

DIÔNES OLIVEIRA SANTOS

**ESTUDO DO PERFIL PROTEICO NAS MEMBRANAS DE
ESPERMATOZÓIDES CONGELADOS DE CAPRINOS**

BOTUCATU - SÃO PAULO - BRASIL

2005

DIÔNES OLIVEIRA SANTOS

**ESTUDO DO PERFIL PROTEICO NAS MEMBRANAS DE ESPERMATOZÓIDES
CONGELADOS DE CAPRINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Emídio Dias Feliciano Silva

Co-Orientador:

Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos

**BOTUCATU - SÃO PAULO – BRASIL
2005**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, APROVA a Tese de Doutorado:

ESTUDO DO PERFIL PROTEICO NAS MEMBRANAS DE ESPERMATOZOIDES
CONGELADOS DE CAPRINOS

Elaborada por

Diônes Oliveira Santos

como requisito parcial para obtenção do Título de
DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA – Reprodução Animal

Prof. Dr. ANTONIO EMIDIO DIAS FELICIANO SILVA
Orientador

Profa. Dra. EUNICE OBA
UNESP-FMVZ

Prof. Dra. MARIA DENISE LOPES
UNESP-FMVZ

Profa. Dra. VALQUÍRIA HYPÓLITO BARNABÉ
USP-FMVZ

Dr. AURINO ALVES SIMPLÍCIO
Embrapa Caprinos

Botucatu, 26 de janeiro de 2005

A CINELDA,

Mais do que esposa, minha eterna namorada, companheira de todas as horas, e aos meus filhos, por todo amor, paciência e força para superar a distância e as dificuldades e, vencer os desafios encontrados, em minha vida,

DEDICO

Ao Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS DE PAIVA CAMPOS,

Co-Orientador deste trabalho por me receber sem nenhuma restrição no seu Laboratório e pela confiança depositada em mim, no seu modo peculiar de ser...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sobre todas as coisas, pois criou o mundo e nos presenteou;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Campus de Botucatu, e ao Prof. Dr. Antônio Emídio Dias Feliciano Silva, pela oportunidade da realização do Doutorado e orientação, respectivamente;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos - pela liberação para realização do Doutorado, e em particular ao Dr. Aurino Alves Simplício, Chefe Geral e seus adjuntos Dr. Luiz da Silva Vieira (Pesquisa e Desenvolvimento) e Maria Eliene da Silva Dourado, de Administração, pelo apoio inquestionável na execução deste trabalho - fase de campo - através da infra-estrutura da Empresa;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), na pessoa do Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos pela co-orientação tão valiosa e sempre presente, e mais ainda, por me receber sem nenhuma restrição no seu Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOMOL);

Aos professores da UNESP-FMVZ, Doutores Sony Dimas Bicudo, João Carlos Pinheiro Ferreira, Maria Denise Lopes, Eunice Oba, Nereu Carlos Prestes, Paulo Roberto Ramos, Denise Sartori e Ciro Morais de Barros, pelos ensinamentos transmitidos para o fortalecimento profissional;

E, também, aos pós-graduandos da UNESP-FMVZ, Botucatu, SP, Alexandre Wolf, Andréa Alice Fonseca, Andrey Teixeira, Adriana Wanderley, Christianne Barreto, Dorça Helena, Fabiana Ferreira, Fabíola Carvalho, Louisiane de Carvalho, pelo convívio fraterno em Botucatu, apesar de tão curto;

Aos colegas embrapianos, os assistentes de operações José Nóbrega Medeiros e Osmarilda Machado; aos auxiliares de operação José Ribamar dos Santos e Francisco Teixeira, pela coleta e processamento do material biológico, e ao Responsável pela Fazenda Experimental Santa Rita (DNOCS), Luiz Aurélio, o popular Luizão e seus auxiliares de operação Benedito Moura, José Lourival Siebra, Alex Franca, José Aduino dos Santos, Benedito Aquino, pela presença constante e sua dedicação ao manejo animal nas inseminações;

Ao grande amigo, de ontem, hoje e sempre, Hymerson Costa Azevedo, padrinho do meu Davi, sua paciência e o pronto atendimento aos meus constantes pedidos de "FAVORES", fazendo-o meu procurador particular foi de uma significância tremenda;

Ao amigo incansável e de todas as horas, Érico Augusto Rosas de Vasconcelos, não somente pelos seus ensinamentos práticos, aprimorados e repassados no dia-a-dia, mas também, pelas horas de lazer e descontração;

À amiga e colega embrapiana, Liduina de Jesus Silva Alves pela sua disponibilidade em ajudar sempre que precisava;

Aos amigos do HPLC, Fábio César de Sousa Nogueira e Petrônio Augusto de Sousa, obrigado pela amizade e força para vencer mais esse desafio;

Aos colegas e amigos Carlos Eduardo Souza e Alethéia Carizia Baracho, pelos momentos constantes de desabafo, no Departamento de Zootecnia da UFC;

Aos colegas do BIOMOL, que apesar de muitos cito aqueles mais frequentes: Terezinha Feitosa, Emanuel Abreu, Emmanuel Jereissati, Eduardo Gonçalves, Juliana Brasil, Thaís Picanço, Camila Barbosa, Fabíola Fernandes e Tiago Jucá, obrigado pelos momentos de descontração para espantar o cansaço e a saudade da família;

A equipe do Laboratório de Metabolismo e Fixação do Nitrogênio do DBBM-UFC pela prestimosa colaboração no uso da centrífuga refrigerada, tão necessária e útil nas extrações das proteínas espermáticas do sêmen congelado de caprino;

Ao Pesquisador Dr. Raimundo Nonato Braga Lobo, da Embrapa Caprinos, pela amizade e prestimosa ajuda nas análises estatísticas;

A Maria Cristina Campanelli, da Embrapa Pecuária Sudeste, pela colaboração na correção e formatação de texto;

Ao amigo, colega e conterrâneo da Paraíba, Gerson Alves de Azerêdo pela acolhida tão calorosa em sua casa em Jaboticabal, SP para cursar disciplinas;

Ao casal Pedro Matias e Ivaneide Viana e seus filhos pelo acolhimento caloroso em seu lar como hóspede favorecendo na busca do meu objetivo;

Aos funcionários da FMVZ, UFC e Embrapa Caprinos pela paciência nas “perturbações” diárias que deixarão saudades;

E, não poderia esquecer dos meus pais, Francisco Ferreira e Antônia Procópio, meus super-heróis que com tanta bravura e determinação criaram seus 18 filhos, hoje 16, sempre na obediência a Deus e respeito ao próximo;

Por fim, a todos os que acreditaram no meu trabalho e capacidade, me dando forças para crescer cada vez mais,

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA	03
OBJETIVOS E HIPÓTESE	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
1. Local do experimento e animais experimentais	11
1.1. Coleta e processamento do sêmen	12
1.2. Inseminação artificial	13
2. Preparo das amostras de sêmen para eletroforese	16
2.1. Extração de proteínas totais da membrana plasmática dos espermatozóides	16
2.2. Dosagem de proteínas totais da membrana plasmática dos espermatozóides	16
3. Eletroforese bidimensional	17
3.1. Focalização isoeletrica	17
3.2. Reidratação das fitas de gel com gradiente de pH imobilizado	17
3.3. Preparo para IEF – primeira dimensão	18
3.4. Eletroforese em SDS-PAGE	20
3.5. Análise Estatística	22

RESULTADOS	23
1. Parâmetros espermáticos	23
2. Proteína total da membrana plasmática dos espermatozóides	31
3. Proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides identificada por eletroforese 2-D.	32
4. Fertilidade dos reprodutores	39
DISCUSSÃO	41
1. Parâmetros espermáticos	41
2. Proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides por eletroforese 2-D	44
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	59
Anexo 1	59
Anexo 2	60
Anexo 3	61

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Análise de variância dos quadrados mínimos dos parâmetros espermáticos a fresco (f) e à descongelação (d) e, a proteína total, em função de reprodutor (R), da estação de inseminação artificial (EIA) e interações (R x EIA), de caprinos da raça Anglo-nubiana	25
Tabela 2 – Análise de variância dos quadrados mínimos da morfologia espermática a fresco (f) e à descongelação (d), em função de reprodutor (R), da estação de inseminação artificial (EIA) e interações (R x EIA), de caprinos da raça Anglo-nubiana.	26
Tabela 3 – Médias (\pm ep) dos parâmetros espermáticos dos reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.	27
Tabela 4 – Médias (\pm ep) das morfologias espermáticas a fresco (f) e à descongelação (d) em função dos reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.	28
Tabela 5 - Médias (\pm ep) dos parâmetros espermáticos dos reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana, em função das três estações (I, II, III) de inseminação artificial (EIA).	29
Tabela 6 - Coeficientes de correlação simples entre os parâmetros espermáticos e proteína total da membrana dos espermatozóides descongelados, em reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.	30
Tabela 7 – Médias das concentrações de proteína total dos espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, nas três estações de inseminação artificial (I, II e III).	31

Tabela 8 – Identificação de proteínas de membrana dos espermatozóides descongelados de caprinos da raça Anglo-nubiana, independente de reprodutor e da estação de inseminação artificial.	33
Tabela 9 – Número de cabras e taxa de prenhez após inseminação com sêmen descongelado de reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.	39
Tabela 10 – Número de cabras sem e taxa de prenhez após inseminação com sêmen descongelado de reprodutores da raça Anglo-nubiana, nas três épocas de inseminação artificial (I, II, III).	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Caprinos doadores de sêmen da raça Anglo-nubiana.	12
Figura 2 – Coleta de sêmen, em vagina artificial, de caprino da raça Anglo-nubiana.	13
Figura 3 – Pastagem nativa da caatinga época seca (EIA I), meados de agosto a setembro/2002.	14
Figura 4 – Pastagem nativa da Caatinga na época de transição chuvosa-seca (EIA II).	14
Figura 5 -Pastagem nativa da caatinga na época seca-chuvosa (EIA III).	14
Figura 6 – Inseminação artificial, via transcervical, na cabra com sêmen congelado.	15
Figura 7 - Bandeja com IPG's em reidratação.	18
Figura 8 - IPG's no Multiphor II (A), com elétrodos de fixação, anodo e catodo (B).	19
Figura 9 – IEF das IPG's no Multiphor II.	19
Figura 10 – Placa molde de 14 x 14 cm para gel homogêneo de acrilamida a 15%	20
Figura 11 - Cuba conectada a fonte para corrida da segunda dimensão	21
Figura 12 – Gel referência de eletroforese bi-dimensional de proteínas de membrana de espermatozóides descongelados de reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana	34
Figura 13 - Géis de eletroforese 2-D da membrana plasmática de espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função da primeira época (seca) de inseminação artificial.	35
Figura 14 - Géis de eletroforese 2-D da membrana plasmática de espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função da segunda época (chuvosa-seca) de inseminação artificial.	36
Figura 15 - Géis de eletroforese 2-D da membrana plasmática de espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função da terceira época (seca- chuvosa) de inseminação artificial.	37
Figura 16 - Representação gráfica das proteínas da membrana plasmática de espermatozóides de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função das épocas (I, II e III) de inseminação artificial.	38

