diferentes processos reprodutivos, havendo necessidade de técnicas que aprofunde o estudo sobre os aspectos bioquímico e fisiológico do plasma seminal.

A ampliação dos conhecimentos sobre a bioquímica espermática e os estudos dos componentes do plasma seminal representam uma ferramenta importante para o conhecimento da fertilização.

Portanto, estudos moleculares que identifiquem o perfil protéico do sêmen de animais mais férteis representam uma técnica que poderá avaliar sua capacidade de fecundar e ser classificada como marcadores de animais superiores.

As proteínas apresentam funções importantes sobre os espermatozoides, pois Henault e Killian (1996) os fluídos das glândulas acessórias de touros com maiores índices de fertilidade aumentaram a capacidade de fertilização de oócitos por espermatozoides obtidos de touros com baixa fertilidade. Amman et al (1987) também enumeraram proteínas (19,6 kDa e 15,3 kDa) no plasma seminal equino, correlacionadas com a motilidade individual progressiva de espermatozoides em sêmen fresco e congelado. Portanto, existem fatores secretados pelo epidídimo, células dos túbulos seminíferos e glândulas acessórias que influenciam de forma significativa a habilidade dos espermatozoides de potencializa a fecundação, com efeitos nos índices reprodutivos e taxa de prenhez, associado o cada reprodutor. Estas proteínas, recentemente identificadas, podem estar ligadas ao processo de capacitação espermática

e reação acrossômica, proteção contra possíveis infecções. Cancel et al., (1999), transporte de retinóides Gerena et al., (1998) ou prostaglandinas Fouchecourt et al.(1999). Observa-se, como exemplo, que eventos ligados à capacitação espermática envolvem proteínas, já identificadas nos bovinos como BSPs (*bovine seminal proteine*), que são secretadas pelas vesículas seminais, cujos pesos moleculares são de 15, 16,5 e 28-30 kDa. Observou-se que as mesmas estimulam a liberação de colesterol da membrana do sêmen pouco depois da ejaculação e a HDL (*High-Density Lipoprotein*) induz a capacitação, através do estímulo de um segundo efluxo de colesterol no sêmen, no trato genital da fêmea (Desnoyers et al., 1994; Therien et al., 1999).

Com o surgimento da eletroforese, por volta de 1950, tornou-se possível o mapeamento e a identificação de componentes protéicos no ejaculado de várias espécies e pôde-se relacioná-los com a fecundação, possibilitando, assim, associar marcadores com a fertilidade (Bacceti et al.,1979; Morgentaler et al.,1990; Marchini et al.,1990; Autiero et al.,1991; Killian et al.,1993; Wolfe et al, 1993; Bellin et al., 1994) e diferenciar animais quanto ao grau de fertilidade.

A partir do melhor conhecimento dos fatores presentes no plasma seminal, vários pesquisadores têm buscado marcadores bioquímicos que ajudem na predição da fertilidade do animal. Considerando este aspecto, é de suma importância viabilizar pesquisas que objetivem a utilização de protocolos que possam identificar características seminais necessárias para avaliar a fertilidade do macho.

Estudos demonstraram haver diferenças na qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes entre as estações do ano em clima temperado (Eaton e Simmons, 1952; Colas, 1980; Nunes, 1982; Colas, 1983; Roca et al., 1992; Tuli e Holtz, 1995), e muitos deles atribuíram tais diferenças ao fotoperíodo.

Vinha, (1975), estudando as influências das estações sobre o sêmen da raça Anglo-Nubiana obteve os seguintes resultados: o volume e a motilidade foram maiores no período chuvoso e menor no período seco, e a concentração espermática foi maior no período seco e menor no período chuvoso.

Considerando que o estresse calórico tem sido reconhecido como importante fator limitante da produção animal nos trópicos, há uma necessidade de se conhecer a tolerância e a capacidade de adaptação das diversas raças como forma de embasamento técnico para a exploração animal, bem como para a introdução de novas raças em uma região ou mesmo para o conhecimento de programas de cruzamento, visando dessa forma, a obtenção de tipos ou raças mais adequadas a uma condição específica de ambiente (Monty Junior et al., 1991).

Segundo Baêta e Souza (1997), os animais para terem máxima produtividade dependem de uma faixa de temperatura adequada, também chamada de zona de conforto térmico, em que há gasto mínimo de energia para manter a homeotermia. Do ponto de vista da produção, este aspecto reveste-se de importância, pelo fato de que, dentro desses limites, os nutrientes ingeridos pelos animais serão quase na totalidade utilizados para desenvolvimento das funções produtivas. Portanto, a interação entre animal e ambiente deve ser levada em consideração quando se busca maior eficiência na exploração pecuária, pois o conhecimento das variáveis climáticas, sua ação sobre as respostas comportamentais e fisiológicas dos animais, são preponderantes na adequação do sistema de produção aos objetivos da atividade pecuária (Neiva et al., 2004).

Com o objetivo de determinar os parâmetros bioquímicos normais no plasma seminal de caprinos criados no Nordeste do Brasil, das raças Alpina, Moxotó e mestiços Alpina-Moxotó, Pinheiro *et al.* (1996a), observaram que os valores encontrados de proteínas totais foram inferiores na época seca.

A perspectiva deste trabalho visa à busca de conhecimento capaz de melhor avaliar e selecionar reprodutores portadores de características ligadas à fertilidade, padronizando uma técnica precisa para avaliação do sêmen e identificação de marcadores, a exemplo do que já está sendo realizado nas espécies bovina, suína e eqüina. Portanto, o objetivo deste trabalho foi mapear o perfil eletroforético do plasma seminal, identificando possíveis épocas do ano de melhor manuseio do sêmen como também, proteínas que possam ser utilizadas como possíveis marcadores moleculares para selecionar reprodutores com alto potencial genético.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sêmen

O sêmen ou ejaculado é composto por uma fração celular, pelos espermatozóides, que são produzidos no parênquima testicular e por uma fração líquida, o plasma seminal, originado das glândulas acessórias. Durante a ejaculação, os espermatozóides previamente estocados na porção caudal do epidídimo são misturados com secreções produzidas nas glândulas sexuais acessórias (Way et al., 2000).

A literatura relata sobre a presença de fatores que influenciam a fertilidade do macho. Os biomarcadores podem ser encontrados em ambas as frações seminais, isto é, no plasma seminal e nos espermatozóides. Mas atualmente o plasma seminal vem sendo mais estudado, principalmente em relação às proteínas, por estarem em maior concentração do que outros componentes e por participar ativamente do processo de fecundação (Mc Couley et al, 1997; Bellin et al., 1998).

Segundo Smith et al. (1981), não foi encontrada relação entre nenhum parâmetro de avaliação da qualidade seminal individualmente com a fertilidade, significando que esta deveria ser estimada pela avaliação de outros parâmetros complementares. Rodriguez- Martinez et al (1997) e Zhang et al ., (1998) relatam que os parâmetros avaliados rotineiramente têm capacidade limitada na avaliação da fertilidade potencial de reprodutores. Portanto, a observação de que reprodutores com características seminais semelhantes ainda podem apresentar diferença de 20 a 25% nos índices de fertilidade (Larson e Miller, 2000) têm estimulado a busca por outros marcadores de fertilidade.

2.1.1 Espermatozóide

No início do século XX a fisiologia e a bioquímica do sêmen desenvolveram-se significativamente, mas vários anos transcorreram para que as funções mais importantes do espermatozóide fossem evidenciadas, tais como: motilidade e a capacidade de fertilização, e associadas às diferentes estruturas da célula espermática: cabeça, cauda e membrana plasmática.

A cabeça do espermatozóide é formada pelo núcleo e o acrossoma, situado entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo.

Durante a reação acrossômica, a membrana externa do acrossoma e a membrana plasmática fundem-se, e são formadas vesículas, na qual ocorre a exocitose do conteúdo acrossomal (Eddy, 1988). O segmento equatorial não contém enzimas, conseqüentemente, não está envolvido com a reação acrossômica, mas a membrana plasmática funde-se com a membrana do oócito nesta área (Amman e Graham, 1992).

O espermatozóide é recoberto pela membrana plasmática, uma dupla camada com porções hidrofílicas de lipídios e de proteínas, complexas interações entre eles regulam os receptores de membrana, os íons ou as enzimas e a função celular

(Hammerstedt et al., 1990). Esta membrana plasmática está subdividida em regiões específicas, que diferem em sua composição e função. Moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes na região anterior do acrossomo (Salling, 1986); moléculas envolvidas na fusão oócito-espermatozóide são encontradas na região posterior do acrossoma (Salling et al., 1985) e moléculas envolvidas com a atividade flagelar estão associados com a membrana plasmática do flagelo (Kopf et al., 1986).

A composição da membrana plasmática é modificada assim que o espermatozóide deixa o testículo. Alterações na superfície espermática ocorrem durante a maturação do epidídimo e durante a exposição aos produtos das glândulas acessórias na ejaculação. A superfície espermática também é alterada no trato reprodutivo da fêmea. Durante a capacitação, alguns componentes da superfície espermática são perdidos e outros migram para fora de seus domínios. Essas mudanças na composição e organização dos componentes da superfície da membrana espermática indicam que os componentes da membrana plasmática são porções dinâmicas da célula (Eddy, 1988).

2.2 Plasma Seminal

2.2.1 Composição do plasma seminal

O plasma seminal, fluido no qual os espermatozoides estão suspensos por ocasião da ejaculação, é constituído de secreções das glândulas bulbo uretrais, vesículas seminais, próstata e da cauda do epidídimo (Hafez 2000) que têm função no transporte e sobrevivência espermática. Vários relatos na literatura mencionam a presença de fatores no plasma seminal que podem influenciar a fertilidade do macho. Destes, também fatores anti-fertilizantes que prejudicam fatores identificados como promotores da viabilidade espermática e a fertilização. Deste modo, proteínas do plasma seminal têm sido isoladas, caracterizadas e avaliadas quanto à capacidade de fertilização do macho.

O seu volume e composição variam entre espécies (Mann & Lutwak, 1981). Neste fluido existem fatores que podem influenciar a fertilidade espermática, principalmente proteínas que se ligam à heparina; a osteopontina e a prostaglandina D sintetase tipo lipocalina (Miller et al., 1996; Killian et al., Belline et al., 1994; Bellin et al., 1996). O plasma seminal também contém vários componentes bioquímicos (íons, cálcio, citrato, etc.) alguns deles específicos para a regulação da função espermática (Barrios et al., 2000), cujo papel na função espermática ainda é objeto de estudos (Barrios et al., 2000)

As vesículas seminais, que produzem 30-60% do volume total de sêmen ejaculado, possuem, dentre as glândulas acessórias, o conteúdo mais rico em proteínas, apresentando altas concentrações de frutose que contribuem na produção da maioria das prostaglandinas existentes no plasma seminal, e também elevadas concentrações de potássio, sendo o citrato o principal ânion. As prostaglandinas não parecem ter um efeito direto na motilidade ou no metabolismo espermático, mas podem afetar os músculos do trato reprodutivo da fêmea, auxiliando no transporte do espermatozóide.

A secreção da próstata é ácida e contém espermidina e espermina, responsável pelo odor no sêmen humano. Nesta secreção, são elevadas as quantidades de sódio, citrato e zinco. Grande parte da secreção prostática e vesicular é composta de enzimas frequentemente associadas com a membrana plasmática.

A secreção das glândulas bulbo-uretrais é mais alcalina que a das outras glândulas acessórias, neutralizando, assim, o caráter ácido das demais (Miller e Ax, 1988)

2.2.2 Função do plasma seminal

A principal função do plasma seminal é o transporte dos espermatozóides durante o ejaculado e sobrevivência dos mesmos no sistema genital feminino, prevenindo a capacitação espermática prematura (Yanagimachi, 1994) e, também, protegendo as células espermáticas contra danos peroxidativos (Schoneck et al., 1996), neutralizando o pH ácido da vagina, tendo, assim, uma ação imunossupressora.

O estudo dos componentes bioquímicos do plasma seminal pode ser uma alternativa para avaliação do funcionamento do aparelho reprodutor e da qualidade seminal de bodes (Mendonza et al., 1989; Pinheiro et al., 1996a; Pinheiro et al., 1996b; Santos et al., 1998). As funções do plasma seminal de caprinos consistem na ativação da motilidade (Howard et al., 1978 e na capacitação espermática (Maxwell & Johnson, 2000).. As concentrações dessas moléculas protéicas estão sob controle da estação do ano, para a qual ocorrem diferenças entre as estações reprodutiva e não-reprodutiva (La Falci et al., 2002).

O plasma seminal mostrou-se importante na manutenção da motilidade do espermatozóide humano (Lindholmer, 1974), eqüino (pickett et al., 1975), coelho (Muller e Kirchner, 1978) e no bovino (Baas et al., 1983). De acordo com Pursel et al., (1973) e o plasma seminal não só aumentou a resistência do espermatozóide suíno ao choque térmico, como também ativa a motilidade epididimária (Graham, 1994).

O plasma seminal também tem importância na fertilidade. Relatos em várias espécies sugerem que nele são encontradas proteínas que podem influenciar a fertilidade do macho (Ax et al., 1985; Jauhainem & Vanha- Perttula, 1987, Miller et al., 1990; Killian et al., 1993; Bellin et al., 1994., Bellin et al., 1996; Brandon et al., 1999; Koistinen et al., 2000), também podendo reverter a capacidade espermática.

Os primeiros estudos realizados em coelhos observaram que a adição do plasma seminal a espermatozóides capacitados poderia reverter o processo da capacitação, inibindo a fertilização (Davis, 1974). Tais observações revelaram que o plasma seminal contém fatores de decapacitação de fertilidade do espermatozóide. Com isso, previne-se a reação acrossômica prematura.

Entretanto, em algumas pesquisas foram encontrados também fatores negativos sobre a motilidade, viabilidade e fertilidade ou congelabilidade do sêmen presentes no plasma seminal. Vários estudos indicam que o plasma seminal tem pequeno efeito na motilidade espermática ou na suscetibilidade ao choque térmico no suíno (Salamon, 1973; Moore e Hibbit, 1977), touro, ou carneiro (Wales e White, 1959). Outros resultados mostraram o efeito prejudicial do plasma seminal na viabilidade da célula espermática em diversas espécies (Hammersted, 1975; Dott et al., 1979; Nunes et al., 1982; Varner et al., 1987). Também foi verificado o efeito deletério das proteínas de baixo peso molecular na inibição da motilidade.

Calvete et al., (1994) e Ollero et al., (1997) demonstraram que alguns componentes do plasma seminal são absorvidos sobre a superfície das células espermáticas durante a ejaculação, pois diversas proteínas estão presentes no plasma seminal, cujas proporções podem variar entre os indivíduos de uma mesma espécie (Frazer e Bucci, 1996).

2. 3 Proteínas

2. 3. 1 As proteínas e suas funções sobre os espermatozóides

As proteínas são macromoléculas orgânicas que estão presentes em todas as células vivas, portanto, essencial à vida, que desempenham diversas funções, entre elas

de transporte, defesa, manutenção, secreção e formação, sendo, pois indispensável para o crescimento, reprodução e produção.

As proteínas do plasma seminal exercem vários efeitos sobre a função espermática e desempenham um importante papel na capacitação dos espermatozoides, traduzido por um complexo processo que habilita a célula espermática a penetrar, através da zona pelúcida, por meio da reação acrossômica (Calvete et al., 1994; Jonakova et al., 2000; Barrios et al., 2000).

As principais proteínas do plasma sanguíneo dos mamíferos são albumina e as globulinas (Kulkarni et al., 1998). As proteínas do plasma seminal são parcialmente originárias do plasma sanguíneo e parcialmente sintetizadas pelo testículo (Kato et al., 1985), epidídimo (Turner e Reich, 1987) e vesícula seminal (Manjanath et al., 1994). A albumina sérica bovina, quando adicionada a espermatozoides epididimários incubados com o plasma epididimário ou seminal homólogo, estimulou a motilidade espermática (Dott et al., 1979). Outros estudos verificaram que a albumina sérica era benéfica à motilidade no sêmen de suíno, ovino, eqüino e coelho, mas tinha pouco efeito na motilidade espermática do sêmen bovino (Baas et al., 1983).

As proteínas de ligação à heparina (HBPs) também foram encontradas no plasma seminal. A heparina é um polissacarídeo de alto peso molecular, que se liga ao espermatozoide bovino através de proteínas, e é capaz de induzir a capacitação (Lenz et al., 1983; Miller et al., 1990). Tal efeito é obtido através da modulação na atividade da proteína à qual ela se liga. Polissacarídeos semelhantes à heparina são secretados, particularmente na fase folicular, pelo trato reprodutivo da fêmea, o que estimula a capacitação (Lenz et al., 1982). Além disso, essas proteínas de ligação à heparina são produzidas pelas glândulas acessórias (Nass et al., 1990), e cobrem a superfície do espermatozoide ejaculado (Miller et al., 1990). No plasma seminal bovino, as principais proteínas de ligação à heparina são as BSP (proteínas do plasma seminal bovino).

Das proteínas relacionadas à fertilidade, merecem destaque a osteopontina e a prostaglandina D sintetase tipo lipocalina. A osteopontina é uma glicoproteína ácida que foi detectada em várias espécies (Crivello e Delvin, 1992). A prostaglandina de 26 kDa foi caracterizada por Gerena et al. (1998) como 75% idêntica e 100% homóloga à prostaglandina D sintetase tipo lipocalina, está localizada no sistema nervoso central (Urade et al., 1985; Ujihara et al., 1988), na retina (Beuckmann et al., 1996) e nos órgãos genitais de macho e fêmeas (Ujihara et al., 1988; Blodorn et al., 1996 e Gerena et al., 1998). Através de estudo imunocitoquímico, a localização específica da prostaglandina foi verificada no tecido intersticial testicular, nas células de sertoli e nas células principais da cauda do epidídimo de ratos. Tal localização sugere que esta proteína tem um papel no desenvolvimento e maturação espermática (Gerena et al., 2000).

A caracterização de proteínas do plasma seminal tem recebido nos últimos anos atenção especial por parte dos pesquisadores com vista a entender ou determinar possíveis efeitos ou interações quanto à fertilidade do animal. Segundo Brandon et al. (1999), a habilidade para avaliar a fertilidade de um reprodutor usando-se ensaios para determinação das mudanças quantitativas das proteínas do plasma seminal seria extremamente vantajosa para um programa de melhoramento genético.

Bittmar e Kosiniak (1992) descreveram que a habilidade fertilizante do espermatozoide seria, em grande parte, determinada pelas proteínas espermáticas localizadas no acrossoma e peça intermediária, conhecidas como fonte de enzimas metabólicas especialmente ativas, cujas liberações em grandes quantidades podem indicar danos na membrana plasmática do espermatozoide.

Num trabalho recente, La Falci et al. (2002) investigaram as mudanças sazonais das proteínas do plasma seminal caprino, a partir da separação por cromatografia líquida e caracterização por SDS-PAGE. Estes autores observaram que o padrão de proteínas que tem afinidade por heparina (HAPs) tinha relação com a estação do ano. Em adição, as HAPs deterioraram a motilidade espermática e o acrossoma e eram 4,4 vezes mais concentrados durante a estação de não-cobrição.

Vários autores (Emilson, et al, (1984), Autiero; et al; 1991; Panidis et al. 1991) têm sugerido que o plasma seminal contém fatores que poderiam influenciar a fertilidade de machos, baseado em comparações da composição do plasma seminal entre machos de diferentes taxas de fertilidade. Contudo Shivaji et al (1990) e Audhyya; et al (1987) detectaram e isolaram fatores do plasma seminal que interferiam na capacitação espermática. De modo contrário, outros fatores protéicos identificados promoveriam a viabilidade espermática e a fertilização. Estes incluíam proteínas ligadoras de heparina Miller et al; (1990), indutoras da hiperativação dos espermatozoides-oócito e capacitação espermática (Sanz et al 1993)

Na espécie ovina, Gerena et al. (1998) detectaram a prostaglandina D-sintetase e o respectivo mRNA no epidídimo de carneiros, e esta proteína representou até 25% do total de proteínas quantificadas no sêmen. Também fosfolipases A2, com baixo peso molecular, identificadas no sêmen ovino, estão relacionadas ao processo de maturação e reação acrossômica (Upreti et al., 1999).

Na espécie caprina, Teixeira et al., (2002) caracterizam parcialmente uma proteína homóloga a espermedesina, não havendo ainda, estudo sobre a relação da mesma com a qualidade e fertilidade do sêmen nesta espécie. As espermedesinas são glicoproteínas cujas subunidades apresentam baixo peso molecular (12-16 KDA), e estão presentes no plasma seminal ou, periféricamente, associadas à superfície do espermatozoide de vários animais domésticos, sendo bem identificadas nas espécies suína, bovina e equina (Sanz et al., 1992; Rutherford, et al., 1992;. Calvete et al., 1995; Topfer-Petersen et al., 1998; Nimtz et al., 1999).

2. 3. 2 Métodos de estudos das proteínas

O mapeamento e identificação dos componentes protéicos do ejaculado, através da técnica de eletroforese, vêm sendo utilizados desde a década de 50 (Larson e Salisbury, 1954; Szumowski, 1956; Bennet, 1965). Inicialmente, foi utilizada a eletroforese em soluções de sacarose (Larson e Salistury, 1954); posteriormente, foi substituída pelos géis de amido (Vesselinovith, 1959). Através da eletroforese em géis de poliácridamida (uni ou bidimensional), a técnica vem sendo utilizada com sucesso até os dias de hoje.

Utilizando a eletroforese unidimensional, o perfil protéico do plasma seminal bovino foi correlacionado com padrões de fertilidade normais (Ax et al., 1985; Nass et al., 1990) e alterados (Rocha et al., 1974; Wolfe et al., 1993), com a congelabilidade (Roncoleta et al., 1997; Roncoleta et al., 2000) e com a viabilidade do sêmen (Aurich et al., 1996).

No entanto, na espécie caprina ainda não se conhece referências quanto à relação entre a presença de proteínas e a capacidade de fecundação do sêmen. O desenvolvimento desse estudo poderia auxiliar na seleção de reprodutores e no estabelecimento do potencial de fecundação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R., CRISTANELLI, M., SQUIRES, E. Proteins in stallion seminal plasma *Journal of Reproduction and Fertility*, suppl 1, v. 35, p. 133-120, 1987.
- AMNAA, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O VOSS J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia. Lea & Fediger, 1137p., cap. 80, p. 715-745, 1992.
- AUDHYA, T., REDDY, J., ZANEVELD, L. J. Purification and partial chemical characterization of a glycoprotein with antifertility activity from human seminal plasma. **Biology of Reprd.** v. 36, .2, p. 511-511, 1987.
- AURICH, J. E., KUHNE, A., HOPPE, H., AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46,p. 791-7, 1996.
- AUSTIN, C.R. The capacitation of the mammalian serm. *Nature*, v. 170,p. 326,1952.
- AUTIERO, M., SANSONE, G., ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 191-200, 1991.
- AX, R.L ; DICKSON, K.; LENZ, W. Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to non return rates of dairy bulls. **J. Dairy. Sci.**, v. 68 p 387-390, 1985.
- BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 68. p. 275-280, 1983.
- BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. Ambiente em edificações rurais: conforto animal. **Viçosa: UFV**.p.246 1997.
- BACCETI, B; BURRINI, A. G; MAVER, A; PALLINI, V; RENIERI, T “9+0” Immobile spermatozoa in as infertile man. **Andrologia**, v. 11.n.6, p.437-43, 1979.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, Zoragoza, v.63, p. 1531-1537. 2000.
- BELLIN, M. E., OYAORSO, J. N., HAWNKINS, H.E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p.2023 -9, 1998.
- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J.; AX, R. Monoclonal antibody detection of heparine-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 74, n. 1, p 173-182, 1996.
- BENNET, J.P. Microeletrophoresis of bull, ram, boar e rabbit seminal plasma proteins. In: CONGRESSO INTERNACIONAL PER LA RIPRODUDIONE ANIMALE E LA FECONDAZIONE ARTICIALE, 4., 1965, Trento. **Proccedings**.....Treto: [s.n],. p. 186-189, 1965.
- BERLIN, M.E.,HAWKINS, H.E., AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or obsence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **J. Anim. Sci.**, v.72 p. 244-7, 1994.
- BEUCHMAN,C. T.; GONDON, W. C.; KANAOKA, Y.; EUCHI, N.; MARCHESELLI, V. L. GERASHCHENKO, D. Y.; URADE, Y.; HAYAISHI, O.; BAZAN, N. G. Lipocarin-type prostaglandin D. Siynthase (beta-trace) is located in pigment epithelial cells of rat retina and accumulater within interphotoreceptor matrix. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 19, p. 6119-6124, 1996.

- BITTMAR, A.; KOSINIAK, K. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. **Archivum Veterinarium Polonicum**, Wroclaw Norwida, v. 32, p. 17-28, 1992.
- BLODORN, B.; MADER, M.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. FELGENHAUER, K.; BRUCK, W. Choroid, plexus; the major site of mRNA expression for the beta-trace protein (prostaglandin D synthase) in human brain. **Neurosc. Lett.**, v. 209, n. 2, p. 117-120, 1996.
- BRANDON, C. I., HEUSNER, G. L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p. 863-873, 1999.
- CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 29, p. 411-426, 1994.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; DOSTALOVIA, Z.; TOPFER-PETERSEN, E. Spermadhesins; sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. **Fertility**, v. 11 p. 35-40, 1995.
- CANCEL, A.M., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v. 57, n.6, p. 1292-301, 1997.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 454-460, 1999.
- COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. **EAST SCHOOL AGRICULTURE SCIENCE UNIVERSITY OF NORTHINGANS**, 1983, Northingans, **Anais**. p. 453-465. ... 1983
- COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, Jouy-en-Josas, v. 20, n. 6, p.1789-1799, 1980.
- COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France.I Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition and Development**.v.20 p 1789-99, 1980
- CONSTANTINO, M. J., EMILSON, L. B. V., COCKETT, A. T. K. Prostaglandins in semen and their relationship to male fertility: a study of 145 men. **Fertility and Sterility**, v.41, p.88-94, 1984.
- CORTEEL, J. M. Production, storage and insemination of goat semen. In: **SYMPOSIUM OF MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS**, 1977, Madison. Proceeding...Madison:University of Wisconsin., p. 41-57, 1977.
- DAVIS, B. K. Decapitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles from seminal plasma. **J.Reprod. Fertili.**, v. 41,n. 1, p. 241-244, 1974.
- DESNOYERS, L.; THERIEN, L.; MANJUNATH P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 425-435, 1994.
- DOTT, H. M.; HARRISON, R. A. P.;FOSTER, G.C. A. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **J. Reprod. Fert.**, v. 55, p. 113-124, 1979.
- EATON, O.N.; SIMMONS, V.L. A semen study of goats. **American Journal of Veterinary Research**, Michigan, v. 13, p. 537 – 544, 1952.

- EDDY, E.M. The spermatozoon. In. KNOBIL, E. **The physiology of Reproduction**. New York: Raven Press. cap. 2, p. 27-68, 1988.
- FOUCHECOURT, S.; DACHEUX, F.; J.L. Glutathion- independent prostaglantin D syntrase in ram allio epididymal fluids; origin and regulation. **Bio logy of Reproduction**. V. p. 558-566, 1999.
- FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS pages characterization of the protein in equine seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v. 46, p. 579-591, 1996.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y; EGUCHI, N CHAPMAN, D.A.; KILLIANM. G.J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p 826-833, 1998.
- GERENA, R. L.; N.; URADE, Y.; KILLIAN, G. J. Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in adult murine testie and epidymis. **J. Androl.** v 21, n 6 p. 848-854, 2000.
- GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculat spermatozoa of the bull during the cryupreservation process. *Treriogenol.*, v. 41, p. 1151-1162, 1994.
- H. Rodríguez-Martínez; B. Larsson. **Acta Agric. Scand.**, 29, 12-18, 1998.
- HAFEZ, S.E. **Reprodução animal**. 7^a. ed. São Paulo: Manole, , p. 335-42, 2000.
- HAMMERSTEDT, R. H. Use of high speed dialysis to prepare bovine sperm for metabolic studies. **Biol. Reprod.**, v. 15, p. 389-396, 1975.
- HAMMWRSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J.Androl.**, v. 11, p.73-88, 1990.
- HENALT, M.A.; KILLIAN, G..J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zonafree bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertilyty**, v.108 p. 199-204, 1996.
- HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. KAVANAUGH, J F.; GRIEL, JR.L. C. Effect of Accessory Sex Gland Fluid from Bulls of Differing Fertilities an the Ability of Cauda Epididymal Sperm to Penetrate Zona-Free Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 390-397, 1995.
- JAUHIANEM, A.; VANHA-PERTTULA, T. The comparison of glycoside levels in bovine seminal plasma. **J. Androl.**, v. 10, p.489-497, 1987.
- JONAKOVA, V.; MANASKOVA, P.; KRAUS, M.; LIBERDA, J. TICHÁ, M. Sperm Surfece Proteins in Mammalian Fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, Praga, v. 56, p. 275-277. 2000.
- KATO. M. ; SUNG, W. K. ; KATO, K; GOODMAN, D.S. Immunohistochemicalstudion on the localization of cellular retinol binding protein in rate test and epididymis. **Biol. Reprod.**, v, 32, p. 172 -189, 1985.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5-6 p 1202-7,1993.
- KOISTINEN, H. KOISTINEN, R. HYDEN-GRANSGNUS, O. SEPPALA, M. Seminal plasma glicodelin and fertilization in vitro. **J. Androl.**, n. 21, v. 5 p. 636-640, 2000.
- KOPF, G. S.; WOOLKALIS, M. J.; GERTON, G. L. Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-cat-alyzad ADP- ribosylation and immunochemical methods. **J. Biolo. Chem.**, v. 261, p.7327-7331, 1986.