RESUMO

O presente estudo identificou o perfil protéico da membrana plasmática dos espermatozoides, congelados, de caprinos, através de eletroforese bidimensional (2-D). O objetivo foi encontrar proteínas que possam ser utilizadas como marcadores de congelabilidade na seleção precoce de doadores de sêmen. Para isso, foram utilizados seis machos caprinos, da raça Anglo-nubiana, de propriedade da Embrapa Caprinos, mantidos em regime de estabulação. O sêmen foi colhido, em vagina artificial, durante três épocas de inseminação artificial (EIA I - época seca; II - época chuvosa-seca; III - época seca-chuvosa), nos anos de 2002, 2003 e 2004, e avaliado a fresco, quanto ao volume (mL), a concentração ($\times 10^9$ spz/mL), motilidade progressiva individual (MIP-f, %), o vigor (0 a 5) e a morfologia (% de defeitos maiores, DMA-f; menores, Dme-f e totais, DT-f). Logo após, foi submetido a congelamento, em palhetas de 0,5 mL, numa concentração de 150×10^6 espermatozoides por palheta, de acordo com o protocolo do Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial da Embrapa Caprinos. Em seguida foi armazenado em nitrogênio líquido até seu uso na inseminação artificial e análise de proteínas. Para avaliar a fertilidade do sêmen foram inseminadas 321 cabras, sem raça definida, manejadas em pastagem nativa, com escore corporal entre 2,5 e 4,0, distribuídas por reprodutor e EIA's. As cabras foram inseminadas após estimulação do estro, através do "Efeito Macho", a partir do oitavo dia, pela via transcervical, entre 10 e 12 horas após a identificação do estro, quando o sêmen foi então descongelado. Os resultados das características espermáticas foram analisados pela análise de variância e as proteínas qualitativamente, registrando-se o peso molecular (kDa) e o ponto isoelétrico (pI). O sêmen a fresco apresentou valores de MIP-f de 68,4 a 86,3%, vigor-f de 3,3 a 3,8 e DT-f de 10,6 a 19,5%. À descongelamento, a MIP variou de 21,2 a 27,9%, o vigor de 1,7 a 2,0 e os DT de 12,6 a 17,6%, entre reprodutores. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) da MIP-f entre reprodutores e EIA's. A MIP-d não variou em função dos reprodutores e EIA's, o mesmo sendo válido para o vigor e DT, tanto a fresco quanto à descongelamento. Houve correlação positiva ($P < 0,05$; $r = 0,213$) entre MIP-f e MIP-d e o vigor-f e vigor-d ($P < 0,05$; $r = 0,250$). A fertilidade do sêmen congelado, avaliada pela taxa de prenhez variou entre 7,4 e 19,0%, sem diferença significativa ($P > 0,05$). Já entre as EIA's estas variaram ($P < 0,05$), sendo observada a mais baixa na III EIA. A dosagem das proteínas totais (PT) da membrana plasmática dos espermatozoides de cada palheta (0,5 mL) foi

conduzida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceara, em Fortaleza, através do método colorimétrico, por espectrofotometria, tendo a albumina sérica bovina como padrão. Os valores da PT variaram de 38,3 a 59,0 μ g/0,5 mL, entre reprodutores e de 43,3 a 52,5 μ g/0,5 mL, entre EIA's. O perfil protéico, obtido da análise das membranas plasmáticas dos espermatozóides por 2-D, revelou a presença de proteínas de peso molecular de 5,7 a 65,4 kDa e pI de 4,6 a 8,7. Foram observados vários isômeros. As proteínas de baixo peso molecular, peptídeos, de 5,7 e 6,4 kDa somente foram observadas em alguns dos reprodutores e EIA's. Conclui-se que, foram identificadas proteínas de membrana plasmática dos espermatozóides de caprinos, tanto de baixo quanto de alto peso molecular, porém são necessários o aprofundamento e prosseguimento deste estudo, a fim de avaliar a eventual associação destas proteínas com as características espermáticas e a congelabilidade do sêmen dos reprodutores estudados.

Palavras-chave: Caprino, Eletroforese bidimensional, Espermatozóides, Inseminação artificial, Proteínas.

ABSTRACT

The study identified the goat frozen sperm plasmatic membrane proteins profile, using bidimensional electrophoresis (2-D). The aim was to detect those proteins that eventually could be used as markers to select the males by fertility. To evaluate the fertility rates six Anglo-nubian goat male belonging to *Embrapa Caprinos* kept in stable was used. The sperm was collected by artificial vagina during three insemination seasons (EIA; I, dry season; II, rains-dry season; III, dry-rains season) and the years 2002, 2003 and 2004. The ejaculated sperm was evaluated by volume (mL), concentration ($\times 10^9$ spz/mL), individual progressive motility (MIP-f, %) and vigor-f (0 to 5), and morphology (% of major, DMA-f; minor Dme-f and total, DT-f, abnormalities). There after the sperm was frozen according to *Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial da Embrapa Caprinos*, in 0.5 mL straw, with a concentration of 150×10^6 spz/straw and stored in liquid nitrogen. These frozen sperm was maintained until insemination and protein analysis. To evaluate the fertility rate, 321 crossbreed goats, raised on native pasture, with body score between 2.5 and 4.0, were inseminated. Males and EIA's divided the goats in groups. The goats were inseminates after estrus stimulation (male effect) on eighth day after 10 to 12 hours of estrus identification. At insemination the sperm was towed and its characteristics evaluated. The sperm parameters were analyzed by variance analysis and the proteins qualified by molecular weight (kDa) and isoelectric point (pI). The ejaculated sperm showed values of MIP-f ranging from 68.4 to 86.3%, vigor-f 3.3 to 3.8 and DT-f 10.6 to 19.5%; the frozen values of MIP-d were 21.2 to 27.9%, vigor-d 1,7 to 2.0 and DT-d 12.6 to 17.6%. It was observed a significant variation ($P < 0.05$) of MIP-f between the males and even EIA's. The same significance was not observed concerning MIP-d, vigor-f and d, and DT-f and d. A positive correlation was identified between MIP-f and d ($P < 0.05$; $r = 0.213$) and vigor-f and d ($P < 0.05$; $r = 0.250$). The male fertility rate validate by pregnancy rate varied from 7.4 to 19.0%, not significant. However, these rates were significant ($P < 0.05$) between EIA's, the lower rate being observed during III EIA. The sperm plasmatic membrane total protein (PT) of each straw (0.05 mL) was determined at *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará*, in Fortaleza, using colorimetric method and bovine albumin serum as reference. Considering the males, PT values were 38.3 to 59.0 $\mu\text{g}/0.5$ mL and the EIA's 43.3 to 52.5 $\mu\text{g}/0.5$ mL. The 2-D sperm plasmatic membrane protein profile varied from 5.7 to

65.4 kDa and pI of 4.6 to 8.7. Various isomers were observed. The low molecular weight proteins, peptides, of 5.7 and 6.4 kDa were found only in some males and EIA's. In conclusion, we identify goat sperm plasmatic membrane protein of low and high molecular weight through bidimensional eletroforesis. However, to evaluate the possible association of those proteins with the sperm characteristics and freezing rate is necessary to continue and make a more profound study.

Key words: Goats, bidimensional electrophoresis, Spermatozoa, Artificial insemination, Proteins.

INTRODUÇÃO

A exploração caprina tem-se revelado uma atividade economicamente viável em quase todo o mundo. Porém, ainda são poucos os países que adotam tecnologias, visando o incremento da produtividade, e conseqüentemente, o maior desfrute dos rebanhos. Por outro lado, evidencia-se que os maiores rebanhos no mundo são encontrados na Índia, China e Paquistão, e o Brasil ocupa o 10^o lugar com um efetivo de 18,6 milhões o que representa 2,1% do rebanho mundial (FAO, 1998). Do rebanho brasileiro, aproximadamente 10,4 milhões, 89,0% encontram-se na região Nordeste (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1996).

Apesar da maior concentração na região Nordeste, os índices produtivos e reprodutivos obtidos não expressam o potencial biológico dos animais. Existe a necessidade da implementação de sistemas de exploração racionais com foco no aumento do desfrute dos rebanhos. Neste contexto, o uso adequado de biotécnicas da reprodução muito pode contribuir para a taxa de reprodução e dessa forma favorecer positivamente o desfrute.

O incremento no desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho caprino brasileiro é necessário para atender a contento a demanda crescente por alimento de elevado valor biológico e de peles. Todavia, a melhoria do sistema de exploração só será possível mediante o uso de tecnologias e insumos modernos que viabilizem o melhor aproveitamento dos animais nos plantéis. Biotécnicas ligadas à reprodução como a inseminação artificial, a sincronização do estro, a transferência de embrião e o diagnóstico precoce de prenhez estão disponíveis e já são realidades em algumas propriedades. Essas auxiliam os programas de melhoramento genético funcionando como ferramentas úteis para acelerar o ganho genético dos rebanhos. No entanto, apesar das conquistas alcançadas no campo da biotecnologia da reprodução, ainda se tem um conhecimento limitado dos mecanismos, celulares e moleculares, envolvidos nos diferentes processos reprodutivos. Em adição, técnicas que possibilitem aprofundar o conhecimento sobre os aspectos bioquímicos e fisiológicos do sêmen, ovócitos e embriões, dentre outros podem agregar valores e favorecer uma comercialização diferenciada.

É imprescindível para o avanço do conhecimento, a compreensão da importância dos mecanismos que regulam os processos biológicos como a fecundação e a concepção fundamentado na funcionalidade da célula espermática e associado às proteínas e ácidos graxos, dentre outros e suas interações no ejaculado. Ressalte-se que a adoção de biotécnicas,

no enfoque das tecnologias de processo e produto reside na presença transformadora dos agentes biológicos, principalmente, animais e vegetais que otimizem os resultados (RODRIGUES & RODRIGUES, 2000).

Portanto, investir em estudos de natureza celular e molecular que permitam conhecer o perfil protéico do sêmen de animais férteis e inférteis é imprescindível. O isolamento, a purificação e a caracterização de proteínas associadas à fertilidade favorecerão a produção de sondas de DNA. Estas poderão funcionar como marcadores e possibilitar a seleção de animais superiores para servirem como reprodutores ou doadores de sêmen, acelerando a multiplicação de material genético melhorador.

Nesse âmbito, as pesquisas ainda são incipientes e, diante do desafio para se ampliar o uso de tecnologias, treinar e qualificar pessoal constituem ações imprescindíveis para dar suporte ao crescimento e desenvolvimento da caprinocultura no Brasil.

REVISÃO DE LITERATURA

A seleção de animais doadores de sêmen ainda é baseada no padrão racial e atende a critérios como características biológicas como a idade à puberdade e maturidade sexual; o desenvolvimento corporal; a ausência de defeitos hereditários ou congênitos; a libido; a aceitação e ejaculação em vagina artificial, dentre outros.

Dentre as avaliações de rotina do sêmen nos estabelecimentos industriais são realizadas a determinação do volume do ejaculado, da concentração espermática, do percentual de células com motilidade individual progressiva e vigor, parâmetros que repercutirão no número de doses inseminantes por ejaculado. Esses fatores, associados ao número de partidas de sêmen congeladas/aprovadas para uso, servirão para estimar o potencial do animal como doador de sêmen (MACHADO et al. 1991, RODRIGUES-MARTINEZ et al., 1997).

Várias técnicas têm sido utilizadas até o momento, buscando prever a fertilidade do sêmen usado na inseminação artificial, baseadas na viabilidade espermática, antes e após a congelação.

Sabe-se, que a criopreservação causa danos às membranas e organelas espermáticas que, nem sempre são observadas nas avaliações morfológicas de rotina, quando se emprega a microscopia óptica.

Os processos de congelação e descongelação podem provocar danos na capacidade de motilidade e fecundação por alterações na membrana plasmática do espermatozoide (WATSON, 2000). Um dos processos comprometidos sob o estresse da temperatura é a capacitação espermática que pode ocorrer prematuramente com conseqüente dano ao DNA, bem como possíveis quebras ou desligamento de proteínas da membrana espermática, podendo afetar em grande escala a taxa de fertilidade (KARABINUS et al., 1997; THUNDTHIL et al., 1999).