KULKARNI B. A. RUPAL, P., Q; HEDGE, U.C. Comparative SDS- polyacrylamide gel electrophoresis of seminal plasma protein and blood plasma proteins of the Indian buffalo and cattle bulls. **Ind. J. anim. Sci.** v. 68, n, 1 p, 66 a 67, 1998.

LA FALCI V. S. N., TORTORELLA, H., RODRÍGUES, J. L., BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**,v. 57, p. 1035-1048, 2002

LARSON, B. L.; SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretics studies. **Journal Biology Chemistry**, v.206, n.2, p.741-749, 1954.

LARSON, J.L MILLER. D.J Can relative spermatozal galactosytransferase activity be predictive of dairy bull fertility? **Journal of dairy Science**.v.83, p.2473-2479, 2000.

LENZ , R.W.; AX, R. L.; GRIMEK, H. J.; FIRST, N. L.; Proteoglycan from bovine follicular, fluid enhances an acrossome reaction in bovine spermatozoa. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 106,p. 1092-1098, 1982.

LENZ , R.W.; BALL, G, D.; LOOHSE, J. K., FIRST, N. L; AX, R. L Chondroitin sulfate, facilitates an acrossome reaction in bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.** , v. 28, p. 683-685, 1983.

LINDHOLMER, C. H. The importance of seminal plasma for human sperm motility. **Biol. Reprodução.** v. 10,p.533 -542, 1974.

MANN, T.; LUTWAK- MANN, C. Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, **Biochemistry and Investigative Andrology.**, Berlim: Springer-Verlag, 1981.

McCOULEY, T.O.C., BELLIN, M.E.O., AX, R.L. Localization of a hepain-binding protein to distinct region of bovino sperm. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 429-38, 1997.

MANJUNATH. P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E; DESNOYERS, L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 50, p.27-37, 1994.

MARCHINI, M., AMORETTI, M., GIUNTA, A.M., PIFFARETTI-YANES, A., MEDICI, G., BALERNA, M. Electrophoretical patterns of seminal plasma proteins in patients with cystic fibrosis. **Fertil. Steril.**, v. 53,n. 3, p. 541-545,1990.

MAXWEL, W.M.C.O., JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma . **Theriogenology**, v. 52, p.1273-80, 2000.

MENDOZA, G.; MHITE, I.G.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, Sydney, v. 32 (3), p. 455-66. 1989.

MILLER, D. J.; WINER, M. A; AX, R. L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol. Reprod.**, v. 42, p. 899-915, 1990.

MILLER, J.; AX, R.L. The seminal plasma: What is it and why is it important.In: TECHNICAL. Conference On A.I. And Animal Reproduction, 12. Chicago. Proceedings... Chicago: National Associationof Animal Breeders, 198. p. 97-112. 1988.

MOORE, H. D. M.; HIBBIT, K. G. Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. **J. Reprod. Fertil.**, v. 50, p. 349-352, 1977.

MONTY JUNIOR, D. E.; KELLY, L. M.; RICE, W. R. Acclimatization of st Croix, Karakul and Rambouillet sheep to intense and dry summer heat. Small Ruminant Research, **Amsterdam**, v. 4, n. 4, p. 379-392, 1991.

MORGENTALER, A SCHOPPERLE, W. M., CROCKER, R. H., WOLFE W.C. Orotein differences between normal and oligospermic humas sperm demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis, **Fertil. Steril.**, v. 54, n. 5, p. 902-905, 1990.

- MULLER, B.; KIRCHNER, C. Influence of seminal plasma proteins on motility of rabbit spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, n.1,p.167-172, 1978.
- NASS, S.J.; MILLER, D. J.; WINER. M. A.; AX, R. L Male accessory sex glands, produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Mol, Reprod Dev.**, v. 25, n. 3 p.237-246, 1990.
- NEIVA, J. N. M.; TEIXEIRA, M.; TURCO, S. H. N. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santas Inês mantidos em confinamento na região litorânea do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 668–678, 2004.
- NIMTZ,M.; GRABENHORST, E.; CONDT,H.S.; SANZ, L.;CALVETE,J.J.J.Structural characterization of the oligosaccharie chains of native and crystallized boar seminal plasma epesmadhesin PSP-II glycomorms. **European Journal of Biochemistry**. V. 265.p. 703-718, 1999.
- NUNES, J. F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des espermatozoïdes de bouc. Paris. **Université Paris VI**, 1982. 45p. Tese (Ciências da Vida).
- OLLERO, M.; GARCÍA-LOPÉZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ. J.A.; MUÑO- BLANCO, T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phases system. **Reproduction Fertility Deveolpment**, Collingwood, v. 9, p. 81-390, 1997.
- PANIDIS, D., ROUSSO, D., PAPPAS, C., KALOGEROPOULOS, A. Seminal plasma transferrin: does it help in the diagnosis of fertility? **Journal Obstetic Gynecology**, v. 11, p. 211-214, 1991.
- PEREIRA, J.C.C. Alternativas para amenizar os efeitos do estresse calórico em vacas leiteiras. In: Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal. Minas Gerais: **FEMVZ**, p 120-121. 2005.
- PICKETT, B. W.; SULLIVAN, J.J.; BYRS,. W.; PACE, M.M.; REMMENG, E.E Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallionand bull spermatozoa. **Fert. Steril.**, v.2.n.2,p.167-174, 1975.
- PINHEIRO, R. R.; MACHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Níveis de Cálcio, Fósforo, Magnésio e pH do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 33, Fortaleza, Anais ... Fortaleza, p. 419-421, 1996a.
- PINHEIRO, R. R.; MACHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros bioquímicos do PS de 3 tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 33, Fortaleza, Anais . Fortaleza, p. 416-418. 1996b.
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L. L. EEffect of diluition, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 37,p. 528-831,1973.
- ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciana-Granadina goats in the Mediterranean. **Animal Reproduction Science**, Amsterdan, v. 29, p. 255-263, 1992.
- ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S., FERREIRA NETO, J.M. et al. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus com alterações reprodutivas. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.26, n.2, p.223-233, 1974.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSON, B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n 1-3, p. 297-308, 1997.

ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S., FERREIRA NETO, J.M. et al. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus com alterações reprodutivas. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.26, n.2, p.223-233, 1974.

RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.13, n.2, p.135-140, 1997.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C. ; FRANCHESCHINI, P. H. et al. Caracterização da proteína 26KDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.323, 2000.

RUTREFURD, K.J.; SWIDEREK, K.M.; GREEN, C.B.; CHEN, S.; SHIVELY, J.E.; KWOK, S.S.C.M. PURIFICATION AND Characterization of PSP-I and PSP-II, Two major proteins from seminal plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.295, n.2, p. 352-359, 1992.

SAILLIN, P.M. IRONS, J.; WAIBEL, R. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. **Biol. Repro.**, v. 33, p. 515-526, 1985.

SAILLIN, P.M. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. IV. A monoclonal antibody prevents zona penetration by inhibition of the acrosome reaction. **Dev. Biol.**, v. 117, p. 511-519, 1986.

SALAMON, S. Deep freezing of boar semen. 3. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Aust. Biol. Sci.**, v. 26, n. 1, p. 239-247, 1973.

SANTOS, D. O., AZEREDO, H. C.; SALLES, H. Efeito da insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de bodes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 283-286, 1998.

SANTOS, D. O.; Estudo do perfil proteico nas membranas de espermatozoides congelados de caprinos. 2005. 62p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu - SP. 2005.

SANZ, L.; CALVETE, J.J., MANN, K.; SCHAFFER, W.; SCHIM, E.R; TOPPER-PETERSERN, E.; the complete primary structure of the boar spermadhesin a carbohydrate protein involved in fertilization. **Europa Journal of Biochemistry**, v. p. 205, v. 645-64-52, 1992

SANZ, L.; CALVETE, J.J., MANN, K.; GABIUS, H. J. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesin in fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 37-43, 1993.

SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenol.**, v. 45, n.3, p. 633-642, 1996.

SHIVAJI, S. SHEIT, K. H. BHARGAVA, P. J. Proteins of seminal plasma. **New York: J.H. Wiley and Sons, Inc**, 1990.

SILVA; R.G. Zoneamento Bioclimático para animais de interesse zootécnico. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 42, Goiânia-GO, Anais, p.388-393. 2005.

SMYTH P.; GORDON, I. SEASON. A. L and breed variatios in the semen characteristics of ram. **Irish Veterinary Journal**. v. 21: p. 223-233, 1967.

SOUZA, R.L.; NÄÄS, I.A.; MARCHETO, F.G.; SALGADO, D.D. Análise das condições ambientais em sistemas de alojamento “freestall” para bovinos de leite. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande**, v.8, n. 2/3, p.299-303, 2004.

.SOUSA, C. E. A.; MOURA, A.A.; KILLIAN, G.J. Protein profile of the oviductal fluid from cyclic cows. In: Annual Meeting of Society for the Stuty os Reproduction, 40, 2007, San Antonio **Proceeding...**, San Antonio –TX, SSR, 2007.

SZUMOWSKI, P. Quelques résultats de l’ examen électrophorétique des protéines du plasma seminal de taureau. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 3., 1956, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge,. p.37- 42, 1956.

TEIXEIRA,D.I.A.; CAVADA,B.S.; SAMPAIO, A.H.; HATVT, A.; BLOCH JUNIOR.; C. PRATES,M.V.; MORENO,F.B.M.B.; CRISOSTOMO,F.S.M.; FREITAS, V.J.F.; Isolation and chacterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to espermadhesins. **Protein and Peptide Lettes**, v. 9, n.4 p.331-335. 2002.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids-binding proteins stimulat phospholipids efflux from epididymal sperm. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 768-776, 1999.

TÖPFER-PETERSEN E, ROMERO A, VARELA PF, EKHLASI-HUNDRIESER M. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia** v.30:p. 217-224, 1998.

TOPFER-PETERSEN E, EKHLASI-HUNDRIESER M, KIRCHOFF C, LEEB T, SIEME H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Anim Reprod Sci**, V. 89, p. 159-170, 2005.

TULI, R.K.; HOLTS, W. Effects of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 1359 – 1363, 1995.

TURNER, T.T.; REICH, G. W.; Influencia of protein in rat cauda epididymal lume fluid on cauda sperm motility. **Gam. Res.**, v. 18, p. 267-278, 1987.

UJIHARA, M.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; HAYAISHI, H.; IKAI, K; HAYAISHI, O. Prostaglandin D₂ formation and characterization of its syntetase in various tissues of adult rats. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 260, n. 2, p. 521-531, 1988.

UPRETI.G.C.; HALLE,EL.; KOPPENS, D., OLIVER J.E., VISHWANATH,R.;Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 iniditor activities in ream semen. **Animal Reproduction Science**.v. 56, p. 107-121, 1999.

URADE, Y.; FUJIMOTO, N.; HAYAISHI, O. Purifucation and characterization of rat brain prostaglandin synthetase. **J. Biol. Chem**, v. 260, n. 23, p 12410-12415, 1985.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M Effects of semen fraction and dilution rate on equine spermatozoal motilityparameeters. **Theriogenol .**, v.. 28, p. 709-723, 1987.

VESSELINOVITH, S. D. Electrophoresis of bovine sêmen. Part. III. Caracterization of the seminal plasma proteins. **Canad. J. Comp. Med.**, v. 23,n. 1 p. 10-20, 1959.

VINHA, N.A. Variação estacional na produção e qualidade do sêmen de *capra hircus* (seasonal variation in the production and quality of goat sêmen). **Arquivo da Escola de Veterinária UFMG**, v.27, p.23-28, 1975.

WALESS, R. G.; WHITE, I. G. The susceptibilty of spermatozoa to temperature shock. **J. Endocrinol.**, v. 19,p. 211-220, 1959.

WAY, A. L., GRIEL, JR L. C., KILLIAN, G. J. Effects of Accessory Sex Gland Fluid on Viability, Capacitation, and the Acrosome Reaction of Cauda Epididymal Bull Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 213-219, 2000.

WOLFE, D. F., BRADLEY, J. T., RIDDELL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083-1091, 1993.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: E. Knobil and J. D., NEILL (Eds). The Physiology of Reproduction. 2 nd ed., v. I. Raven Press LTD., New York, p. 189-317, 1994.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B. LUNDEHEIM, N. RODRIGUEZ MARTINEZ H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozenthawed sêmen from dairy Ai bulls. **Int J. Androl.** , 21 p. 207-216, 1998.

Capítulo III – EXPERIMENTO 1

Mapeamento eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana ao longo do ano no Nordeste do Brasil.