A mensuração da integridade estrutural e funcional da membrana, ainda é o melhor método de avaliação complementar para garantir o sucesso da prenhez (VALCARCEL et al., 1994, WATSON, 1995). Outras técnicas como a microscopia eletrônica de transmissão, de varredura, o uso de amostras quimicamente fixadas, de corantes supravitais e de sondas fluorescentes também têm sido empregadas para verificar a integridade das membranas espermáticas.

Buscando encontrar marcadores bioquímicos para congelabilidade como uma técnica adicional na seleção de animais doadores de sêmen, RONCOLETTA et al. (1997) analisaram o perfil eletroforético do plasma seminal de touros zebuínos com padrões de alta e baixa congelabilidade. Ainda, RONCOLETTA et al. (1999). encontram 20 polipetídeos, onde um fragmento com peso molecular de 51,8 kDa que estava ausente em 100% dos animais do grupo de alta congelabilidade foi sugerido ser um possível marcador bioquímico para congelabilidade, enquanto que a banda de 14,4 kDa foi encontrada com níveis mais elevados no grupo de baixa congelabilidade.

Os processos de congelação e descongelação podem, também, provocar alterações na membrana devido a lavagens ou diluições que podem remover proteínas, mudando a sua composição na população de espermatozoides (HAMMERSTEDT et al., 1990; COLLIN & BAILEY, 1999).

Com o surgimento da eletroforese, na década de 50, tornou-se possível o mapeamento e a identificação de componentes protéicos no ejaculado de várias espécies e relacioná-los com a fecundação possibilitando, assim associar marcadores para fertilidade (BACCETTI 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). Mais tarde, na década de 70, O'FARREL (1975) desenvolvia a eletroforese bidimensional (2D-PAGE), técnica que permite a separação de proteínas de acordo com a massa molecular e ponto isoelétrico. Atualmente, a 2D-PAGE já utiliza o protocolo com gradiente "immobilized pH gradients" (IPG), desenvolvido por Görg et al., desde 1988.

O protocolo com IPG tem sido empregado na análise dos diversos tipos de tecidos obtendo eletroforegramas que permitem a visualização minuciosa do conteúdo protéico expresso em tecidos específicos (VASCONCELOS, 2003).

Por conseguinte, o sêmen tem despertado interesse pela sua composição em fatores biológicos. É composto de uma fração celular, os espermatozoides que são produzidos no parênquima testicular e uma líquida, o plasma seminal, originário das glândulas anexas ao sistema reprodutor.

O interesse no estudo do ejaculado das espécies domésticas é justificado não apenas, pela sua essência em gerar vidas, mas pelas inúmeras funções que desempenha e sua riqueza em compostos ou fatores que podem influenciar na congelação e na fertilidade do macho (ASHWORTH et al., 1994). Dentre estes se destacam os fatores de antifertilidade ou decapacitantes, que inibem ou prejudicam, até aqueles que promovam a viabilidade

espermática, especificamente as proteínas (SHIVAJI et al., 1990; McCOULEY et al., 1997; BELLIN et al., 1998; NAUC et al., 1999; MAXWELL & JOHNSON, 2000), sendo usados como biomarcadores de fertilidade.

Vários relatos são encontrados na literatura 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 participarem ativamente do processo de fecundação (McCOULEY et al., 1997; BELLIN et al., 1998).

O plasma seminal tem como principal função o transporte dos espermatozóides durante a ejaculação e sobrevivência no sistema genital feminino; previne a capacitação espermática prematura (YANAGIMACHI, 1994) e protege as células espermáticas contra danos peroxidativos (SCHÖNECK et al., 1996), além de dar sustentação aos espermatozóides, particularmente concentrados no epidídimo. E, ainda neutraliza o pH ácido da vagina, tendo uma ação imunossupressora. É composto de uma grande quantidade de proteínas, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, fatores antifertilidade ou imunossupressivos, ligadores de andrógenos, inibina e imunoglobulinas (YANAGIMACHI, 1994).

Deste modo, as proteínas do plasma seminal têm sido isoladas, caracterizadas e avaliadas visando à compreensão dos possíveis efeitos ou interações inerentes à fertilidade do macho, bem como a congelabilidade do sêmen de bovinos, caprinos e equinos. Dentre elas citam-se as BSP's dos bovinos (KILLIAN et al. 1993; BELLIN et al., 1994) e as HSP's dos equinos (BRANDON et al., 1999).

No entanto, o espermatozóide não possui capacidade de síntese protéica. O conteúdo protéico na superfície da membrana plasmática é alterado pela inserção de novas proteínas durante o trânsito epididimário e na ejaculação que podem influenciar sua fertilidade (KILLIAN *et al.*, 1993; BELLIN et al., 1994; YANAGIMACHI, 1994). As alterações ocorridas na composição da membrana plasmática são constantes durante a espermatogênese nos túbulos seminíferos e continuam durante o trânsito e maturação epididimária, na reação acrossômica ocorrida no sistema genital feminino, e durante a fecundação (VIURELLA e RAJANIEMI, 1980; RUSSEL et al. 1984; NAAB-HANSEN et al. 1997).

A qualidade do sêmen é afetada pela época do ano (NUNES e FREITAS, 1989; MACHADO e SIMPLÍCIO, 1991), a raça (CORTEEL, 1977; MACHADO e SIMPLÍCIO, 1991), o próprio indivíduo (MACHADO et al., 1991), o ejaculado (CORTEEL, 1977; MACHADO e SIMPLÍCIO, 1991) e a manipulação (EVERETT e BEAN, 1982). No entanto, a criopreservação dos espermatozóides pode provocar alterações nas membranas plasmáticas que resultam na diminuição da fertilidade. A reduzida fertilidade do sêmen congelado é atribuída às alterações estruturais e funcionais das membranas durante o processo de resfriamento, congelação e pós-congelação/descongelação afetando negativamente a qualidade (PARKS e GRAHAM 1992).

Os componentes do plasma seminal que são responsáveis pela resistência a congelação e descongelação ainda não são totalmente conhecidos. No entanto, é atribuído ao colesterol um efeito positivo na estabilidade da membrana. O aumento da susceptibilidade do espermatozóide ao choque térmico está correlacionado com o baixo conteúdo de colesterol na membrana plasmática. Fatores que inibem o efluxo de colesterol do espermatozóide ejaculado aumentam a resistência ao choque térmico. Diferenças individuais no conteúdo destes fatores de estabilização do plasma seminal poderiam justificar as diferenças entre os animais na congelabilidade do espermatozóide (AURICH et al., 1996).

Em adição, SHABANOWITZ e KILLIAN (1987), também relatam que a carga protéica da membrana plasmática do espermatozóide é incrementada pela adesão de novas proteínas oriundas dos líquidos epididimários e seminais. Ainda, RUSSEL et al. (1984) estudaram, pela eletroforese bidimensional, as modificações da composição de polipeptídeos de membrana de espermatozóides suínos, durante o trânsito epididimário. Os autores além de BELLIN, et al., (1998) verificaram que várias proteínas, neutras ou básicas, de baixo peso molecular, oriundas da glândula seminal são aderidas ao espermatozóide durante sua passagem pelo epidídimo. E, que outras proteínas, oriundas da próstata e bulbouretral aderem-se, porém, estas são ácidas e de alto peso molecular.

Também, SAIRAM et al. (1981) e MANJUNATH (1984) encontraram no plasma seminal de bovinos, proteínas básicas e ácidas, respectivamente, envolvidas na liberação de gonadotrofinas, a partir da hipófise incubada, *in vitro*. E, que as proteínas ácidas tinham ação antagonista ao hormônio liberador de LH e foram denominadas BSP-A₁, BSP-A₂ e BSP-A₃. Posteriormente, estas três proteínas ácidas do plasma seminal de bovino foram purificadas e caracterizadas por MANJUNATH e SAIRAM (1987), revelando que eram semelhantes àquelas purificadas por ESCH et al. (1983), na constituição dos aminoácidos, denominadas

até então de BSP-I, BSP-II e BSP-III e oriundas das glândulas seminais. McCOULEY et al., (1997) e BELLIN et al., (1998) identificaram touros com maior ou menor capacidade potencial de fecundação dos espermatozóides, através da presença ou ausência das proteínas de ligação a heparina (BSP) adquiridas do plasma seminal durante a ejaculação.

Mudanças sazonais das proteínas do plasma seminal caprino foram investigadas por La FALCI et al. (2002), por cromatografia líquida e caracterizada em SDS-PAGE. O padrão obtido revelou que as proteínas com afinidade por heparina (HAP's) tinham relação com a estação do ano e com a de fertilidade de reprodutores.

Em adição, CHANG (1951) e AUSTIN (1952) relatam que os espermatozóides dos mamíferos necessitam permanecer por várias horas no sistema genital feminino para poder adquirir a plena capacidade fecundante, isto é, a capacitação espermática.

O processo de capacitação culmina com a reação acrossômica, mediado por enzimas e proteínas localizadas na superfície da membrana plasmática do espermatozóide e a zona pelúcida do ovócito. A capacitação espermática e a reação acrossômica são dois processos que os espermatozóides sofrem durante sua passagem pelo sistema genital da fêmea, tornando-os hábeis para fecundar o ovócito. Com a reação acrossômica há liberação de hialuronidase que confere ao espermatozóide habilidade para penetrar às células do *cumulus oóforo* com conseqüente liberação de acrosina e posterior penetração na zona pelúcida (KATZ e YANAGIMACHI, 1980; YANAGIMACHI, 1994). Todavia, os eventos moleculares envolvidos na capacitação espermática não estão bem entendidos, mas, provavelmente, envolva mudanças bioquímicas e de ultraestruturas e trocas protéicas nas membranas espermáticas. Através da capacitação torna-se possível o reconhecimento e a ligação do espermatozóide à zona pelúcida mediado por proteínas espécie-específicas localizadas na superfície da célula espermática como HSP (BELLIN et al., 1994), galactosiltransferase (McLAUGHLIN & SHUR, 1987), proacrosina (JONES; BROWN, 1987) e PH-20 (PRIMAKOFF et al., 1988).

Na maioria das espécies domésticas, uma das grandes limitações para o pleno sucesso do processo de fecundação *in vitro*, ainda é o desafio da capacitação *in vitro* (IJAZ e HUNTER, 1989). Ressalte-se que a capacitação é induzida pelas glicosaminoglicanas (GAG's), sendo a mais importante delas, a heparina. Esta, por sua vez, se liga ao espermatozóide, durante a ejaculação, através das proteínas do plasma seminal produzidas pelas glândulas anexas, as quais estão distribuídas na membrana espermática funcionando

como “pontes de ligação”, denominadas de “heparin binding proteins” (HBP) (BELLIN et al. 1994; SILVA, 1998).

Em adição, proteínas presentes no plasma seminal revestem o espermatozóide (IJAZ e HUNTER, 1989) sendo consideradas como fatores de decapitação espermática ou inibidores da capacitação, atuando na superfície do espermatozóide, protegendo ou estabilizando a membrana plasmática, evitando, assim, a reação acrossômica precoce (IBORRA et al. 1996).

Segundo DeLEEuw et al. (1990), a alta concentração de proteínas no ejaculado, pode aumentar a estabilidade da membrana espermática, reduzindo as chances de alterações induzidas pelo resfriamento. Os autores citam como alterações bioquímicas, a perda da seletividade da membrana, redução na atividade respiratória e glicólise com diminuição dos níveis de ATP e, conseqüentemente, da motilidade celular, e degeneração de DNA.

Em adição, a re-exposição do espermatozóide capacitado ao plasma seminal leva à perda da capacitação, podendo esse processo, envolver a restauração da superfície do espermatozóide por fatores decapitantes que, normalmente, aderem ao espermatozóide na passagem pelo epidídimo (CHANG, 1957; WILLIAMS et al. 1967). Fatores espermáticos e/ou do plasma seminal podem interferir, negativamente, na função químico-fisiológica do ejaculado (WOLFE et al. 1993).