Ângela Valéria Coelho Teixeira¹; Ângela Maria Xavier Eloy²; João Ricardo Furtado³; Raymundo Rizaldo Pinheiro⁴

¹Mestranda Universidade Estadual Vale do Acaraú

angelazootecnia@yahoo.com.br

²Pesquisadora Embrapa Caprinos angela@cnpq.embrapa.br

³Assistente de Pesquisa Embrapa Caprinos ricardo@cnpq.embrapa.br

⁴Pesquisador Embrapa Caprinos rizaldo@cnpq.embrapa.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o mapeamento eletroforético uni-dimensional do plasma seminal ao longo do ano. O experimento teve duração de doze meses (Abril/2006 a Março/2007), ocasião em que foram realizadas 230 coletas de sêmen de cinco reprodutores caprinos (*Capra hircus*) adultos da raça Anglo-nubiana, com idade variando de 18 a 22 meses, pesando $42,0 \pm 10,0$ kg. Um *pool* de amostras do plasma seminal de todos os animais referente a cada mês do ano foi submetido à eletroforese unidimensional em SDS-PAGE. Os géis foram analisados através do programa Life Science Software da UVP, Inc. Analisando os géis ao longo do ano, observou-se a seguinte distribuição: bandas de massa molecular abaixo de 50 kDa foram as mais freqüentes ao longo do ano, vindo em seguida as de massa molecular entre 50 e 100 kDa e por último as de massa acima de 100 kDa. Estas últimas (>100kDa) apareceram em todos os meses do ano, sendo no entanto, bandas pouco citadas na literatura. O maior número de bandas ocorreu nos meses de setembro e outubro. A presença das bandas de massa molecular de 13 a 14 kDa; 20 a 30 kDa e 55 kDa foram observadas em todos os meses do ano. As de 16 e 16,5 kDa estavam presentes nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro. As evidências encontradas neste estudo mostram que as bandas protéicas têm distribuição variada ao longo do ano, e, levando em consideração que as proteínas apresentam importantes funções no processo de fertilização, sugere-se uma possível interferência dos fatores ambientais na qualidade do ejaculado em caprinos da raça Anglo-Nubiana na região do semi-árido do Nordeste do Brasil.

Palavra-chave: sêmen, proteínas seminais, eletroforese.

ABSTRACT

In face of the absence of works that investigate the proteins bands from goats along the year in Northeast of Brazil, this study aimed to map the bands distribution according to molecular mass along the year. The experiment last one year (April-2006 to March-2007), period in which were realized 230 semen collection from five goats (*capra hircus*) adults, with age varying from 18 to 22 months, weighting $42,00 \pm 10,0$ kg, belongings to Anglo Nubian breed. A pool from plasma seminal samples from all the animals concerning to each month of the year were submitted to one dimension electrophoresis SDS-PAGE. The gels were analyzed through Life Science Software from UVP, Inc. The gels analyze showed the following distribution: mass molecular

bands below 50 kDa were numerous along the year, followed by mass molecular bands between 50 and 100 kDa and finally bands up 100 kDa. These ones (>100kDa) were presents in all the months of the year, however, they are little cited in literature. The major numbers of bands happened on September and October. The presence of mass molecular bands of 13 to 14kDa; 20 to 30 kDa and 55 kDa were observed in all months of the year. The bands of 16 to 16,5 kDa were presents on August, September, October and November. The evidences found in this work shows varied distribution along the year and take in consideration that the proteins have important functions on fertilization process, it is suggested a possible interference on ambient factors on ejaculate quality in goats from Anglo Nubian breed in the semi arid area of Northeast of Brazil.

Key words: semen, plasma proteins, electrophoresis.

INTRODUÇÃO

Em observações realizadas em Centrais de Inseminação na região Nordeste, evidencia-se que em determinados períodos do ano os machos caprinos apresentam sêmen com melhor habilidade de congelação e, em outros, essa capacidade está ausente. Mesmo sendo a região Nordeste localizada próximo à Linha do Equador, apresentando, portanto, clima tropical, onde não há variação da duração do dia ao longo do ano, existem fatores como umidade do ar e oferta de alimento que em condições naturais podem afetar a qualidade do sêmen.

O estudo dos componentes do plasma seminal pode ser uma alternativa para avaliação do funcionamento do sistema reprodutor e da qualidade seminal de caprinos (Mendonza et al., 1989; Pinheiro et al., 1996a; Pinheiro et al., 1996b; Santos et al., 1998).

O plasma seminal contém secreções de origem testicular, epididimária e das glândulas sexuais acessórias (Evans e Maxwell, 1987), das quais os espermatozóides adquirem inúmeras proteínas durante o trânsito epididimário e na ejaculação, e que podem influenciar sua capacidade fecundante (Miller et al., 1990; Yanagimachi, 1994; Maxwell et al., 1999). As funções do plasma seminal de caprinos consistem na ativação da motilidade (Howard et al., 1978), na proteção contra a peroxidação dos lipídeos de membrana plasmática (Shoneck et al., 1996) e na capacitação espermática (Maxwell e Johnson, 1999; La Falci et al., 2002).

A técnica de eletroforese vem sendo utilizada para identificação e mapeamento dos componentes do plasma seminal em bovinos desde a década de 50 (Larson; e Salisbury, 1954). Os primeiros trabalhos utilizaram eletroforese em papel, gel de ágar, gel de amido e acetato de celulose (Szumowski, 1956). Atualmente, tem-se utilizado eletroforese uni ou bidimensional em gel de poliacrilamida (Manjunath Et Al., 1987; Killian et al., 1993; Brandon et al., 1999).

As proteínas do plasma seminal são parcialmente originárias do plasma sanguíneo e, parcialmente sintetizadas e secretadas pelos testículos (Kato et al., 1985), epidídimo (Turner e Reich, 1987) e glândulas vesiculares (Manjunath et al., 1994). Vários componentes protéicos do plasma seminal foram relacionados com os índices de fertilidade de reprodutores bovinos (Killian et al., 1993), suínos (Flowers, 1998) e eqüinos (Brandon et al., 1999) e com a congelabilidade (Roncoletta, 1999; Roncoletta et al., 1997, 1999, 2000) e a viabilidade do sêmen (Al Somai et al., 1994; Barrios et al., 2000). As diferenças na composição do plasma seminal em diferentes períodos do ano já foram observadas em bovinos através da eletroforese unidimensional por vários

pesquisadores, entre eles, Rocha et al., (1974); Martins Júnior et al., (1995); Roncoletta, (1999) e Roncoletta et al., (1997; 1999). O presente trabalho teve como objetivo analisar a distribuição, ao longo do ano, das proteínas presentes no plasma seminal de reprodutores caprinos através da eletroforese unidimensional.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados cinco caprinos (*capra hircus*) da raça Anglo-Nubiana, pesando $42,00 \pm 10,0$ kg, sexualmente maduros com idade entre 18 e 22 meses. O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos, localizada em Sobral - CE, situada geograficamente a $3^{\circ} 41'32''$ de latitude Sul, a $40^{\circ} 20'53''$ de longitude Oeste, a 75 metros de altitude apresentando clima semi-árido, com temperatura média mínima de 25°C e máxima de 28°C ; umidade média mínima de 57% e máxima de 81% e índice pluviométrico médio 653 mm. Os dados climatológicos da região de Sobral foram cedidos pela FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (Tabela 1). Os animais foram submetidos ao sistema de manejo semi-extensivo, recebendo capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum.*) cortado, feno de leucena, (*Leucaena leucocephala (Lam) de Wit.*), concentrado composto de 19% de milho (*Zea Mays.*), 7% de farelo de soja (*Glycine Max.*), 0,7% de sal mineral e 0,3% de sal comum. A oferta de alimento atendeu as recomendações estabelecidas pelo NRC (1985), recebendo os animais 300 g/dia de concentrado.

Tabela 1. Dados meteorológicos do município de Sobral, região Norte do Estado do Ceará, no ano de 2006 a 2007.

Mês	Médias do índice pluviométrico (mm)	Média da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Média da Umidade (%)
Janeiro/07	00	29	59,1
Fevereiro/07	260	26	78
Março/07	40	25,6	80,1
Abril/06	360	25,3	83,9
Mai/06	51	25	83,3
Junho/06	00	24,9	77,4
Julho/06	00	26,4	63,9
Agosto/06	00	27,5	57,1
Setembro/06	00	28,4	55,1
Outubro/06	00	28,7	54,3
Novembro/06	00	28,7	55,5
Dezemb/06	00	28,6	58,8

Fonte: FUNCEME: <http://www.funceme.br/DEPAM/index.htm> Acesso em: 10/03/2008, tendo em vista a fonte do site.

Dosagem de proteínas totais

Para análise das proteínas totais o sêmen foi centrifugado a 1000g durante 30 minutos à temperatura de 4°C . Em seguida, foi retirado o sobrenadante e o plasma foi transferido para tubos eppendorff e mantido à -4°C .

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) que baseia-se na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G250 às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro FP-901 (Chemistry Analyser Labsystems) pelo método de absorvância que representa a quantidade de luz que é absorvida, sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e tendo como padrão a Albumina Sérica Bovina (BSA).

Eletrforese unidimensional

Foi feito um *pool* das amostras do plasma seminal de todos os animais referente a cada mês, correspondente ao período de um ano e o mesmo foi submetido à eletrforese unidimensional (*SDS-PAGE*) em géis de 10 x 8 cm, com concentrações de 12 % de poliacrilamida, de acordo com o método descrito por Hames (1981).

Depois de feito o gel a 12% de poliacrilamida, colocou-se 10 μ l da amostra do plasma com concentração de 20 μ g de proteína por “poço” na placa de gel, e utilizou-se como padrão o kit LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION da Pharmacia Biotech., que apresenta as bandas de massas moleculares, a seguir: 94; 67; 43; 30; 20,1 e 14,4 kDa. A separação foi obtida em corrida eletroforética, com corrente elétrica de 40 miliampere, tensão elétrica de 170volts e potência de 7 watts por aproximadamente 2 horas. Na coloração do gel foi utilizado o corante Comassie Brilliant Blue G-250 por aproximadamente 2 horas, e em seguida, a descoloração, em solução de metanol a 30% e ácido acético à 7% em água bidestilada por 3 horas, para visualização das bandas. A seguir, os géis foram escaneados através de fotodocumentador (Bio Doc-IT and Visidoc-IT Gel Documentation systems, U. V. P.) e, então analisados pelo software (Doc-IT-LS 6.0).

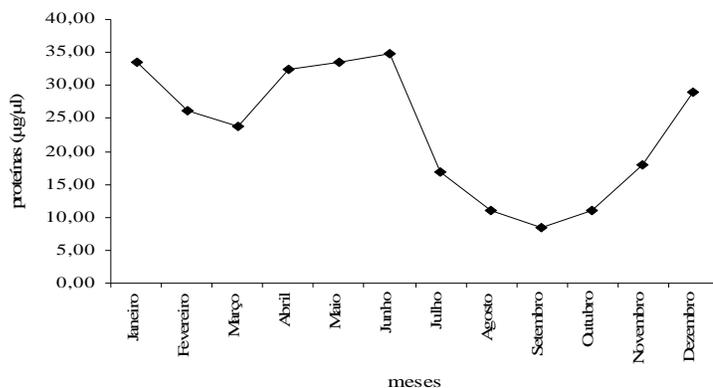
Para secagem do gel utilizou-se (metanol 50% e glicerol 1% em água bi-distilada) por 10 minutos e colocados entre duas folhas de celofane.

Análise estatística

Realizou-se a comparação entre os meses do ano das concentrações das proteínas totais. O nível de significância considerado nas decisões estatísticas foi de 5,0 % dentro do procedimento do G.L.M, utilizando-se o SAS (Statistical Analysis System) na versão 8.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A concentração média de proteínas totais foi de $23,23 \pm \mu\text{g}/\mu\text{l}$, variando de 8,47 a 34,89 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ao longo do ano (Gráfico 1), apresentando diferença estatística ($P < 0,05$) entre os meses.



Gráficos 1. Média das concentrações de proteínas totais do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-nubiana ao longo do ano no Nordeste do Brasil

As médias das proteínas totais obtidas ao longo do ano por Pinheiro et al. (1996b), trabalhando com animais da raça Moxotó e mestiça Parda Alpina, variou entre 34,1 e 42,7 µg/µl. Segundo estudo de Azerêdo (2003), a média geral de proteínas totais encontrada foi de 33,5 mg/ml em caprinos da raça Saanen, Anglo-nubiana e Bôer, na região semi-árida do Nordeste, dados esses superiores aos encontrados neste trabalho.

Jobim et al.(2003), em trabalho realizado com bovinos, verificaram que a concentração de proteínas totais do plasma seminal não é um indicativo da congelabilidade.

Analisando os géis ao longo do ano (Figuras 1 e 2) foi observada a seguinte distribuição: as massas moleculares das bandas protéicas variaram de 12 kDa a 145 kDa. As bandas de massa molecular abaixo de 50 kDa são as mais freqüentes ao longo do ano, vindo em seguida as bandas com valores entre 50 e 100 kDa e por último as de massa acima de 100 kDa. (Gráfico 2).

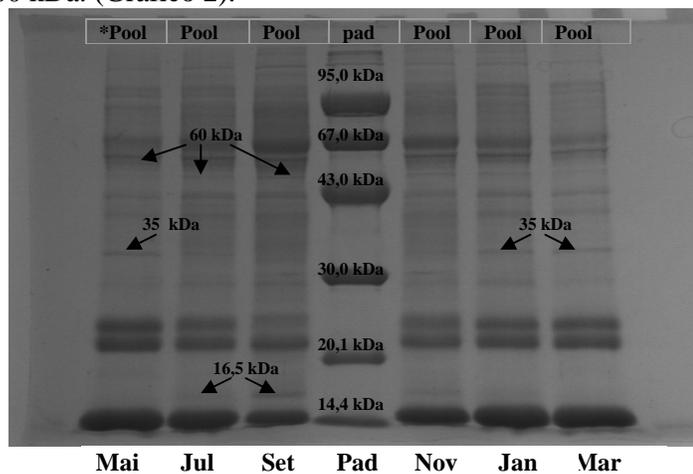


Figura 1. Gel de acrilamida 12% SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-nubiana nos meses de maio, julho, setembro, novembro, janeiro e março. Os marcadores de peso molecular foram 14,4 (Alpha-lactoalbumina); 20,1(Inibidor de Tripsina); 30,0 (Carbonic Anhydrase); 43,0 (Ovalbumina); 67,0 (Albumina Sérica Bovina) e 94,0 (Fosforilase B) do LMW Electrophoresis Calibration kit, Pharmacia Biothech.

* Cada coluna representa um *Pool* do plasma seminal de caprinos com 20µg de proteínas em 10µl da amostra.