Relatos na literatura revelam a presença de uma proteína, conhecida como “human seminal lectin” (HSL), considerada um fator isolado do plasma seminal humano, cujas propriedades são similares aos fatores de decapitação e que pode ser uma das causas da infertilidade do homem. A secreção parece ocorrer, de forma natural e ao longo de todo o sistema reprodutor (MAHADEVAN et al. 1980). Assim, como a HSL, outros fatores podem estar relacionados à infertilidade, podendo ser ou não espécie-específicos.

O estudo do perfil protéico já vem sendo utilizado em ovócitos para melhor compreender os mecanismos envolvidos na maturação ovocitária (KASTROP et al. 1990). Estudos nesse sentido, também, já foram iniciados com sêmen em diferentes espécies. Em geral, as proteínas do plasma seminal guardam estreita relação com a fertilidade e o seu conhecimento quanti-qualitativo pode servir como parâmetro para identificar animais com alta ou baixa fertilidade, ou seja, predizer o seu potencial fecundante (BACCETI et al. 1979; MARCHINI et al. 1990; MORGENTALER et al. 1990; AUTIERO et al. 1991; KILLIAN et al. 1993; WOLFE et al. 1993; BELLIN et al., 1994; McCOULEY et al., 1997).

KILLIAN et al. (1993) estudaram a composição do plasma seminal de uma população de touros doadores de sêmen com parâmetros de qualidade espermática normais. Foi registrada a presença de quatro proteínas cujas densidades ópticas foram usadas num modelo matemático de regressão para prever a fertilidade dos machos e o perfil protéico determinado pela eletroforese do plasma seminal. Os autores obtiveram correlação linear positiva entre as densidades ópticas e a fertilidade dos sumários dos touros da ordem de 89%. Das quatro proteínas, duas (26 kDa e pI 6,2; 55 kDa e pI 4,5) eram predominantes no plasma seminal de touros com fertilidade mais alta, e as outras duas (16 kDa e pI 4,1; 16 kDa e pI 6,7), no plasma seminal de touros com fertilidade mais baixa. Posteriormente, uma dessas proteínas, a 55 kDa foi caracterizada por CANCEL et al. (1997). Sua caracterização era consistente com a identidade de uma outra proteína de 55 kDa, a osteopontina, que apesar das suas várias funções não há relatos do seu papel no sêmen e na fertilidade do macho. Já a caracterização da proteína 26 kDa, cuja ocorrência foi em média 3,5 vezes maior em touros com fertilidade alta revelou que a sequência de aminoácidos do N-terminal era 70% idêntica e 100% homóloga a uma prostaglandina D-sintetase, tipo lipocalina (GERENA et al., 1998).

BELLIN et al., (1994) identificaram as proteínas com habilidade de ligação à heparina, com massa molecular de 14, 21, 29 e 32 kDa, como indicadoras de fertilidade do touro. Os mesmos autores selecionaram animais de alto e de baixo potencial de fertilidade, conforme a presença, especificamente daquela de 32 kDa de massa, na membrana espermática e/ou no plasma seminal. Touros com a proteína presente no espermatozóide apresentaram maior taxa de fertilidade na monta natural.

Os estudos do perfil protéico também foram realizados nos zebuínos, no Brasil, mostrando diferenças entre o sêmen fresco e congelado e, as possíveis relações com a capacidade de fecundação (LIMA DIAS, 2002; MARQUES et al., 2000; FELICIANO SILVA et al., 2004; FERNANDES e FELICIANO SILVA, 2004).

No entanto, na espécie caprina ainda não se conhece referência quanto à relação entre a presença de proteínas e a capacidade de fecundação do sêmen, fresco ou congelado. O desenvolvimento desses estudos poderia auxiliar na seleção de reprodutores e no estabelecimento do potencial de fecundação do sêmen congelado.

Objetivos

1. Estabelecer um protocolo para extração de proteínas da membrana plasmática de espermatozoides de caprinos, compatível com a eletroforese bidimensional.

2. Identificar o perfil protéico da membrana plasmática dos espermatozoides no sêmen congelado nas estações seca, chuvosa-seca e seca-chuvosa, de caprinos doadores de sêmen.

Hipótese

O perfil protéico da membrana plasmática dos espermatozoides congelados de caprinos pode ser avaliado por eletroforese bidimensional (2-D) e, permite avaliar a viabilidade da congelação, entre doadores de sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local do experimento e animais experimentais

O trabalho de coleta e congelamento do sêmen foi conduzido no Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial (LATSIA) e as inseminações na Fazenda Experimental Santa Rita, da Embrapa Caprinos, em Sobral, Ceará a 3° 42' de latitude Sul, 40° 21' de longitude Oeste, na zona fisiográfica do Sertão Cearense, com uma altitude de 83 metros. O clima da região é do tipo AW de Savana segundo classificação climática de KOPPEN.

A região é caracterizada por um período chuvoso que vai de janeiro a junho com uma precipitação média de 722 mm³ o que corresponde a 95,15% do total médio anual, sendo que 73% deste ocorre entre os meses de fevereiro a maio, correspondendo a época chuvosa. De junho a julho ocorre a transição do período chuvoso para o período seco. Este apresenta uma precipitação média de apenas 36,8 mm³, concentrando-se nos meses de agosto a novembro, sendo que de dezembro a janeiro ocorre a transição do período seco para o chuvoso. A temperatura média anual é de 28°C, situando-se a máxima e a mínima, em torno de 35°C e 22°C, respectivamente. A umidade relativa do ar é de 60%, em média (RELATÓRIO... 1989).

As análises do perfil protéico dos espermatozoides foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOMOL) no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza em três momentos distintos, como descrito, a seguir.

Os momentos de coleta do sêmen e de inseminação artificial foram: I = 15.09 a 04.11.2002; II = 05.05 a 23.06.2003 e III = 04.01 a 23.02.2004, com intervalos de oito meses, correspondendo às épocas seca (I), de transição chuvosa-seca (II) e seca-chuvosa (III), nessa ordem.

Foram utilizados como doadores de sêmen seis reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana, com idade de 33 a 47 meses ao início do experimento, pertencentes a Embrapa Caprinos (Figura 1). Os machos foram mantidos estabulados durante todo o período experimental, em baia coletiva com área de 46,24 m², e recebendo silagem de milho (*Zea Mays*, Linn.) e capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) picado, à vontade. Cada macho recebia, também, 500 gramas/dia de uma mistura concentrada à base de milho

triturado, farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin.) e sal comum (NaCl), na proporção de 75, 23 e 2%, respectivamente. A mistura fornecia ao animal 89,1188% de matéria seca (MS), 5,07815% de fibra detergente neutra (FDN), 18,4572% proteína bruta (PB), 3,0893 Mcal/kg de energia metabolizável (EM), 0,5934% de Cálcio (Ca) e 0,4929% de Fósforo (P).



Figura 1 - Caprinos doadores de sêmen da raça Anglo-nubiana.

1.1. Coleta e processamento do sêmen

O sêmen foi colhido em vagina artificial (Figura 2) e avaliado quanto ao volume (mL), a concentração espermática ($\times 10^9/\text{mm}^3$), a motilidade individual progressiva (MIP, %), o vigor espermático, numa escala de 0 a 5, e morfologia espermática (ME) considerando-se defeitos maiores (DMa) e defeitos menores (Dme). Esta avaliação foi realizada no sêmen recém-colhido (f) e descongelado (d), neste último antes das inseminações.

Após as análises o sêmen foi submetido a congelamento em palhetas plásticas de 0,5 mL numa concentração de 150×10^6 espermatozoides de acordo com o protocolo vigente no LATSIA da Embrapa Caprinos (Anexo 1/Item 1 e 2) e no Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). O sêmen de cada reprodutor, congelado nas épocas I, II e III, foi estocado em nitrogênio líquido até a determinação do perfil protéico e as inseminações.



Figura 2 – Coleta de sêmen, em vagina artificial, de caprino da raça Anglo-nubiana.

1.1. Inseminação artificial

Para a inseminação, cabras pluríparas, que pariram pelo menos uma vez, sem raça definida (SRD) foram distribuídas em seis grupos experimentais, distribuídos aleatoriamente entre reprodutores e EIA. As cabras foram mantidas numa área de pastagem nativa de 180 hectares (Figuras 3, 4 e 5). A pastagem é caracterizada por uma vegetação em estágio inicial de sucessão secundária, com três estratos distintos, arbóreo, arbustivo e herbáceo, com predominância de marmeleiro (*Croton sonderianus* Mueli. Arg.), mofumbo (*Combretum leprosum* Mart.), pau-branco (*Auxemma oncocalix* Taub.), catingueira (*Caesalpinia bracteosa* Tul.), jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.), sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Bent.) e juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.). No estrato herbáceo destacam-se gramíneas como as milhãs (*Brachiaria plantaginea* e *Panicum sp.*), capim de roça (*Digitaria sp.*), capim rabo de raposa (*Setária sp.*) e capim panasco (*Aristida setifolia* H.B.K.) As dicotiledôneas herbáceas predominantes são o bamburral (*Hyptis suaveolens* Point), mata pasto (*Senna obtusifolia*), vassourinha de botão (*Borreria sp.*), azulão (*Centratherum sp.*), manda pulão (*Croton sp.*) e breço (*Amaranthus sp.*) (Araújo Filho et al., 1994).



Figura 3 – Pastagem nativa da caatinga época seca (EIA I), meados de agosto a setembro/2002.



Figura 4 – Pastagem nativa da Caatinga na época de transição chuvosa-seca (EIA II), meados de maio a início de junho/2003.



Figura 5 – Pastagem nativa da caatinga na época seca-chuvosa (EIA III). Início de janeiro/2004.

A escolha das fêmeas ocorreu com base no peso vivo e na condição corporal de 2,5, avaliada pela cobertura de gordura nas vértebras lombares e transversas, numa escala de 1 a 5 (MORAND-FEHR et al., 1989 – Anexo 2) e, ao número de doadores de sêmen.

As cabras foram submetidas à estimulação do estro através de um rufião, macho vazectomizado para o “*Efeito Macho*”. O manejo dos animais consistiu na separação das fêmeas do contato direto com os machos por um período aproximado de 30 dias. Após este período, o rufião foi introduzido no plantel de fêmeas para a estimulação estral.

As inseminações foram realizadas a partir do oitavo dia por via transcervical, entre 10 e 12 horas após a identificação da fêmea em estro pelo rufião (Figura 6).



Figura 6 – Inseminação artificial, via transcervical, na cabra com sêmen congelado.

2. Preparo das amostras de sêmen para eletroforese

2.1. Extração de proteínas totais da membrana plasmática dos espermatozóides

As amostras de sêmen, palhetas de 0,5 mL, foram descongeladas à 37 °C, por 30 segundos em tubos *eppendorff* de 2,0 mL. Em seguida, foi completado o volume do tubo com solução *Tris-Cloreto (TC)*, pH 7,4 (Anexo 3/Item 2) e centrifugado a 300 G, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada¹, à temperatura de 4 °C. Esta etapa foi repetida quatro vezes para uma melhor lavagem dos espermatozóides e remoção do diluidor.

Após a lavagem do sêmen, ao precipitado formado pelas células espermáticas foi adicionado 1,0 mL do tampão de extração de proteínas da membrana plasmática, composto de solução *TC + Triton X 100*, a 0,2% (Anexo 3/Item 3). O precipitado assim tratado foi agitado em vortex por 5 minutos, e centrifugado a 9.300 G, durante 15 minutos.

O sobrenadante obtido da centrifugação do precipitado acima constituiu o material utilizado para extração das proteínas do experimento. A este material foi adicionado 10% de *Ácido tricloroacético (TCA)*, agitado em vortex e centrifugado a 9.300 G, durante 15 minutos. O precipitado resultante foi lavado por quatro vezes com 500 µL de acetona gelada, e centrifugado a 9.300 G, durante 5 minutos. Após este tratamento procedeu-se a secagem à temperatura ambiente, obtendo-se, assim, o extrato de proteínas totais dos espermatozóides.

O preparo das amostras para obtenção de proteínas ocorreu de acordo com o método por precipitação descrito por BERKELMAN e STENSTED (1998), conforme Anexo 3/Item 1.

2.2. Dosagem de proteínas totais da membrana plasmática dos espermatozóides

O extrato protéico das amostras foi submetido à dosagem de proteínas totais, por colorimetria, segundo método descrito por BRADFORD (1976).

O método baseia-se na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G250 às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas pode ser observada por espectrofotômetro², sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e, tendo como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

A concentração foi medida em µg / 0,5 mL, ou seja por palheta.

¹ Eppendorf Centrifuge 5415 R

3. Eletroforese Bidimensional

As amostras do extrato de proteínas totais dos espermatozóides foram submetidas à análise por eletroforese bidimensional (eletroforese 2-D) de acordo com BERKELMAN e STENSTEDT (1998), protocolo padrão adotado e indicado pela Amersham Biosciences.

O método da eletroforese 2-D consiste na separação de proteínas de acordo com as suas propriedades, isto é o ponto isoelétrico (pI) e peso molecular. Assim sendo, o método apresenta duas etapas: a primeira dimensão, a técnica da focalização isoelétrica (IEF, *isoelectric focusing*) que separa as proteínas pelo seu pI e, a segunda da eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) que separa pelo peso molecular. As proteínas aparecem sob forma de *spots* (pontos), correspondendo cada *spot* a uma única proteína.

As etapas da eletroforese 2-D são descritas a seguir:

3.1. Focalização isoelétrica

A IEF – primeira dimensão da eletroforese, conforme mencionado, é a técnica que separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI). O pI é o pH específico em que a carga elétrica da proteína equivale a zero. A presença de um determinado gradiente de pH constitui o ponto crítico da técnica de IEF. Para obter o gradiente pH é utilizada a técnica de *IPG*³ ou do gradiente do pH imobilizado. O *IPG* é desenvolvido a partir da incorporação de soluções *buffers*, ácidos e bases, à acrilamida e bisacrilamida (monômeros e catalizadores) que polimerizam formando um gel de poliacrilamida. Este, depois de lavado e seco e cortado em fitas de IPG, com 3 mm de espessura, após reidratado é utilizado na IEF – primeira dimensão da eletroforese.

3.2. Reidratação das fitas de gel com gradiente de pH imobilizado

As fitas de gel, com gradiente de pH imobilizado, utilizadas no experimento foram de 11 cm de comprimento, com um gradiente de pH de 3 a 10. Estas foram submetidas a reidratação.

A solução de reidratação (SR; Anexo 3/Item 4) foi composta de Uréia 7M, *Tiouréia* 2M, *Ditiotreitol (DTT)* 65mM, 1% de *Triton X 100*, 0,5% de *Pharmalyte 3-10* e traços de *Bromophenol*, sendo os três últimos reagentes adicionados no momento da reidratação.

² Spectronic 20 Genesys

³ Immobiline DryStrip pH 3-10, 11 cm, Amersham Biosciences

As fitas de gel, IPG, foram dispostas nos canais da bandeja de reidratação denominada *Reswelling Tray* (Figura 7) sobre a amostra, sendo a face do gel voltada para baixo e, buscando sempre remover ou evitar a formação de bolhas entre a amostra e as fitas. Para prevenir a cristalização da uréia presente na SR foi adicionado 0,5 mL de óleo mineral sobre os géis, nos canais. A reidratação ocorreu durante a noite, com duração mínima de oito horas.



Figura 7 - Bandeja com IPG's em reidratação.

3.3. Preparo para IEF – primeira dimensão

No procedimento foi empregado um sistema *Multiphor II*⁴ (Figura 7).

As fitas IPG, já reidratadas, foram retiradas do *Reswelling Tray* e o excesso de óleo mineral e SR removidos usando água destilada. Esta ação visou prevenir a formação de cristais de uréia na superfície do gel durante a IEF. As fitas foram então transferidas para o *DryStryp Aligner*⁵, um suporte plástico que reproduz os canais do *Reswelling Tray*. As fitas, depois de cobertas com óleo mineral, foram fixadas nas extremidades, anodo e catodo, com elétrodos de fixação que ficaram em contato com o gel das fitas. Em seguida foi adicionado óleo mineral para cobrir completamente as fitas (Figuras 8, A e B).

⁴ Multiphor II, Pharmacia Biotech, USA.

⁵ Amersham Pharmacia Biotech, USA.

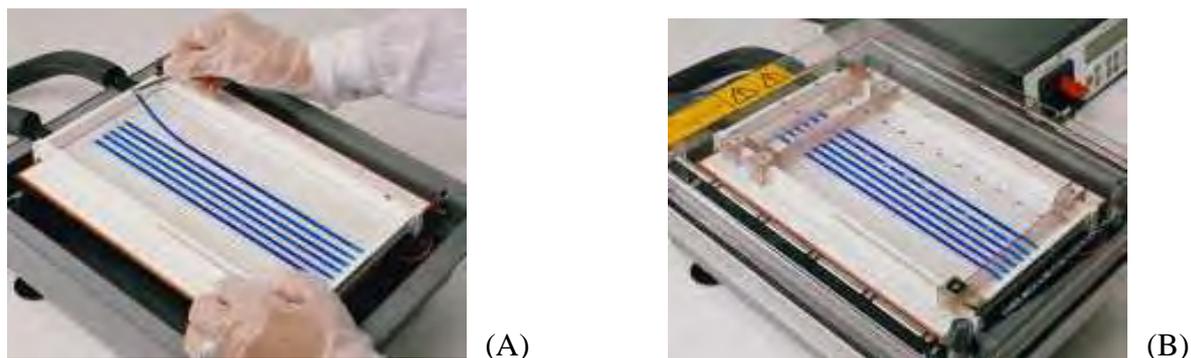


Figura 8 - IPG's no Multiphor II (A), com elétrodos de fixação, anodo e catodo (B).

O volume da SR utilizado para dissolver cada amostra de proteína extraída foi de 200 μL , de modo a obter uma concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e conseqüentemente, de 200 μg de proteína total aplicada. Uma vez solubilizadas, as amostras permaneceram em contato com a SR por 15 minutos e depois de centrifugadas foram aplicadas nos canais do *Reswelling Tray*.

Esta preparação foi colocada sobre a placa de focalização do *Multiphor II* (Figura 9). Em seguida foi submetidas à corrente elétrica, empregando-se uma fonte EPS 3500 XL, da *Pharmacia Bioscience*. A corrida eletroforética para IEF apresentou três fases: 1) 300V, 2mA, 5W durante 1 minuto; 2) 3500V, 2mA, 5W durante 1:30 minutos e 3) 3500V, 2mA, 5W durante 2:35 minutos.



Figura 9 – IEF das IPG's no Multiphor II.

Ao término da IEF, as fitas (géis da primeira dimensão) foram retiradas do *Multiphor II*, removido o excesso de óleo mineral e armazenadas em tubos de vidro, devidamente vedados e identificados e, mantidos à temperatura de -80°C , até a corrida da segunda dimensão.

3.4. Eletroforese em SDS-PAGE

A segunda dimensão (SDS-PAGE) foi conduzida, num sistema vertical, em gel homogêneo de acrilamida a 15% (água bidestilada - 6,9 mL; Bis/Acrilamida 1%/29% - 15 mL; Tris 1,5 M pH 8,8 - 7,5 mL; SDS 10% - 300 μL ; Persulfato de Amônia 10% - 300 μL e Temed 30 μL). O volume de 30 mL de gel foi suficiente para preencher uma placa de vidro molde medindo 14 x 14 cm (Figura 10). Após preencher as placas, aguardou-se cerca de uma hora para permitir a polimerização do gel (GÖRG, 2001).

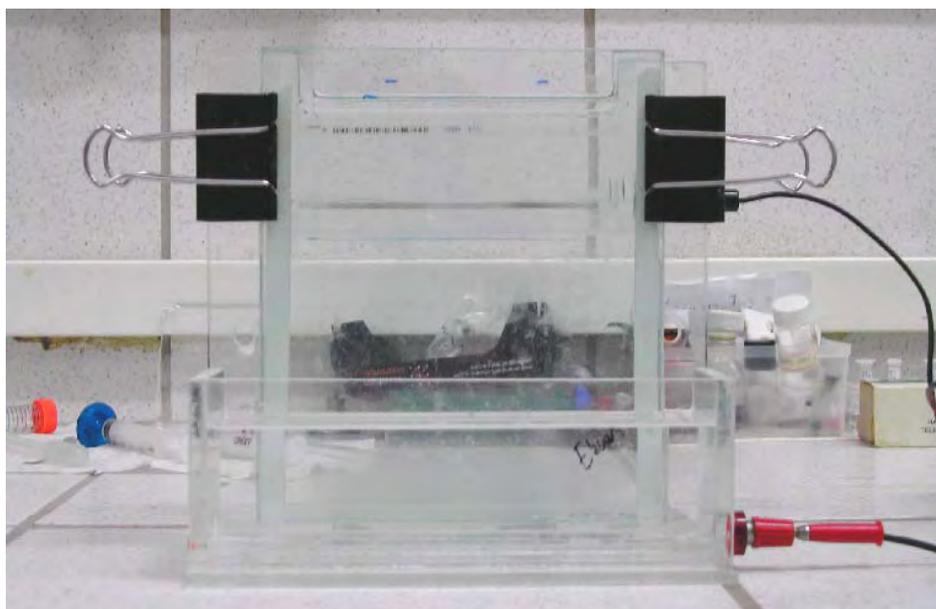


Figura 10 – Placa molde de 14 x 14 cm para gel homogêneo de acrilamida a 15%, na cuba.

Antes de proceder a corrida da segunda dimensão, as fitas (géis da primeira dimensão) foram colocadas em contato com 3 mL da Solução de Equilíbrio (Anexo 3/Item 5), acrescido de 57,8 mg de DTT, sob agitação durante 10 minutos. Este procedimento visou manter o estado desnaturante das proteínas, prevenir a reoxidação e amenizar os efeitos da eletroendosse. Após o equilíbrio, as fitas de IPG foram lavadas com tampão de corrida (Tris 0,25 M - 30,2 g; Glicina 1,92 M - 144,1 g; SDS 1,0% - 10,0 g; Água bidestilada q.s.p. – 1000 mL) (GÖRG, 2001).

O molde com o gel polimerizado foi colocado na cuba vertical, preenchendo-a com o tampão de corrida, seguida pela introdução do gel de primeira dimensão, utilizando marcadores de peso molecular entre 14 e 94 kDa⁶.

A cuba foi então conectada à fonte estabilizadora⁷, procedendo-se à corrida em duas fases, sendo a primeira fase, com uma corrente fixada em 10mA, durante 15 minutos enquanto a segunda, numa corrente constante de 20mA, por aproximadamente cinco horas, até a saída total do bromofenol, do gel (Figura 11).