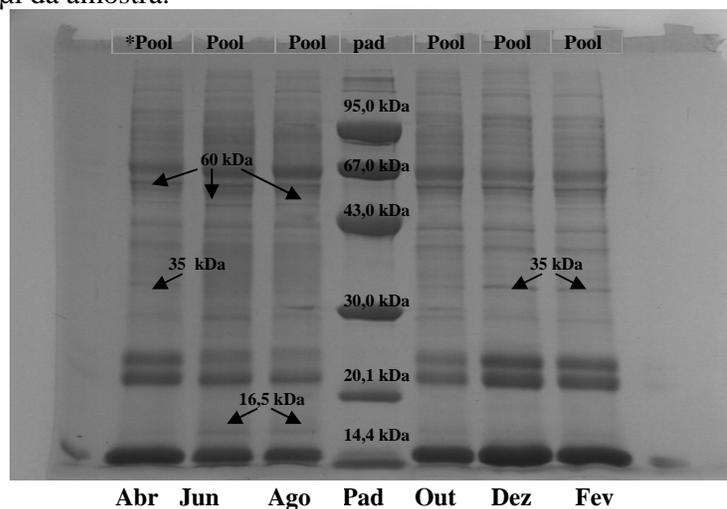


Figura 2. Gel de acrilamida 12% SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-nubiana nos meses de abril, junho, agosto, outubro, dezembro e fevereiro. Os marcadores de peso molecular foram 14,4 (Alpha-lactoalbumina); 20,1(Inibidor de Tripsina); 30,0 (Carbonic Anhydrase); 43,0 (Ovalbumina); 67,0 (Albumina Sérica Bovina) e 94,0 (Fosforilase B) do LMW Electrophoresis Calibration kit, Pharmacia Biothech.

* Cada coluna representa um *Pool* do plasma seminal de caprinos com 20 μ g de proteínas em 10 μ l da amostra.

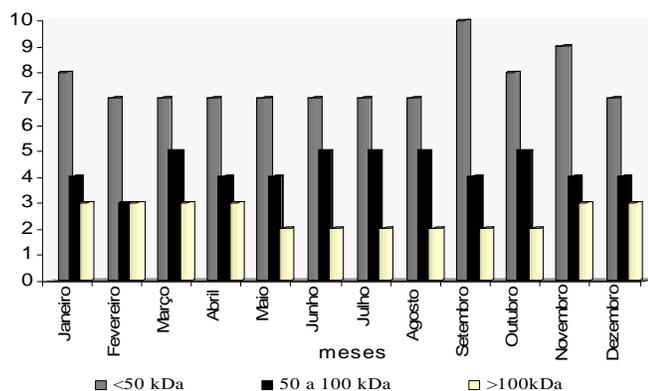


Gráfico 2. Distribuição das bandas protéicas do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil de acordo com a massa molecular ao longo do ano no.

O maior número de bandas ocorreu nos meses de setembro e novembro. Foram encontradas de 13 a 16 bandas protéicas nas amostras analisadas nos géis *SDS-PAGE*, sendo que todos os géis referentes a cada mês do ano não apresentaram menos de 13 bandas protéicas (Gráfico 3).

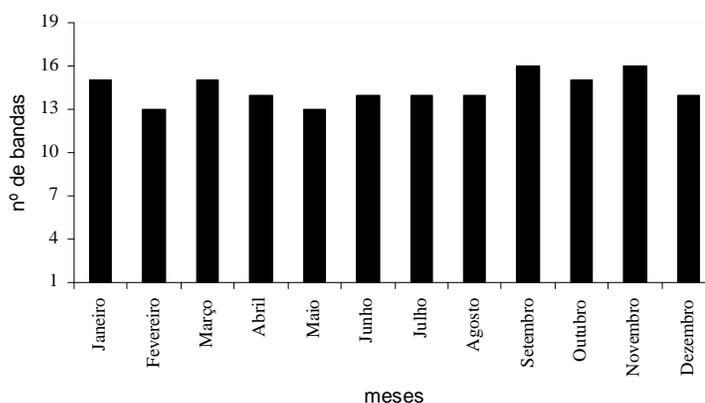


Gráfico 3- Distribuição do nº de bandas protéicas em gel de SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-nubiana ao longo do ano no Nordeste do Brasil.

Em trabalho realizado com bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) com proteínas de baixa massa molecular, Jobim et al., (2003) encontraram 12 bandas protéicas variando de 15 a 26 kDa. No presente estudo, as bandas de baixas massas moleculares presentes

em todos os ejaculados foram quatro, a saber: 13 a 14 kDa; 22 a 23 kDa; 25 a 26 kDa e 29 a 30 kDa. No entanto, no geral, incluindo as bandas de baixa e alta massa molecular, observou-se variação entre 13 e 150 kDa.

No sul do Brasil, La Falci et al. (2002) encontraram variação de bandas de diferentes massas moleculares em caprinos da raça Saanen nas diferentes épocas do ano.

A frequência das bandas de diferentes massas moleculares encontradas no gel está na Tabela 1, na qual se observa que as de massas moleculares de 16 a 16,5 kDa; 35 kDa e 60 kDa apresentam variação ao longo do ano, sendo portanto, as bandas que talvez sejam responsáveis por possíveis alterações na qualidade do ejaculado e na capacidade de congelamento do sêmen.

Pode-se supor que este número de bandas observadas seja resultado da análise realizada pelo software utilizado, o qual pode ter detectado bandas isoformas, ou seja, de massa molecular aproximada, formas essas comuns na proteômica, e que necessita de estudos mais avançados para se chegar a uma identificação.

Tabela 2. Frequência das bandas protéicas agrupadas de acordo com a massa molecular, em gel SDS-PAGE a 12% ao longo dos meses do ano no plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil

Bandas protéicas	Peso Molecular (kDa)	Frequência (%)
1	13 a 14,0	100
2	16 a 16,5	33,3
3	22 a 26	100
4	29 a 30	100
5	35-37	83,3
6	55	100
7	60	50
8	66	100
9	100 a 150	100

Para o processo de fecundação é necessária uma composição apropriada do plasma seminal para viabilizar os processos metabólicos do espermatozóide, tanto em situação de monta natural como no processo de congelamento do sêmen.

Muitos são os trabalhos com eletroforese para isolar e identificar as proteínas do sêmen, seja do espermatozóide ou do plasma seminal, mas poucos são os dados sobre o mapeamento das proteínas ao longo do ano.

Provavelmente a banda de massa molecular de 13-14 kDa, encontrada neste estudo, seja a espermedesina, uma glicoproteína presente no sêmen ou periféricamente associada à superfície do espermatozóide de vários animais domésticos, como suínos, bovino, equino e caprino (Tedesthi et al, 2000; Freitas e Davide, 2001).

As bandas relacionadas às BSPs A1 /A2, proteínas do plasma seminal bovino, de massa molecular de 16 e 16,5 kDa, só foram encontradas neste trabalho em 33% dos meses, mostrando que sofrem possível efeito de fatores ambientais. As BSPs contribuem com a remoção do colesterol e dos fosfolipídios da membrana espermática. (Manjunalh e Thériéon, 2002) e estão envolvidas na interação dos espermatozoides com o epitélio do oviduto, facilitando a manutenção da motilidade e viabilidade espermática durante o armazenamento temporário naquele órgão (Gwathmey et al. 2006). As dos tipos A1 e A2 estimulam ou mantêm a motilidade espermática e a atividade de ATPases ligadas à membrana espermática.

As bandas de massas moleculares de 30 kDa, encontradas em nosso estudo ao longo do ano, poderão estar relacionadas com as BSPs de 30 kDa citadas na literatura (Moura et al., 2007b; Killian, 1993).

Com relação as bandas de 22 a 26 kDa, provavelmente correspondendo à prostaglandina D sintetase tipo lipocalina, uma proteína de 26 kDa, pI 6,2 relacionada à alta fertilidade de reprodutores bovinos (Killian et al, 1993). Também Poyser, (1981) cita que as prostaglandinas do plasma seminal regulam a motilidade espermática e o transporte de espermatozóides para alcançarem o oviduto, onde se dará a fecundação.

As glicoproteínas de massa molecular de 55 kDa, pI 4,5 já identificadas e isoladas da matriz óssea bovina, cartilagens, pele fetal, cérebro, rins, ovários, útero, bem como da urina, bile e leite bovino (Kerr et al., 1991 Sorensen e Petersen, 1993), e também secretadas pelo plasma seminal (Fanzen e Heinegard, 1985; Jobim et al., 2002) são as chamadas osteopontinas. É uma molécula multifuncional, tipicamente envolvida nos processos de adesão celular e remodelamento de tecidos, estando identificada como uma proteína de fertilidade em touros, e considerada também como um dos marcadores de alta fertilidade existente no plasma seminal de bovino, dados esses obtidos através de eletroforese bidimensional (Killian et al 1993). Segundo Cancel et al., (1997) a osteopontina liga-se à receptores na superfície do epitélio celular, podendo apresentar uma função protetora em infecções bacterianas. De acordo com Moura (2005), esta proteína participa também na interação entre espermatozóides e oócito durante a fertilidade. Neste trabalho, observou-se a presença de uma banda de massa molecular de 55 kDa em todos os meses do ano, mostrando que possivelmente esta proteína não sofra influência dos fatores ambientais na região semi-árida do Nordeste, cuja temperatura e umidade média variam de 24,9 a 29,0 °C e de 54,3 a 83,9 °C, respectivamente.

Pellicer-Rubio et al, (1997) estudando as proteínas do plasma seminal de caprinos encontraram uma glicoproteína de 60 kDa, e relatam que esta proteína promove uma diminuição na porcentagem da motilidade espermática.

A banda de massa molecular de 67 kDa observada neste estudo, provavelmente esteja relacionada à albumina, proteína que está envolvida com a extração do colesterol da membrana plasmática que irá ocorrer em áreas restritas da membrana, promovendo um deslocamento dos fosfolípídeos causando um re-arranjo de sua arquitetura (Yanagimachi, 1994, Flesch e Gadella, 2000). Nas espécies humana e bovina, onde a membrana plasmática é rica em colesterol, tais eventos não são evidenciados na mesma velocidade como nas espécies com um baixo nível, no caso a suína e ovina. Devido a esse fato, o tempo para capacitação espermática varia, sendo verificada a necessidade de um maior tempo naquelas espécies com altos níveis de colesterol na membrana (Flesch e Gadella, 2000).

Vários autores, como Szumowski (1956), Szumowski e Pernod (1958) e Rocha et al, (1974) trabalhando com bovinos, relacionaram a elevação da concentração de albumina no plasma seminal com a presença de problemas na espermiogênese. Também Davis et al., (1979), Visconti et al., (1998), Osheroff et al., 1999 e Wu et al., (2001) afirmam que a albumina, presente no trato genital da fêmea, promove o efluxo do colesterol e outros fosfolípídios de membrana que ocorrem na capacitação. Jobim et al., (2002) trabalhando com bovinos relatam que a maior quantidade de albumina em reprodutores de alta congelabilidade, pode estar relacionada com a capacidade do mesmo em participar das modificações de permeabilidade da membrana espermática.

CONCLUSÃO

Bandas protéicas presentes no plasma seminal, possivelmente relacionada com as proteínas ligadas à fertilidade, mostraram melhor distribuição, sugerindo que os animais da raça Anglo-nubiana na região semi-árida do Nordeste não apresentam variação na capacidade fecundante do sêmen ao longo do ano.

Bandas protéicas relacionadas com as proteínas identificadas como ligadas à congelabilidade, mostraram menor uniformidade de distribuição ao longo do ano, sugerindo que os caprinos da raça Anglo-nubiana apresentam períodos de maior e menor capacidade de congelação do sêmen na região semi-árida do Nordeste.

De acordo com a frequência das bandas ao longo do ano, as de 16 a 16,5 kDa; 35 a 37 kDa e de 60 kDa são bandas que podem vir a ser consideradas como marcadores moleculares de fertilidade ou congelabilidade;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AZERÊDO, G. A. Avaliação das características seminais, dos níveis séricos de testosterona e do perfil protéico de ejaculados caprinos por eletroforese bidimensional. 2003. 84p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal –SP.
- AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P. et al. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v.6, p.165-171,1994.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, Zoragoza, v.63, p. 1531-1537. 2000.
- BRADFORD. M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding . **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDON, C. I., HEUSNER, G. L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p. 863-873, 1999.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 454-460, 1999.
- CANCEL, A.M., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v. 57, n.6, p. 1292-301, 1997
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. **Belo Horizonte**: CBRA, 1998.
- FLOWERS, W. L. Boar fertility and artificial insemination. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., Birmingham. **Proceedings...** Birmingham: International Pig Veterinary Society, 1998. p.45-52, 1998
- DAVIS, B. K . ; BYRNE, R.; HUNGUND, B. Studies on the mechanism of capacitation, II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation **Biochim. Biophys. Acta**, v. 558, p. 257-266,1979.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 4. Semen y sus características. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.25. 1990.

FLOWERS, W. L. Boar fertility and artificial insemination. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: **International Pig Veterinary Society**, 1998. p.45-52.

FLESCHE, F.M. GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, p. 715-724, 1985.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS, (FUNCEME) – 2008- Fortaleza – Dados de pluviosidade, temperatura e umidade. Disponível em <http://www.funceme.br/DEPAM/index.htm>. Acesso em 03/01/2008.

GWATHMEY, T.M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30KDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p501-507, 2006.

HAMES, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis, in Hames, B. Richwood, D. (Ed) . **Gel Electrophoresis: a Practical approach**. Washington D.D.; IRL Press. p. 1-86, 1981.

J.L. LARSON; D.J MILLER. **Journal of Dairy Science**., v.83, p.2473-2479, 2000.

JOBIM, M. I.M., OBERST, R. E., SALBEGO, G. C.;; SOUSA, O. D., WAL, B.V., MATOOS, C . R., Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientia Veterinariae**. V. 1 p. 21-30, 2003.

KATO. M. ; SUNG, W. K. ; KATO, K; GOODMAN, D.S. Immunohistochemical study on the localization of cellular retinol binding protein in rat testis and epididymis. **Biol. Reprod.**, v, 32, p. 172 -189, 1985.

KILLIAN G.J., CHAPMAN D.A. & ROGOWSKI L.A.. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**. 49: 1202-1207, 1993.

KERR, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D. The cDNA clone and distribution of bovine osteopontin. **Gene, Amsterdam**, v. 108, p. 237-243, 1991.

LA FALCI V. S. N., TORTORELLA, H., RODRÍGUES, J. L., BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, p. 1035-1048, 2002.