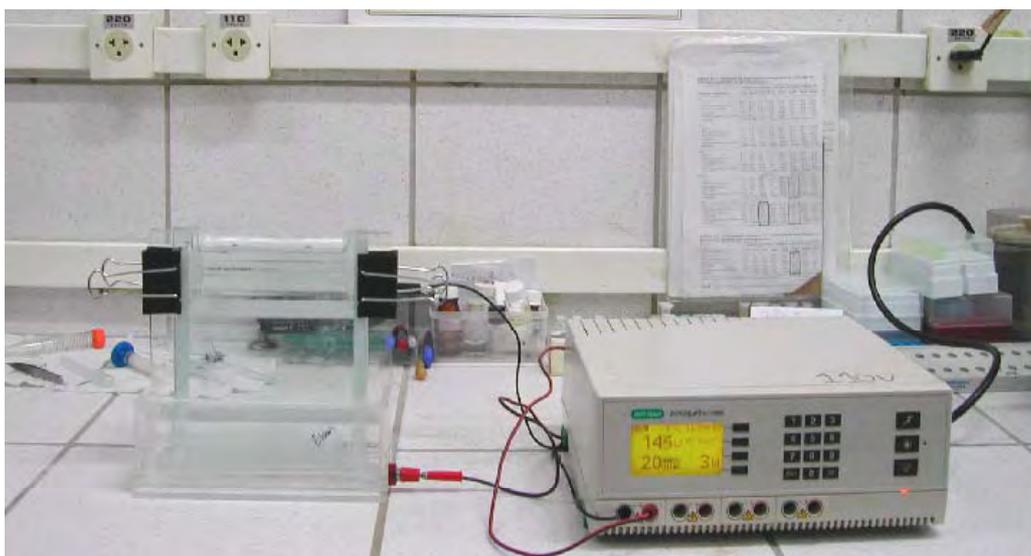


Figura 11 - Cuba conectada à fonte estabilizadora para corrida da eletroforese.

Após a corrida, os géis foram retirados das placas de vidro e incubados com solução Corante *PhastGel Blue R-350* a 0,02 % (Anexo 3/Item 6) por, três horas. Em seguida procedeu-se ao descoramento em solução descorante (Metanol: Ácido Acético: Água; na proporção 3: 1: 6), por aproximadamente duas horas e, fixação em solução de glicerol (Metanol 50 %, Glicerol 5 %). No final destes processos a imagem dos géis foi digitalizada e analisada utilizando uma versão “free” do software⁸ padrão da Amersham Biosciences.

⁶ LMW Electrophoresis Calibration kit, Pharmacia 17-0446-01

⁷ PowerPac 3000, BioRad

⁸ ImageMaster 2D Platinum, versão 4.9.

3.5. Análise estatística

Os dados referentes às características físico-morfológicas do sêmen foram codificados em formulários próprios segundo o protocolo do Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial (LATSIA) da Embrapa Caprinos, sendo no seu processamento utilizando o *Statistical Analysis Systems* (SAS).

As características estudadas com valores obtidos em percentuais foram transformadas para arcoseno do % e àquelas expressas em escala de nota foram, apenas, transformadas em raiz quadrada, segundo SNEDCOR & COCHRAN (1982).

O delineamento experimental para análise estatística das características do sêmen foi o Fatorial 6 x 3, correspondente a seis reprodutores versus três épocas de inseminação artificial (EIA's).

Os dados das características do sêmen foram submetidos à análise de variância, segundo o esquema a seguir:

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE
Total	111
Reprodutor	05
EIA	02
Reprodutor X EIA	10
Resíduo	94

EIA – Estação de inseminação artificial

As informações processadas constaram de médias mais ou menos erros-padrão ($X \pm EP$), e correlações simples com determinação dos coeficientes de Pearson (r) e respectivos testes de significância.

A significância do efeito de reprodutor, de EIA e da interação reprodutor x EIA foi obtida através do Teste F de Fischer.

Os géis obtidos por eletroforese bidimensional (2-D), após a imagem digitalizada, foram analisados, qualitativamente, registrando-se o peso molecular (PM), em kDa, e o ponto isoelétrico (pI) das proteínas.

RESULTADOS

1. Parâmetros espermáticos

A análise de variância dos resultados obtidos da avaliação dos parâmetros das características seminais é apresentada na Tabela 1 e 2.

Verificou-se a influência do reprodutor, época de inseminação (EIA), e a interação de ambas sobre a maioria dos parâmetros espermáticos.

O efeito de reprodutor (Tabela 1) foi significativo sobre o volume, a concentração, a motilidade individual progressiva do sêmen fresco (MIP-f) e, ainda, sobre o aspecto ($P < 0,05$). No entanto, não foi significativo ($P > 0,05$) sobre vigor-f, motilidade individual progressiva do sêmen descongelado (MIP-d) e vigor-d.

A influência da EIA (Tabela 1) foi significativa sobre o volume, aspecto, a concentração, o vigor-f e MIP-f ($P < 0,05$). Entretanto, não houve influência significativa ($P > 0,05$) sobre a MIP-d e vigor-d.

Houve efeito significativo da interação reprodutor x EIA (Tabela 1) sobre a concentração ($P < 0,05$) e o aspecto ($P < 0,05$) e, não significativo para os demais parâmetros.

A análise de variância em função da morfologia espermática entre reprodutores (Tabela 2) revelou influência da descongelação sobre os defeitos maiores ($P < 0,01$) e menores ($P < 0,05$).

As médias dos parâmetros seminais em estudo estão apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5, sendo os resultados das tabelas 3 e 4 apresentados em relação aos reprodutores e a Tabela 5 às épocas de inseminação artificial.

A média do volume dos ejaculados variou de $0,51 \pm 0,461$ a $0,87 \pm 0,589$ mL, entre reprodutores, conforme apresentado na Tabela 3.

O valor médio, máximo e mínimo, da concentração espermática observada entre os animais estudados foi de $3,44 \pm 0,953$ e $4,31 \pm 0,630 \times 10^6/\text{mm}^3$. Por conseguinte, o aspecto, parâmetro que guarda estreita relação com a concentração espermática apresentou valores de $4,37 \pm 1,032$ e $5,17 \pm 0,786$, numa escala de nota de 1 a 6, correspondendo a aquoso (1); turvo (2); leitoso (3); leitoso-espesso (4); cremoso (5) e cremoso-espesso (6), respectivamente

(Tabela 3). Houve diferença significativa na concentração do sêmen ($P<0,05$) entre reprodutores.

A motilidade individual progressiva (MIP) dos espermatozóides, entre reprodutores, avaliada a fresco (MIP-f) e à descongelação (MIP-d) mostrou valores médios, máximos e mínimos, de $68,42\pm 5,149\%$ e $86,31\pm 2,226\%$ e de $21,18\pm 3,629\%$ e $27,89\pm 3,840\%$, respectivamente. Foi observada diferença significativa ($P<0,05$) na MIP-f entre reprodutores, porém o mesmo não foi constatado na MIP do sêmen descongelado.

E, a média do vigor espermático, valores máximos e mínimos, foi de $3,78\pm 0,654$ e $3,26\pm 0,898$ para o sêmen recém-colhido e, de $2,05\pm 0,799$ e $1,67\pm 1,023$ à descongelação (Tabela 3).

No sêmen recém-colhido, os valores médios máximos e mínimos dos defeitos maiores (DMA-f) foram de $7,81\pm 1,732\%$ e $3,68\pm 1,523\%$, e os defeitos menores (Dme-f) de $13,92\pm 4,005\%$ e $6,89\pm 1,772\%$ (Tabela 4).

No sêmen descongelado os DMA-d apresentaram valores médios, máximos e mínimos, equivalentes a $7,38\pm 1,629\%$ e $3,47\pm 1,617\%$ e $13,47\pm 3,253\%$ e $7,83\pm 1,925\%$ para Dme-d (Tabela 4).

Na Tabela 5, onde são apresentados os parâmetros seminais em relação às épocas de inseminação artificial (EIA), observa-se diferença significativa ($P<0,05$) entre os parâmetros do sêmen recém-colhido, concentração, MIP e vigor. No entanto, esta diferença não foi notada no sêmen descongelado.

As correlações simples entre os parâmetros seminais dos reprodutores usados neste estudo apresentaram baixos coeficientes de Pearson (Tabela 6).

O volume apresentou correlação negativa e significativa ($P<0,01$) com a concentração espermática ($r = - 0,33$). Ainda, foram observadas correlações positivas e significativas entre os parâmetros MPI-f e vigor-f ($r = 0,759$; $P<0,01$), MIP-d ($r = 0,213$; $P<0,05$) e vigor-d ($r = 0,233$; $P<0,05$), respectivamente. Houve, também, correlação positiva e significativa ($P<0,01$) entre os DMA-f e DMA-d ($r = 0,397$) e de Dme-f e Dme-d ($r = 0,568$).

As correlações entre os demais parâmetros seminais foram baixas e não significativas, além de pouco relevantes para o propósito do estudo.

Tabela 1 – Análise de variância dos quadrados mínimos dos parâmetros espermáticos a fresco (f) e à descongelação (d) e, a proteína total, em função de reprodutor (R), da época de inseminação artificial (EIA) e interações (R x EIA), de caprinos da raça Anglo-nubiana.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS									
		Volume (mL)	Aspecto (1 a 6)	Concentração (x10 ⁹ spz/mL)	MIP-f (%)	Vigor-f (0 a 5)	MIP-d (%)	Vigor-d (0 a 5)	Proteína total (µg/0,5mL)		
R	05	0,1172**	908,6641*	3628,8533**	1,1617E23**	4037823,01	153,1922	0,5474	13651,3082**		
EIA	02	0,2290**	2431,2670**	8991,5428**	1,2236E23*	12972604,72**	110,9495	0,2849	9888,4746**		
R x EIA	10	0,0487	709,9441*	1811,1102**	4,0778E22	413993,42	91,8454	0,8372	7096,7486**		
Erro	(a)	0,0339 (94)	327,6186 (94)	537,4064 (94)	3,2119E22 (93)	2522139,4 (93)	180,2281 (83)	0,5555 (83)	0,0 (95)		
CV	-	22,67	33,77	32,20	54,72	58,42	53,15	26,14	0,0		

** P<0,01

MIP-f e MIP-d = Motilidade individual progressiva do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

CV = Coeficiente de variação (%)

Tabela 2 – Análise de variância dos quadrados mínimos da morfologia espermática a fresco (f) e à descongelação (d), em função de reprodutor (R), da época de inseminação artificial (EIA) e interações (R x EIA), de caprinos da raça Anglo-nubiana.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	QUADRADOS MÉDIOS						
		DMa-f	Dme-f	DT-f	DMa-d	Dme-d	DT-d	
R	5	0,0529	0,0285	0,0006	1,1125**	0,1061*	0,0596	
EIA	1	0,0507	0,1041	0,0003	0,0962	0,0573	0,0595	
R x EIA	5	0,0777	0,0252	0,0014	0,4515	0,0434	0,0509	
Erro	(a)	0,0358 (41)	0,0559 (41)	0,0012 (41)	0,2938 (79)	0,0425 (79)	0,0311 (79)	
CV	-	24,70	26,10	39,31	23,83	20,77	15,66	

* P<0,05

** P<0,01

DMa -f e DMa-d = Defeitos maiores do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Dme- f e Dme -d = Defeitos menores do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

CV = Coeficiente de variação (%).

Tabela 3 – Médias (\pm ep) dos parâmetros espermáticos dos reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.

Reprodutor	Volume (mL)	Aspecto (1 a 6)	Concentração ($\times 10^9$ spz/mL)	MIP-f (%)	Vigor-f (0 a 5)	MIP-d (%)	Vigor-d (0 a 5)	Proteína total ($\mu\text{g}/0,5\text{mL}$)
115	0,64 ^{bc} (0,509)	5,05 ^a (0,636)	4,31 ^a (0,630)	86,31 ^a (2,226)	3,74 ^a (0,673)	27,89 ^a (3,840)	1,95 ^a (0,788)	59,02 ^a (3,137)
42	0,87 ^a (0,589)	4,74 ^a (0,750)	3,89 ^b (0,883)	83,33 ^{ab} (2,899)	3,78 ^{ab} (0,654)	26,67 ^a (3,293)	2,05 ^a (0,799)	45,82 ^c (2,805)
110	0,75 ^{ab} (0,625)	4,37 ^b (1,032)	3,44 ^c (0,953)	71,58 ^c (3,921)	3,47 ^{ab} (0,716)	25,63 ^a (3,626)	1,88 ^a (0,898)	38,29 ^f (2,553)
109	0,80 ^{ab} (0,598)	4,72 ^{ab} (0,946)	4,18 ^{ab} (0,833)	73,89 ^{bc} (4,977)	3,39 ^{ab} (1,018)	21,33 ^a (4,104)	1,67 ^a (1,023)	41,58 ^e (3,475)
126	0,65 ^{bc} (0,558)	4,89 ^a (0,936)	4,12 ^{ab} (0,734)	68,42 ^c (5,149)	3,26 ^b (0,898)	21,18 ^a (3,629)	1,71 ^a (0,878)	43,50 ^d (2,582)
148	0,51 ^c (0,461)	5,17 ^a (0,786)	4,26 ^a (0,970)	82,78 ^{ab} (2,587)	3,50 ^{ab} (0,717)	21,88 ^a (2,739)	1,81 ^a (0,809)	49,56 ^b (2,975)

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, são significantes ao nível de 5% pelo teste t.

MIP-f e MIP-d = Motilidade individual progressiva do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Vigor-f e Vigor-d = Vigor do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Tabela 4 – Médias (\pm ep) das morfologias espermáticas a fresco (f) e à descongelação (d) em função dos reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.

Reprodutor	Sêmen recém-collhido				Sêmen descongelado			
	DMa-f	Dme-f	DT-f		DMa-d	Dme-d	DT-d	
115	4,59 ^{bc} (1,694)	7,28 ^a (2,004)	11,87 ^{ab} (2,565)		3,96 ^b (1,794)	11,07 ^a (1,918)	15,03 ^a (2,392)	
42	3,68 ^c (1,523)	6,91 ^a (1,780)	10,59 ^b (2,099)		3,47 ^b (1,617)	7,83 ^b (1,925)	11,30 ^b (2,203)	
110	4,94 ^{abc} (1,459)	8,61 ^a (2,059)	13,55 ^{ab} (1,881)		4,39 ^b (1,650)	8,21 ^b (2,245)	12,60 ^{ab} (2,093)	
109	6,94 ^{ab} (2,050)	6,89 ^a (1,772)	13,83 ^{ab} (2,210)		3,95 ^b (1,477)	13,16 ^a (3,545)	17,11 ^a (3,427)	
126	5,58 ^{abc} (1,727)	13,92 ^a (4,005)	19,50 ^a (4,104)		4,19 ^b (1,5120)	13,47 ^a (3,253)	17,66 ^a (3,392)	
148	7,81 ^{abc} (1,732)	7,00 ^a (2,183)	14,81 ^{ab} (2,256)		7,38 ^a (1,629)	8,06 ^b (1,844)	15,44 ^a (2,056)	
Média Geral	5,55\pm1,240	8,44\pm1,663	14,03\pm1,754		4,56\pm1,190	10,30\pm1,618	14,86\pm1,579	

** P<0,01

DMa -f e DMa-d = Defeitos maiores do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Dme- f e Dme -d = Defeitos menores do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

DT- f e DT-d = Defeitos totais do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Tabela 5 – Médias (\pm ep) dos parâmetros espermáticos dos reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana, em função das três épocas (I, II, III) de inseminação artificial (EIA).

EIA	Volume (mL)	Aspecto (1 a 6)	Concentração ($\times 10^9$ spz/mL)	MIP-f (%)	Vigor-f (0 a 5)	MIP-d (%)	Vigor-d (0 a 5)	Proteína total (μ g/0,5mL)
I	0,57 ^b (0,488)	5,20 ^a (0,795)	4,39 ^a (0,783)	72,86 ^b (4,764)	3,26 ^b (0,923)	22,06 ^a (3,428)	1,76 ^a (0,861)	44,97 ^b (3,157)
II	0,87 ^a (0,591)	4,60 ^b (0,946)	3,68 ^c (0,895)	78,67 ^{ab} (3,458)	3,53 ^{ab} (0,712)	24,80 ^a (3,505)	1,84 ^a (0,864)	52,54 ^a (3,829)
III	0,69 ^b (0,589)	4,68 ^b (0,869)	3,98 ^b (0,877)	80,65 ^a (4,031)	3,72 ^a (0,738)	25,71 ^a (3,787)	1,93 ^a (0,882)	43,26 ^c (2,588)

Médias seguidas por letras diferentes, dentro de cada coluna, são significantes ao nível de 5% pelo teste t.

MIP-f e MIP-d = Motilidade individual progressiva do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Vigor-f e Vigor-d = Vigor do sêmen a fresco e à descongelação, respectivamente.

Tabela 6 – Coeficientes de correlação simples entre os parâmetros espermáticos e proteína total da membrana dos espermatozoides descongelados, em reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.

Parâmetro	Volume	Concentração	MIP-f	Vigor-f	MIP-d	Vigor-d	Proteína						
							DMa-f	Dme-f	DT-f	DMa-d	Dme-d	DT-d	
							Total						
Volume	-	-0.330**	-0.027	-0.081	0.034	0.017	-0.082	0.036	-0.191	0.060	-0.116	-0.089	-0.148
Concentração			0.051	0.055	-0.147	-0.017	0.258	0.079	0.066	-0.039	-0.090	0.173	0.103
MIP-F				0.759**	0.213*	0.233*	0.279	-0.062	-0.261	0.246	-0.035	-0.223	-0.248
Vigor-F					0.309*	0.250*	0.161	-0.132	-0.030	0.159	-0.131	-0.117	-0.215
MIP-D						0.811**	0.157	-0.160	-0.335	0.279	-0.040	-0.151	-0.167
Vigor-D							0.234	-0.148	-0.415	0.312	0.024	-0.225	-0.208
Proteína Total								-0.024	0.080	0.020	0.009	-0.028	-0.063
DMa-F									0.038	-0.686**	0.397**	-0.013	0.198
Dme-F										-0.676**	0.011	0.568**	0.431**
DT-F											-0.274	-0.327*	-0.407**
Dma-D.												-0.073	0.421**
Dme-D.													0.851**
DT-D													-

* P<0,05 ** P<0,01;

MIP-f e MIP-d = Motilidade individual progressiva do sêmen a fresco e à descongelção, respectivamente.

Vigor-f e Vigor-d = Vigor do sêmen a fresco e à descongelção, respectivamente.

DMa -f e DMa-d = Defeitos maiores do sêmen a fresco e à descongelção, respectivamente.

Dme- f e Dme -d = Defeitos menores do sêmen a fresco e à descongelção, respectivamente.

2. Proteína total da membrana plasmática dos espermatozoides

A análise de variância dos resultados mostrou influencia significativa ($P < 0,01$) do reprodutor, época de inseminação artificial e interação reprodutor x época sobre a concentração da proteína total dos espermatozoides (Tabela 1).

As medias das concentrações de proteínas totais espermáticas variaram ($P < 0,05$) entre os reprodutores (Tabelas 3 e 7), apresentando valores máximos de $59,02 \pm 3,137 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$ e mínimos de $38,29 \pm 2,553 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$.

Em função das épocas de inseminação, as médias das concentrações de proteína total espermática, de cada reprodutor, mostraram uma acentuada variação individual. Foi observado ainda, que os reprodutores sofreram, com menor ou maior intensidade na concentração de proteína total espermática, fortes influencias da época de inseminação, uma vez que apresentaram valores significativamente ($P < 0,05$) irregulares (Tabela 7).

Nenhuma correlação significativa (Tabela 6) foi verificada entre o nível de proteína total e os parâmetros espermáticos. Os maiores coeficientes de Pearson encontrados para as correlações foram entre a proteína total e a concentração espermática ($r = 0,258$), MIP ($r = 0,279$) e vigor ($r = 0,161$) a fresco, e a MIP ($r = 0,157$) e vigor ($r = 0,234$) à descongelação. No entanto, não houve significância.

Tabela 7 – Médias das concentrações de proteína total dos espermatozoides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, nas três épocas de inseminação artificial (I, II e III).

Reprodutor	Época de Inseminação Artificial/ Concentração de proteína total ($\mu\text{g}/0,5 \text{ ML}$)		
	I	II	III
115	58,65 ^{bA}	73,83 ^{aA}	50,04 ^{cB}
42	44,76 ^{bD}	57,97 ^{aC}	39,03 ^{cD}
110	46,74 ^{aC}	30,25 ^{cF}	36,98 ^{bE}
109	27,13 ^{cF}	38,37 ^{bE}	54,43 ^{aA}
126	40,47 ^{bE}	54,31 ^{aD}	39,02 ^{cD}
148	52,10 ^{bB}	60,48 ^{aB}	39,58 ^{cC}

^{Aa/Ee} Medias seguida por letras minúsculas (maiúsculas) diferentes, nas colunas (linhas), diferem entre si ao nível de 5%.

3. Proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides identificadas por eletroforese 2-D

Os pesos moleculares (kDa) e pontos isoelétricos (pI) obtidos na eletroforese 2-D de espermatozóides descongelados dos reprodutores caprinos utilizados na inseminação artificial são apresentados nas Tabelas 8 e Figuras 1, 2, 3 e 4.

Com base no peso molecular, as proteínas encontradas foram consideradas como: peptídeos, peso molecular inferior a 20 kDa e proteínas com peso molecular entre 30 a 94 kDa. Essa classificação foi definida com base no marcador de massa molecular usado na corrida eletroforética, cuja faixa foi de 14.400 a 94.000 daltons. As demais massas moleculares foram determinadas através da equação linear da mobilidade relativa (Mr).

Os *spots* encontrados em todos os géis de SDS-PAGE a 15% foram identificados com numeração ímpar crescente, a partir do número 1, conforme apresenta a Figura 1.

Foram encontrados, ao todo, 25 *spots*, isto é representação eletroforética das proteínas, sendo 11 com pesos moleculares abaixo de 10,5 kDa, considerados peptídeos, conforme definição de NELSON & COX (2002). Ainda, como peptídeos foram observados sete *spots* com pesos moleculares de 11,8 até 16,6 kDa. O restante das proteínas apresentou pesos moleculares variando de 31,3 até 65,4 kDa (Tabela 8).

Foram observados vários isômeros, proteínas de peso molecular igual porém cargas isoelétricas (pI) diferentes, como os peptídeos 10,3, 10,5 e 12,2 kDa.

Não houve variação no conteúdo de proteínas entre as amostras.

O peptídeo de peso molecular 5,7 kDa não foi encontrado nos espermatozóides dos reprodutores 42, 126 e 148 em nenhuma das estações de inseminação artificial.

Ainda, o peptídeo de peso molecular 6,4 kDa não foi identificado em todas as EIAs, em relação ao sêmen descongelado de todos os reprodutores.

Tabela 8 - Identificação de proteínas de membrana dos espermatozóides descongelados de caprinos da raça Anglo-nubiana, independente de reprodutor e da EIA.