LARSON, B. L.; SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretic studies. **Journal Biology Chemistry**, v.206, n.2, p.741-749, 1954.

M.A. HENAULT; G.J. KILLIAN. **Journal of Reprodução and Fertility**, 108, 199-204, 1996.

MANJUNATH, P. THPERIEN, I. Role of seminal phospholip-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R., UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reproduction**, v.7, n.3, p.231-238, 1987.

MANJUNATH. P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E; DESNOYERS, L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 50, p.27-37, 1994.

MARTINS JÚNIOR, A.; RAMOS, P.R.R.; SILVA, R.L. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de touros de origem européia e zebuína. In: **CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL**, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.272, 1995.

MAXWEL, W.M.C.O., JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p.1273-80, 2000.

MENDOZA, G.; WHITE, I.G.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, Sydney, v. 32 (3), p. 455-66, 1989.

MOURA, A. A Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v.2, n.1 p. 3-10, 2005.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 74, p.214 - 222, 2007b.

MILLER, D. J.; WINER, M. A; AX, R. L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biol. Reprod.**, v. 42, p. 899-915, 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **Nutrient requirement of sheeps**: 6 ed. Washington: National Academy Press, P. 99, 1985.

NAUC V.& MANJUNATH P.. Radioimmunoassay for bull **seminal plasma** proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in **seminal plasma** and sperm. *Biology of Reproduction*. 63: 1058-1066, 2000.

OSHEROFF, J.E., VISCONTI, P.E., VALENZUELA, J. P. et. al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. **Mol. Hum reprod.**, v. 5. p. 1017-1026, 1999.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Níveis de Cálcio, Fósforo, Magnésio e pH do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 33, Fortaleza, **Anais ...** Fortaleza, p. 419-421, 1996a.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros bioquímicos do PS de 3 tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33, Fortaleza, **Anais**. Fortaleza, p. 416-418. 1996b.

PELLICER-RUBIO, M-T., MAGALLON, T., COMBARNOUS Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulborethel 60-Kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase. **Biology Reproduction** v.57, n 7-8p. 1023-1031, 1997.

ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S., FERREIRA NETO, J.M. et al. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus com alterações reprodutivas. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.26, n.2, p.223-233, 1974.

RONCOLETTA, M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade de sêmen de touros., 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 1999.

RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.13, n.2, p.135-140, 1997.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C. ; FRANCHESCHINI, P. H. et al. Caracterização da proteína 26KDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.323, 2000.

SANTOS , D. O., AZEVEDO, H. C.; SALLES, H. O . Efeito da insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de bodes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 283-286, 1998.

SCHONECK, C.; BRAUN, J; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenol.**, v. 45, n. 3, p. 633-642,1996.

SORENSEN, E. S., PETERSEN, T. E. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, **Cambridge**, v.60, p. 198-197, 1993.

SZUMOWSKI, P. Quelques résultats de l' examen électrophorétique des protéines du plasma seminal de taureau. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 3., 1956, Cambridge. **Proceedings....** Cambridge,. p.37 - 42, 1956.

SZUMOWSKI, P.; PERNOD, E. Étude électrophorétique et immuno-électrophorétique des protéines du plasma seminal dans la recherche des troubles de la fertilité du mâle. **Rec. Méd. Vet.**, v. 135, p. 937 - 946, 1959.

TURNER, T.T.; REICH, G. W.; Influencia of protein in rat cauda epididymal lumen fluid on cauda sperm motility. **Gam. Res.**, v. 18, p. 267-278, 1987.

TEDESTHI G., OURGE E, MORTARINO M., NEGRI A. & RONCHI S. Purification and primary structure of a spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, 20, 6175-6179, 2000.

VISCONTI, P.E. GALATINO-HOMER, H. MOORE, G.D. et. al The molecular basis of sperm capacitation. **J. Androl.**, v, 19. p; 242-248, 1998.

WU, C.J.; STOJANOV. T.; CHAMI, O. et al. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. **J. Biol Chem. Paper in Press**. Published on May 11, 2001 as manuscript M103107200, p. 1-33, 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: E. KNOBIL and J.D.NEILL (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2 nd., v. I. **Raven Press LTD.**, New York, p. 189-317, 1994.

Capítulo IV – EXPERIMENTO 2

Variação sazonal dos parâmetros e das proteínas seminais de caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil

Angela Valéria Coelho Teixeira¹; Angela Maria Xavier Eloy²; João Ricardo Furtado³

¹Mestranda Universidade Estadual Vale do Acaraú

angelazootecnia@yahoo.com.br

²Pesquisadora Embrapa Caprinos angela@cnpq.embrapa.br

³Assistente de Pesquisa Embrapa Caprinos ricardo@cnpq.embrapa.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a correlação entre os parâmetros seminais com os períodos chuvoso e seco e observar o comportamento do perfil das bandas protéicas nestes períodos em caprinos da raça Anglo-Nubiana na região semi-árida do Nordeste do Brasil. O experimento foi realizado no período chuvoso (abril e maio) e no período seco (outubro e novembro), ocasião onde foram realizadas coletas de sêmen de 05 reprodutores caprinos (*capra hircus*) da raça Anglo-Nubiana. Em todas as coletas foram realizados espermogramas, determinações de proteínas totais do plasma seminal, além de eletroforese unidimensional em *pool* de amostras de todos os animais em cada mês avaliado. Observou-se que o volume, aspecto e concentração espermática apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre o período chuvoso e o seco, enquanto que a motilidade e o vigor não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$). A temperatura do ar apresentou correlação positiva moderada ($r = 0,48$) com o aspecto e com a concentração de proteínas no plasma seminal ($r = 0,52$). A umidade apresentou correlação positiva moderada ($r = 0,45$) com o volume e com as proteínas totais ($r = 0,50$) e correlação negativa moderada ($r = -0,58$) com o aspecto e com a concentração espermática ($r = -0,67$). O volume apresentou correlação negativa moderada ($r = -0,57$) com o aspecto e com a concentração ($r = -0,56$) e correlação positiva moderada ($r = 0,68$) com as proteínas totais. Quanto ao comportamento das bandas protéicas, identificou-se na época seca uma banda com massa molecular de 16 kDa, a qual não foi encontrada na época chuvosa, por outro lado, foram encontradas bandas de massas moleculares provavelmente ligadas a fertilidade em ambos os períodos. As bandas protéicas presentes no período seco apresentaram uniformidade entre os meses estudados (outubro e novembro), o mesmo não acontecendo com as bandas no período chuvoso. Embora os parâmetros espermáticos (aspecto, volume e concentração) sofram influência da estação do ano no semi-árido, a motilidade e o vigor são isentos destas variações, não afetando, portanto, a qualidade do sêmen. As proteínas seminais dos caprinos sofrem influência das estações chuvosa e seca, como também a distribuição das bandas protéicas.

Palavra-chave: sêmen, proteínas plasmáticas, época do ano, eletroforese.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the relation between the seminal parameters and the rainy and dry periods and to observe the profile proteins bands behavior in these periods in Anglo Nubian goats in semi arid region from Northeast of Brazil. The

experiment was realized in the rainy period (April and May) and dry period (October and November), occasion in what the collections were realized from five Anglo Nubian goats reproducers (*capra hircus*).

In all the collections were realized semen analyses, total proteins determination besides the electrophoresis one dimension in pool of samples from all the animals from every month studied. It was observed that semen volume, aspect and spermatic concentration showed significant difference ($P < 0,05$) between the rainy and dry season, while the motility and vigor didn't show statistical difference ($P > 0,05$). The temperature showed moderate correlation ($r = 0,48$) with aspect and with proteins concentration ($r = 0,52$). The humidity showed moderate correlation ($r = 0,45$) with volume and total proteins ($r = 0,50$) and negative moderate correlation ($r = -0,58$) with aspect and spermatic concentration ($r = -0,67$). The volume showed negative moderate correlation ($r = -0,57$) with aspect and with concentration ($r = -0,56$) and moderate correlation ($r = 0,68$) with total proteins. Concerning to proteins bands behavior it was identified a mass molecular band of 16 kDa, that was not found in the rainy season, for other hand, it were found mass molecular bands probability related to fertility in both periods. The proteins bands found in the rainy season didn't show uniform distribution between the studied months (April and May), the same didn't happening with the bands present at dry season. Although the spermatic parameters (aspect, volume and concentration) are under influence of the season in semi arid area, the motility and vigor aren't under effect of it, therefore there aren't alteration on semen quality. The seminal proteins from goats are under effect of rainy and dry season, as well the distribution of proteins bands.

Key words: semen; plasmatic proteins, season of the year; electrophoresis

INTRODUÇÃO

Alguns estudos demonstraram haver diferença na qualidade do ejaculado de pequenos ruminantes entre as estações do ano em clima temperado (Eaton e Simmons, 1952; Colas, 1980; Nunes, 1982; Roca et al., 1992; Tuli e Holtz, 1995), e muitos destes atribuíram tais diferenças ao fotoperíodo.

Na região semi-árida do Nordeste, de acordo com (Silva e Nunes, 1984), os efeitos climatológicos delimitados como época seca e chuvosa interferem na disponibilidade de alimentos, temperatura e atividade sexual do macho caprino e ovino deslanado. É bem conhecido que temperaturas ambientais elevadas exerçam efeitos depressivos na qualidade do sêmen, podendo produzir algumas alterações como, aumento do pH e da porcentagem de espermatozóides anormais, diminuição da motilidade, da concentração espermática, do volume e da porcentagem de espermatozóides móveis (Corteel, 1981). Então nesse sentido, o sistema termorregulador atua com o objetivo de manter constante a temperatura intracelular e assim manter a qualidade do sêmen (Kastelic et al., 1996).

Dentro das condições climáticas do Nordeste do Brasil, o fator temperatura do ar parece exercer um papel fundamental nas variações qualitativas do sêmen caprino, e a ocorrência das chuvas ameniza as temperaturas e contribuem ainda para uma maior disponibilidade de pastagens que influência diretamente no aspecto nutricional dos animais (Nunes, 1984)

Existem variáveis que podem afetar a qualidade do sêmen, tais como: época do ano (Nunes; Freitas, 1989; Machado; Simplicio, 1991), raça (Corteel, 1977; Machado;

Simplicio,1991), indivíduo (Machado Et Al, 1991), e manipulação do sêmen (Everett; Bean, 1982).

De acordo com Mendonza et al., (1989); Pinheiro et al., (1996a) e Santos et al., (1998), investigações sobre os componentes bioquímicos do plasma seminal podem ser considerados como uma alternativa para avaliação do funcionamento do sistema reprodutor e da qualidade seminal de reprodutores caprinos. Pinheiro et al. (1996a) observaram que os componentes do plasma seminal, frutose, ácido cítrico e proteínas totais estão relacionados com a disponibilidade de alimento, apresentando valores estatisticamente ($P < 0,05$) inferiores no período seco no Nordeste do Brasil.

Martinez e Eloy (2004) observaram no Nordeste que o período seco foi o que apresentou maior número de doses aprovadas pós-congelação de sêmen caprino, em levantamento realizado na Central de Inseminação da Embrapa Caprinos.

Peréz-Pé et al. (2001) estudaram a variação estacional do plasma seminal de ovinos na Espanha e observaram diferença quanto às proteínas seminais através da eletroforese bidimensional (2D). Também La Faci et al. (2002), trabalhando com caprinos no sul do Brasil, observaram que as concentrações das moléculas protéicas estão sob o controle da estação do ano, mostrando diferenças entre as estações reprodutivas e não reprodutivas.

Trabalhos com proteínas seminais investigando sua relação com as estações do ano são ainda raros no Brasil, em especial na espécie caprina na região Nordeste.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros seminais nas épocas chuvosa e seca e investigar o comportamento das bandas protéicas nestes períodos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados cinco caprinos (*capra hircus*) da raça Anglo-nubiana, pesando $42,00 \pm 10,0$, sexualmente maduros com idade entre 18 e 22 meses. O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos, localizada em Sobral-CE, situada geograficamente a $3^{\circ} 41' 32''$ de latitude Sul, a $40^{\circ} 20' 53''$ de longitude Oeste, a 75 metros de altitude apresentando clima semi-árido, com índice pluviométrico anual de 653 mm. temperatura de 27°C e umidade média anual de 67%, variando nas épocas chuvosa e seca, respectivamente, de 25°C a 28°C e 81% a 57%. Os dados climatológicos da região de Sobral foram cedidos pela FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Os animais foram submetidos ao sistema de manejo semi-extensivo, recebendo capim elefante a vontade (*Pennisetum purpureum Schum.*) cortado, e feno de leucena à vontade, (*Leucaena leucocephala (Lam) de Wit.*), concentrado à base de milho (*Zea Mays.*) e mistura mineral, sendo a alimentação oferecida de acordo com os padrões estabelecidos pelo NRC (1985).

Tabela 1- Dados meteorológicos referentes ao período chuvoso (abril,maio) e seco (outubro, novembro) em Sobral, região Norte do estado do Ceará, no ano de 2006.

Mês	Médias do índice pluviométrico (mm)	Média da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Média da Umidade (%)
Abril	360	25,3	83,9
Maio	51	25	83,3
Outubro	00	28,7	54,3
Novembro	00	28,7	55,5

FUNCEME: <http://www.funceme.br/DEPAM/index.htm> Dados fornecidos em 2008.

Avaliação do sêmen

As coletas do sêmen foram realizadas semanalmente ao longo dos meses de abril, maio, outubro e novembro, pelo método da vagina artificial, com auxílio de uma fêmea estrogonada.

Na avaliação física do sêmen, foi considerado o volume do ejaculado, a motilidade espermática progressiva retilínea, o aspecto, o vigor e a concentração espermática, seguindo os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

O volume foi determinado em (mL) pela leitura do tubo de colheita graduado em mililitros e mantido em banho-maria à 37° C. O aspecto foi classificado numa escala de 1-6, sendo: (1) aquoso, (2) aquoso espesso, (3) leitoso, (4) leitoso espesso, (5) cremoso, (6) cremoso espesso.

Para análise da motilidade (% de espermatozoides móveis), e do vigor, o sêmen foi diluído a uma concentração final de 60 – 200 x 10⁶ espermatozoides/ml e as características foram avaliadas depositando-se uma gota de 10ul de sêmen diluído entre lâmina e lamínula e examinada ao microscópio óptico (200x). A percentagem de espermatozoides móveis foi estimada pelo exame visual sucessivo de 5 campos e ao mesmo tempo, dentre os móveis, avaliou-se o percentual de espermatozoides que apresentam um movimento retilíneo e rápido. O vigor da motilidade foi avaliado utilizando uma escala de notas subjetivas de 0 a 5, sendo que para esta estimação levou-se em consideração a velocidade de deslocamento nos espermatozoides, sobretudo dos que apresentam um deslocamento progressivo, trajetória retilínea e movimentos laterais e em círculo (Chemineau, et al 1991).

A concentração espermática por ejaculado foi determinada pela contagem de espermatozoides no espectrofotômetro (Spectronic 20) utilizando uma amostra de sêmen de 10ul diluída em 4ml de uma solução-salina-tamponada (1/400).

Dosagem de proteínas totais

Para análise das proteínas totais o sêmen era levado para separação e obtenção do plasma seminal através de centrifugação a 1000g durante 30 minutos à temperatura de 4° C. Em seguida era retirado o sobrenadante e o plasma transferido para tubos eppendorff e mantido à – 18°C.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), o qual baseia-se na ligação do corante (Comassie Brilliant Blue)G250 às proteínas, através da absorbância de luz. A presença de proteínas pode ser observada por espectrofotômetro, sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e tendo como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

Análise estatística

Os dados referentes aos parâmetros seminais nos dois períodos (chuvoso e seco) foram submetidos à análise de variância utilizando GLM (General Linear Models) do SAS.

Foram feitas correlações entre os parâmetros seminais, proteínas totais e dados meteorológicos (temperatura, umidade e pluviosidade) utilizando Pearson Correlation Coefficient pelo (Tukey) (Prob > 0,05) SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O volume, a concentração e o aspecto do sêmen apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) entre os períodos chuvoso e seco, enquanto o vigor e a motilidade não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$). Na tabela 2 encontram-se as médias com os desvios padrões referentes ao volume, a concentração, ao aspecto, ao vigor e à motilidade espermática.

Tabela 2 - Distribuição das médias de volume, concentração do sêmen, aspecto, vigor e motilidade observadas nos ejaculados nos períodos chuvoso e seco em caprinos da raça Anglo-nubiana no Nordeste do Brasil

Características	Chuvosa	Seca
Volume	$0,85 \pm 0,08$ mL	$0,61 \pm 0,07$ mL *
Concentrações (x 10 ⁶ /mm ³)	$4,1 \times 10^6$ /mm ³	$4,6 \times 10^6$ /mm ³ *
Aspecto	$4,05 \pm 0,27$	$5,35 \pm 0,07$ *
Vigor	$3,65 \pm 0,21$	$3,71 \pm 0,12$
Motilidade	80,2%	79%

($P < 0,05$)

Vilar Filho et al, (1993), estudando as características seminais de caprinos criados na região semi-árida do estado da Paraíba, sendo as seguintes raça, Anglo-Nubiana, Alpina e Canindé, relataram que os resultados de parâmetros seminais encontrados apresentaram similaridade entre as três raças investigadas, com valores médios de volume $0,60 \pm 0,04$ ml, motilidade $56,9 \pm 5,10$ e concentração de $2,98 \pm 0,43$ bilhões de espermatozoides por ml.

De acordo com Kumi-Diaka et al.(1981) não houve variação significativa na concentração de espermatozoides, no percentual de células vivas e anormais em bovinos indígenas (nativos) mas, nas raças exóticas houve uma significativa flutuação com maior número de células anormais, baixa percentagem de células vivas e baixa concentração de células espermáticas durante os períodos quentes em regiões de clima tropical, sugerindo que o estresse térmico nos trópicos tem efeito adverso sobre a espermatogênese em animais não adaptados.

A quantidade de proteínas totais no plasma seminal apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os períodos chuvoso e seco, com médias de $32,9 \pm 0,79$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $14,43 \pm 4,8$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente. (Gráfico 1).

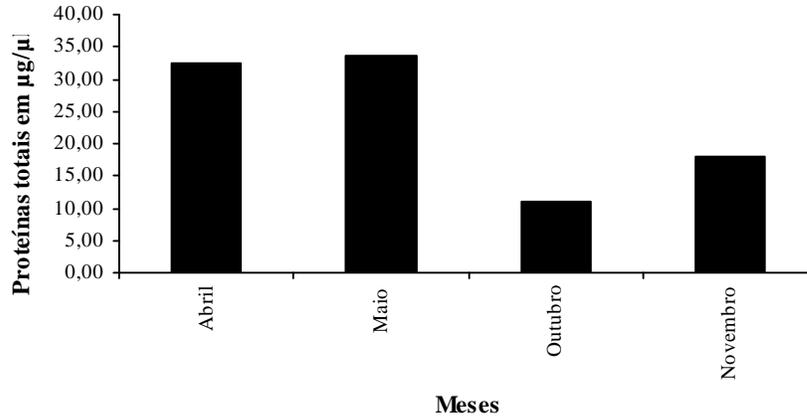


Gráfico 1 - Média das proteínas totais do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no período chuvoso (abril, maio) e seco (outubro, novembro).

Analisando as correlações entre as variáveis estudadas verificou-se que a temperatura do ar apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) e correlação positiva moderada ($r = 0,48$) com o aspecto e com a concentração de proteínas no plasma seminal ($r = 0,52$). A umidade apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) e correlação positiva moderada ($r = 0,45$) com o volume e com as proteínas totais ($r = 0,50$) e correlação negativa moderada ($r = -0,58$) com o aspecto e com a concentração espermática ($r = -0,67$). O volume apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) e correlação negativa moderada ($r = -0,57$) com o aspecto e com a concentração ($r = -0,56$) e correlação positiva moderada ($0,68$) com as proteínas totais.

A pluviosidade não apresentou correlação com os parâmetros seminais, no entanto, sua interferência provavelmente ocorre indiretamente através da umidade do ar e também por estimular o florescimento das pastagens, proporcionando maior oferta de alimentos.

Jobim et al. (1988) constataram que a época do ano influenciou significativamente na concentração espermática de ejaculados caprinos das raças Saanen e Anglo-nubiana, concordando com os achados desse estudo no qual foi observada diferença estatística significativa com relação à concentração entre os períodos chuvoso e seco.

Pinheiro et al. (1996b) e Martinez e Eloy (2005) estudando o sêmen da espécie caprina no Nordeste do Brasil encontraram valores de proteínas totais superiores no período chuvoso ($42,7 \pm 0,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), corroborando com os achados deste trabalho. No entanto, Duncar et al. (1983) encontraram em caprinos Angorá valores de proteínas de $29,9 \pm 2,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, no período chuvoso, portanto, inferiores aos nossos dados encontrados.

Vinha (1974), investigando a influência das estações sobre o sêmen de caprinos da raça Anglo-nubiana observaram que o volume e a motilidade foram maiores no período chuvoso e a concentração espermática foi maior no período seco, resultados que coincidem com os obtidos neste trabalho.

Karagiannidis et al. (2000) observaram uma diferença em quase todas as características do sêmen de caprinos das raças Alpinas, Saanen e Damascus, na Grécia, havendo uma variação significativa nas características quantitativas do sêmen (volume, concentração/mL e concentração total de espermatozoides por ejaculado) e qualitativas (percentagem de espermatozoides móveis, percentagem de espermatozoides anormais e taxa de motilidade progressiva). No entanto, esses autores concluíram que a magnitude

da variação estacional não foi suficiente para impedir que os caprinos sejam utilizados em estações de cobertura ao longo do ano.

Goeritz et al. (2003) trabalhando com cervos em um curto período (metade de Julho a metade de Agosto) na Alemanha, observaram que a atividade reprodutiva dos machos está associada com a variação circadiana anual entre crescimento e involução de ambos testículos e das glândulas acessórias. Observaram que a maioria do trato reprodutivo mostrou variação com relação ao tamanho e textura nos períodos antes, durante e depois da estação de reprodução. Estas variações aconteceram mais pronunciadamente nos testículos, nas glândulas vesiculares e na próstata, e houve correlação entre a produção de espermatozoides móveis e normais com a concentração de proteínas do plasma seminal e com a concentração de testosterona no plasma seminal e no soro sanguíneo. Com base nesses achados, os autores acima mencionados, sugerem a importância da ação conjunta dos testículos e das glândulas acessórias e o relevante papel da testosterona para a intensificação da produção de espermatozoides normais na estação de reprodução.

As análises dos géis mostram a presença de bandas de massa moleculares de 12 kDa a 153 kDa distribuídas nos períodos chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) (Figura 1, Tabela 3).

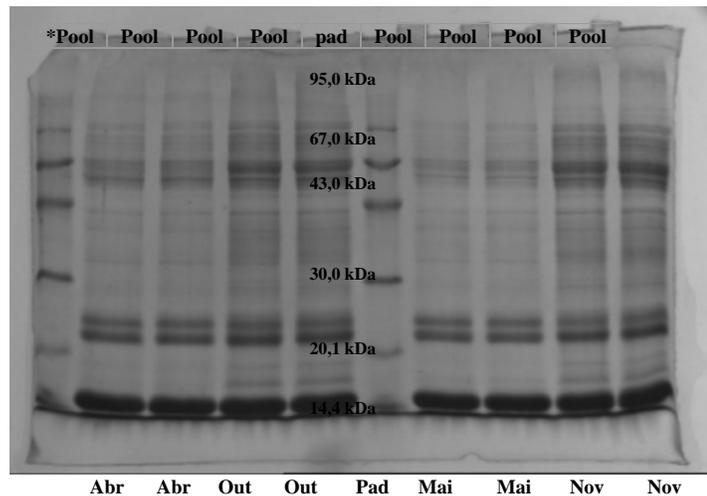


Figura 1. Gel de acrilamida 12% SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-nubiana nos meses de abril, maio, outubro e novembro. Os marcadores de peso molecular foram 14,4 (Alpha-lactoalbumina); 20,1 (Inibidor de Tripsina); 30,0 (Carbonic Anhydrase); 43,0 (Ovalbumina); 67,0 (Albumina Sérica Bovina) e 94,0 (Fosforilase B) do LMW Electrophoresis Calibration kit, Pharmacia Biothech.

* Cada coluna representa um *Pool* do plasma seminal de caprinos com 20µg de proteínas em 10µl da amostra

Na tabela 3 e nos gráficos 2 e 3 observam-se bandas protéicas diferentes entre os períodos estudados, mostrando ausência e presença de bandas distintas nos dois períodos.

As bandas de massas moleculares altas, acima de 100 kDa, são pouco citadas na literatura, havendo dificuldade em realizar uma comparação e discussão detalhada com os dados desse trabalho.

Tabela 3. Distribuição das bandas protéicas de acordo com a massa molecular nos períodos chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) em caprinos da raça Anglo-Nubiana no Nordeste do Brasil.

Distribuição das bandas protéicas (massa molecular - kDa)	
Período chuvoso (Abril – Maio)	Período seco (Outubro – Novembro)
153	146
130 a 124	137
109	120
102 a 92	100
73 a 64	91
60,5 a 55	70
46 a 43	62
40 a 39	59
34 a 33	54 a 53
30 a 29	45
24	40
22	34
14 a 12	31 a 29
	24
	22
	16
	14

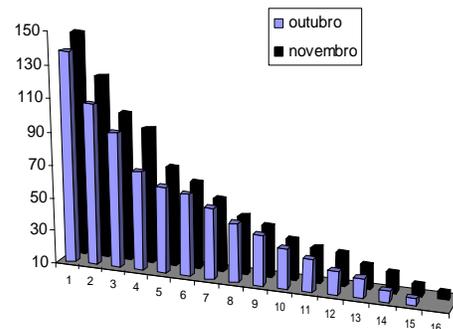
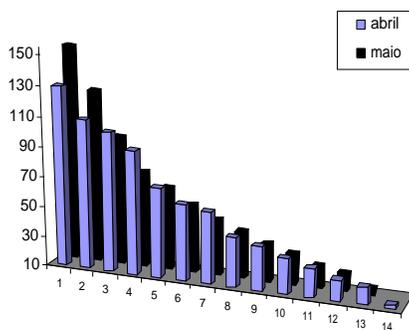


Gráfico 2 e 3. Massa molecular (kDa) das bandas protéicas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana no período chuvoso (abril e maio) e seco (outubro e novembro) na região semi-árida do Nordeste.

Uma banda protéica de 178 kDa foi observada por La Falci et al. (2002) unicamente na estação reprodutiva em caprinos Saanen no sul do Brasil. Também observaram uma diminuição das proteínas de 119 kDa e um aumento das proteínas de 73 kDa a 104 kDa na estação reprodutiva. Com base nestes resultados, os autores sugerem que algumas proteínas do plasma seminal de caprinos estão sob controle da estação do ano e associadas com a função espermática durante a estação reprodutiva. Neste trabalho, observa-se que bandas protéicas de 120 kDa estão presentes no período seco; bandas de 73 kDa estão presentes no período chuvoso, enquanto bandas de 100 kDa estão no período seco.

Estudos diversos têm mostrado bandas protéicas de diferentes potenciais isoelétricos e mesma massa molecular (Freitas et al., 2001; Miyamoto et al., 1987). A este respeito, cita-se as espermadesinas identificadas por massa molecular de 12 kDa a 14 kDa e as inibinas de 14 a 18 kDa.

Miyamoto et al. (1987) mensuraram a proteína inibina em ensaio 'in vitro' e a concentração do hormônio folículo estimulante (FSH), do hormônio luteinizante (LH) e da testosterona no plasma seminal de caprinos durante nove meses, em clima temperado. Observaram que a concentração de inibina aumentou na transição entre primavera e verão; reduziu no outono e recuperou-se no inverno. Também o FSH e LH alcançaram o pico no meio do verão e retornaram os baixos níveis no outono. A testosterona, por sua vez, também aumentou no meio do verão e manteve altos níveis até o início do inverno. Correlações positivas foram encontradas entre inibina e FSH ($r=0,305$), sugerindo que no verão o aumento na atividade da inibina no plasma seminal tem relação com aumento dos níveis de FSH no início do verão em caprinos machos. Inibinas são proteínas constituídas de duas subunidades, uma de 18kDa e outra de 14 kDa, cuja produção é controlada principalmente pelo FSH, é produzida pelas células da granulosa dos ovários e pelas células de Sertoli dos testículos.

Bandas de peso moleculares de 53 kDa a 55 kDa estão presentes nos dois períodos do ano estudados e poderão estar relacionadas às osteopontinas, cuja função está ligada à adesão celular através de receptores, que parecem ter um papel na ligação espermatozóide-ovócito na perimplantação e na implantação (Vinatier, 1995).

Bandas de massa molecular de 16 kDa são encontradas unicamente no período seco e as de 30 kDa nos períodos seco e chuvoso. Possivelmente estejam relacionadas com as *bovine serum proteins* (BSP's) que possuem massa molecular de 16 kDa (BSP1 e BSP2) e de 30 kDa, as quais estão ligadas, segundo (Manujunath e Thérien (2002), à remoção parcial de colesterol e dos fosfolípidos da membrana espermática, também atuando na mediação da ligação dos espermatozoides ao epitélio do oviduto e manutenção da motilidade espermática (Gwathmey et al., 2003, 2006).

CONCLUSÕES

Os parâmetros espermáticos (aspecto, volume e concentração) sofrem influência da estação do ano no semi-árido, enquanto a motilidade e o vigor estão isentos de alteração significativas nos períodos citados. Como esta variação é pequena, não afetando a qualidade do sêmen, os machos caprinos podem ser usados para reprodução nos períodos seco e chuvoso no semi-árido do Nordeste;

As proteínas plasmáticas dos caprinos sofrem influência das estações seca e chuvosa no Nordeste do Brasil;

A distribuição das bandas protéicas observadas através de eletroforese mostrou variação nos períodos chuvoso e seco, em caprinos da raça Anglo-nubiana no Nordeste;

As bandas de massas moleculares relacionadas às proteínas ligadas à fertilidade encontram-se presentes nos dois períodos, enquanto uma banda possivelmente relacionada à congelação do sêmen está presente unicamente no período seco, levando a sugerir que este possa ser o período recomendado para criopreservação do sêmen caprino no Nordeste;

Embora os meses chuvosos e secos estudados mostrem, entre si, pouca variação quanto à temperatura e umidade, o mesmo não aconteceu com o índice pluviométrico com relação aos meses chuvosos (Abril e Maio), possível razão para observar-se bandas não uniformes nesse período.

REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976
- CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y., GUÉRIN, Y ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Traning manual on artificial insemination in sheep and goats**.Rome: FAO, 1991.222p. (FAO Animal Production and Health Paper, 83).
- COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France.I Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition and Development**.v.20 p 1789-99,1980
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. **Belo Horizonte**: CBRA, 1998.
- CORTEEL, J. M. Production, storage and insemination of goat semen. In: **SYMPOSIUM OF MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS**, 1977, Madison. Proceeding...Madison:University of Wisconsin, 1977. p. 41-57.
- DUNCAR, Y.; TEKIN, N.; ALTINTAS, A. Semen fructose and fructolysis and some chemical constituents in seminal plasma from Angora goats. **Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Dergisi**, v. 23, n. 3-4, p. 100-113-1983.
- EATON, O.N.; SIMMONS, V.L. A semen study of goats. *American Journal of Veterinary Research, Michigan*, v. 13, p. 537 – 544, 1952.
- EVERETT, R. W., BEAN, B. Environmental influences on semen output. **Journal Dairy Science**, v 65 p. 1303-1310, 1982.
- FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS, (FUNCEME) – 2008- Fortaleza – Dados de pluviosidade, temperatura e umidade. Disponível em <http://www.funceme.br/DEPAM/index.htm>. Acesso em 03/01/2008.
- GOERITZ F, QUEST M, WAGENER A, FASSBENDER M, BROICH A, HILDEBRANDT TB, HOFMANN RR, BLOTTNER S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands.**Theriogenology** v. 1 p. 1487-1502, 2003.
- GWATHMEY, T.M. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30KDa share functional roles in storing sperm in the oviducto. **Biology of Reproduction**, v. 75, p501-507, 2006.
- HAMES, B. D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis, in HAMES, B Richwood,D. (Ed) . **Gel Electrophoresis: a Practical approach**. WashingtonD.D.; IRL Press. p. 1-86, 1981.
- J.L. LARSON; D.J MILLER. **Journal of Dairy Science**. 83, 2000.
- JOBIM, M. I.M., OBERST, R. E., SALBEGO, G. C., SOUSA, O. D., WAL, B.V, MATOOS, C . R., Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientia Veterinariae**. V. 1 p. 21-30, 2003.
- KARAGIANNIDI A. VARSAKELI S. KARATZOS G. Characteristics and seasonal variations in the sêmen of alpine,, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. **Theriogenology**, 2000, v. 53 n. 6 p. 1285-1293. 2000.

KUMI-DIANA J. NAGARATUAM V. RWUAON J. S, Seasonal and age-related changes in sêmen quality and testicular morphology of bulls in a tropical enviroment. **Vet Rec**, v. 108, n.1 p. 13-15. 1981.

LA FALCI V. S. N., TORTORELLA, H., RODRÍGUES, J. L., BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**,v. 57, p. 1035-1048, 2002

MACHADO, R., SIMPLICIO, A.A. Efeito do tipo racial e da época de ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semi-árida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. P. 433.

M.A. HENAULT; G.J. KILLIAN. **Journal of Reprodução and Fertility**. 1996, 108, 199-204.

M.F SMIT; D.L. MORRIS; M.S. AMOSS; N.R. PARISH; J.D. WILLIAMS; J.N WITBANK. **Theriogenology**. 1981, 16, 379.

MARTINEZ, P.M.; ELOY, A.M.X. Efeito da sazonalidade sobre a congelção de sêmen caprino no Nordeste. IN: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005. Teresina, PI. **Anais eletrônicos...** Teresina: UFPI, 2005. Disponível em CD.

MENDOZA, G.; MHITE, I.G.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, Sydney, v. 32 (3), p. 455-66. 1989.

MIES FILHO, A. **Reprodução Animal**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, v. 2, 750,1987.

MIYAMOTO, A. M., UMEZE, K., HAMANS, MASAKI, J. Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in the male goat . **Theriogenology**, v. 28, p. 67-76, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **Nutrient requirement of sheeps**: 6 ed. Washington: National Academy Press, P. 99, 1985.

NUNES, J. F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des espermatozoïdes de bouc. **Paris. Université Paris VI**, 45, 1982. Tese (Ciências da Vida).

NUNES, J.F., FREITAS, V. J. F. O macho caprino e sua importância para a fertilidade do rebanho NOS TRÓPICOS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 188-191, 1989.

ORTAVANT R.; DUPONT G.; PAUTHE H.; ROUSSEL G. Contribuion á de la differenciation des epesmatozoides mors et des epesmatozoides vivants dans le sperme de taureau. **A nn Zoothev**. V.2, p 1-8, 1953.

PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, A. Sperm washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **International Journal of Andrology**, Zaragoza, v. 24, p. 352-359. 2001

PINHEIRO, R.R.; MACHADO, R.; PINHEIRO, A.A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais de caprinos no Nordeste do Brasil. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996. FORTALEZA, CE. **Anais**. Sociedade Brasileira de Zootecnia p.416-418, 1996.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciana-Granadina goats in the Mediterranean. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 29, p. 255-263, 1992.

SALGUEIRO, C. C. M. de; NUNES, J. F. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 231-232, 1999.

SANTOS, D. O., AZEVEDO, H. C.; SALLES, H. O. Efeito da insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de bodes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 283-286, 1998.

SAS, User's guide: statistics – **version 6**. ed. Cary, Statistical Analysis System Institute, 2008.

SILVA, A. E. D. F.; NUNES, J. F. Estacionalidade na atividade sexual e qualidade do sêmen nos ovinos deslanados das raças Santa Inês e Somalis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8, p. 207 – 214, 1984.

SILVA, M. A. V. **Efeito de diferentes diluentes de congelamento e duas temperaturas de descongelamento sobre a integridade acrossômica, vigor e motilidade espermática do sêmen caprino**. 1993. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1993.

SMYTH P.; GORDON, I. SEASON. A. L and breed variatios in the semen characteristics of ram. **Irish Veterinary Journal**. v. 21: p. 223-233.1967.

TULI, R.K.; HOLTS, W. Effects of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 1359 – 1363, 1995.

VILAR FILHO, A.C., BIRGEL, E.H., BARNABE, V.H. et al. Características testiculares e seminais de caprinos criados na região semi-árida do Estado da Paraíba (Nordeste do Brasil). I. Características testiculares. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** V.17, 1993 (no Prelo)

VINATER, D. Integrins and reproduction. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Rep. Biol.**, v. 59, p. 71-81, 1995.

VINHA, N. A, Variação estacional na produção e qualidade do sêmen de *capra Hircus* **Faculdade de Veterinária –UFC**. Niterói-RJ v.27,p. 23-28, 1974.

YING, S. Y. Inhibins, activins and follistatins . **Journal of steroid biochemistry**. V. 33 . p.705-713, 1989.

CONCLUSÕES

As proteínas seminais e os parâmetros espermáticos sofrem influência da estação chuvosa e seca em caprinos no Nordeste do Brasil. Como os estudos relatam que as proteínas seminais estão envolvidas no processo de fertilização, provavelmente haja efeito do período do ano sobre alguns aspectos da qualidade do sêmen.

Por outro lado, os parâmetros espermáticos (aspecto, volume e concentração) sofrem variação da estação, embora esta não seja suficiente para alterar a qualidade do sêmen. Contudo, o vigor e a motilidade não se apresenta alterados pelos períodos estudados, sugerindo que os reprodutores podem ser utilizados durante todo o ano no Nordeste do Brasil;

O mapeamento das bandas protéicas de caprinos da raça Anglo-nubiana no semi-árido do Nordeste, mostra que existe uma variação ao longo do ano, com presença de bandas em todos os meses que podem estar relacionadas à fertilidade, e outras que apresenta-se somente em determinados período, sendo que mais estudos são precisos para saber como funciona a sua atuação sobre a fecundação

Estudos sobre proteínas seminais em caprinos no semi-árido do Nordeste ainda são escassos, havendo necessidade de identificar e estudar moléculas que tenham ação sobre os processos de fertilização e interferência no processo de congelamento do sêmen.

Anexo 1.

PROCOLOS

Fundação Ezequiel Dias- FUNED

Laboratório de proteoma

Protocolo n. 02/00 última alteração 25/08/99

Técnica. MINI-ELETROFORRESE (BIORAD)

Fonte. Catalogo da BIORAD Referencias bibliográficas. Laemmli, U.K. Nature, v. 227, p. 680,1970

Equipamentos:

Cuba para mini-gel protean®II – bio-rad

Fonte de energia – Electrophoresis power supply- Esp 600

Placa de vidro. Glass plates for Hoefer® veertical slab gels

Paack of 10 plates

Code nº 806136-81 pharmacia bbiotech

Reagentes

PSA- ammonium persulfate

TEMED- (N,N,N`N` - Tetramethylenediamine)

Acrilamida

Bis-acrilamida

Tris

Acido clorídrico

Sodiumduodecylsulfato-SDS

Glicerol

Azul de bromofenol

Glicina

Beta - mercaptoetanol

Protocolo de preparação das soluções

Anexo 2

PAGE-SDS

Solução A	
Acrilamida.....	29.2 gr
Bisacrilamida.....	0.9 g
Água destilada q.s.p.	100 ml
Armazenar em frasco escuro a 4 °C	
Solução B (gel de separação)	
Tris.....	18.15 g
HCL.....	pH 8.8
H2O q.s.p.....	100 ml
Armazenar a 4 °C	
Solução C (gel de concentração)	
Tris-.....	6 g
HCL.....	pH 6.8
H2O q.s.p.	100 ml
Armazenar a 4 °C	
SDS a 10%	
-Sodium duodecylsulfato(SDS)	10
H2O q.s.p.	100 ml
Armazenar a temperatura ambiente	
Tampão de amostra	
Solução C.	1.0 ml
Glicerol.....	0.8 ml
SDS 10%	1.6 ml
Beta-mercaptoetanol-.....	0.4 ml
Azul de bromofenol 0.2%	0.2 ml
Armazenar no congelador	
Tampão de corrida concentrado 5x	
Tris.....	4.50g
Glicina.....	21.6g
SDS.....	1.50g
H2O q.s.p.	300 ml
Armazenar a 4 °C	
Tampão de uso	
Tampão 5x concentrado.....	240 ml
H2O.....	960 ml
Armazenar a 4 °C e utilizar 5 vezes	
Catalisador	
Persulfato de amônia-.....	0.02g
H2O	200 µl

Anexo 3

TÉCNICA. COLORACAO DE PROTEINA - AZUL DE COMASSIE (PROTEINAS)

Coloração de gel Fundação Ezequiel Dias- FUNED

Laboratório de proteoma

Protocolo ultima alteração 25/08/99

Técnica. COLORACAO DE PROTEINA -AZUL DE COMASSIE
(PROTEINAS)

Fonte. Referencias bibliográficas.

Material e reagentes

Soluções Corante

Coomasie brilliant blue R-250..... 0,5g

Etanol..... 250 ml

Agua -..... 250ml

Filtrar com papel de fitro

Solução Descorante

Etanol..... 300ml

H2O..... 625 ml

Acido Acético 75 ml

Técnica

Corar sob agitação por 30 minutos em media

OBS. O tempo pode variar. Verificar se necessita mais tempo.

Lavar o gel com H2O destilada para retirar o excesso de corante

Colocar o gel na solução descorante e deixar sob agitação. trocando a solução
descorante ate a visualização das bandas .

Solução para secar gel

Etanol 10%

Glicerol 2,5%

Completar para 100 ml com H2O destilada

Secar com papel celofone.

Protocolo de Eletroforese - Unidimensional

Anexo 4

PROTOCOLO DE ELETROFORESE

Gel- _____ Data- _____

Gel de concentração- _____

Gel de separação _____

Programação

Início

Voltagem- _____ Amperagem- _____ Watts- _____

Final

Voltagem- _____ Amperagem- _____ Watts- _____

Padrão- _____

Amostra 1-	Amostra 6-
Amostra 2-	Amostra 7-
Amostra 3-	Amostra 8-
Amostra 4-	Amostra 9-
Amostra 5-	Amostra 10-

Gel de separação-
Solução A-
Solução B-
Água dest.-
SDS 10%-
PSA 10%
TEMED-

Gel de concentração-
Solução A-
Solução C-
Água dest.-
SDS 10%-
PSA 10%-
TEMED-

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.