Número do <i>Spot</i> (Ponto)	Peso Molecular (kDa)	Ponto isoeletrico (pI)
1, 8 e 14	10,3	4,6 a 8,7
2	8,4	4,7
3	6,4	5,2
4	5,7	6,3
5	6,9	6,1
6	8,1	6,7
7 e 10	10,5	5,7 a 6,7
9	10,0	6,2
11	11,8	6,6
12 e 13	12,2	5,0 a 5,6
15	13,6	5,2
16	14,1	6,3
17	14,5	7,0
18	16,6	6,6
19	38,3	5,6
20	26,8	7,3
21	31,3	7,2
22	36,4	6,7
23	64,2	4,6
24	65,4	5,5
25	61,3	6,5

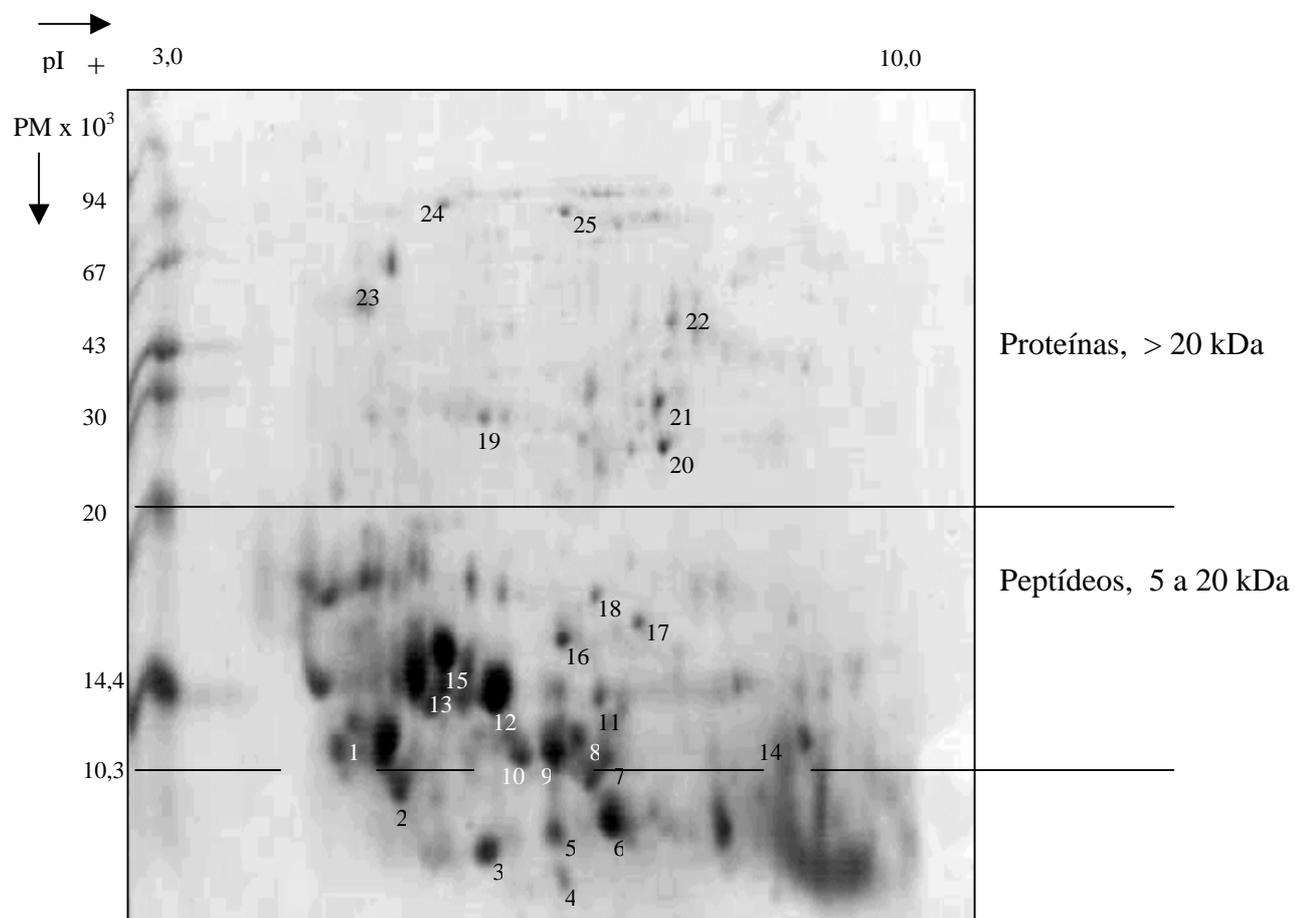


Figura 12 – Gel referência de eletroforese bi-dimensional de proteínas de membrana de espermatozoides descongelados de reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana.

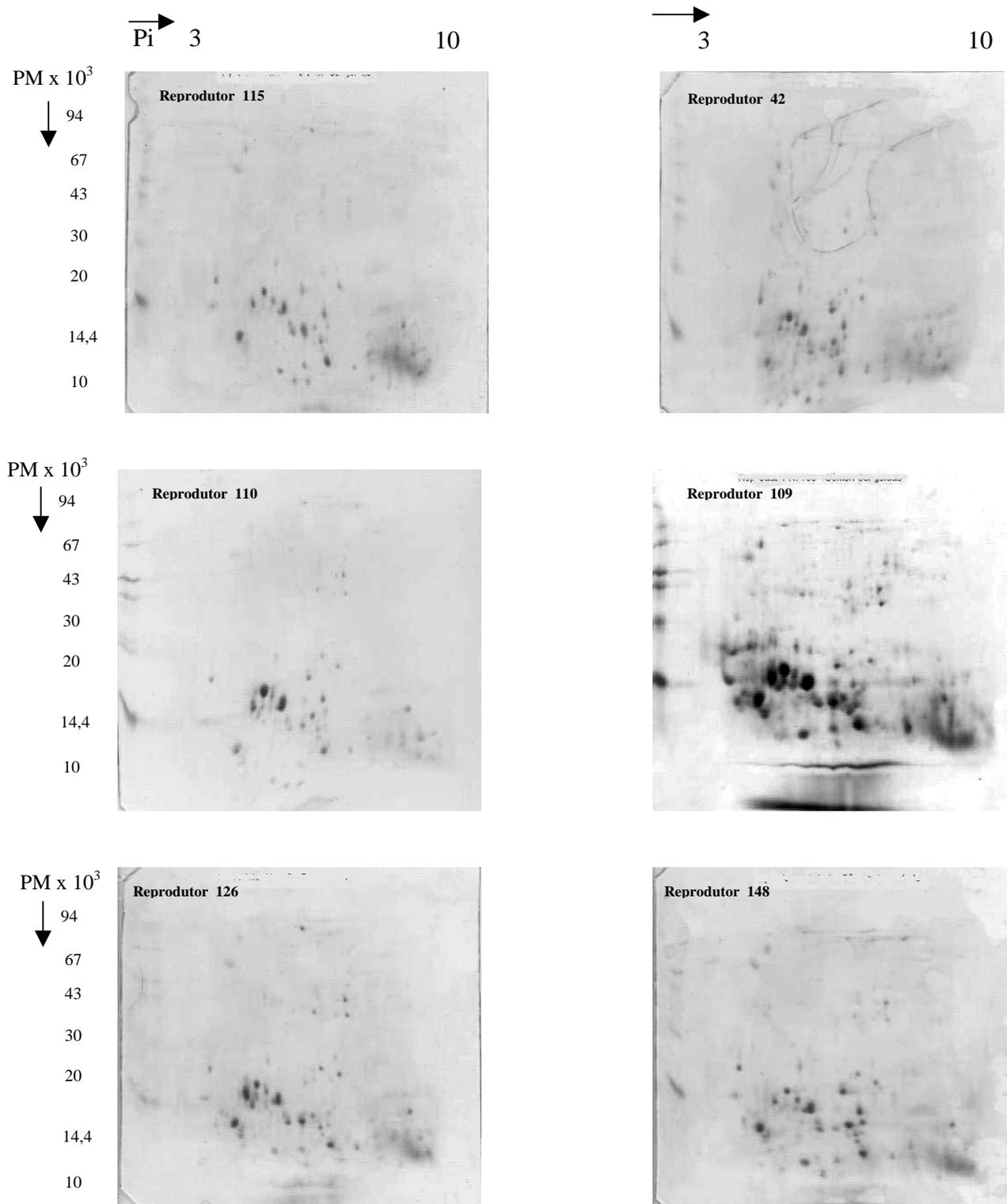


Figura 13 - Géis de eletroforese 2-D da membrana plasmática de espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função da primeira época (seca) de inseminação artificial.

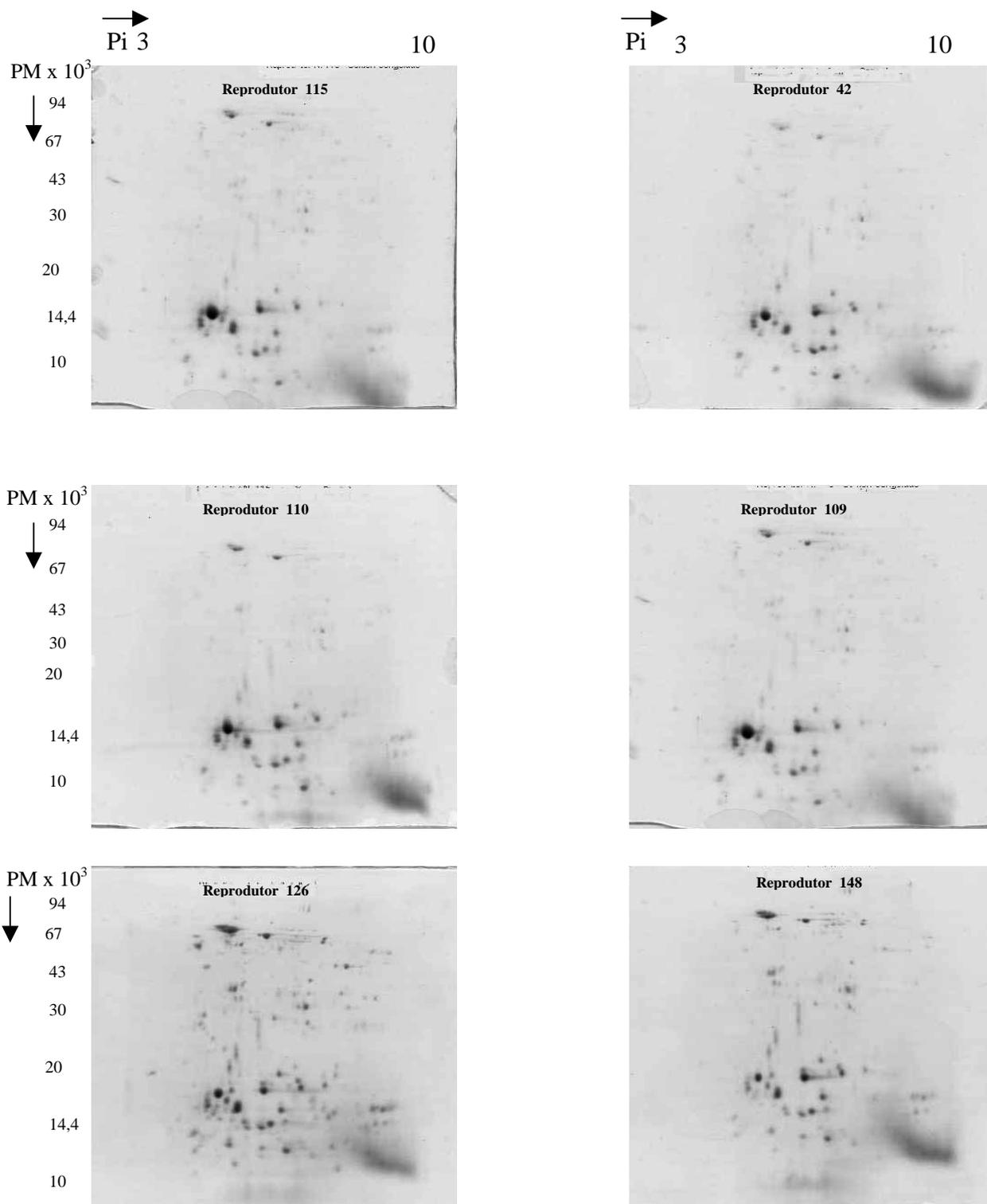


Figura 14 - Géis de eletroforese 2-D da membrana plasmática de espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função da segunda época (chuvosa-seca) de inseminação artificial.

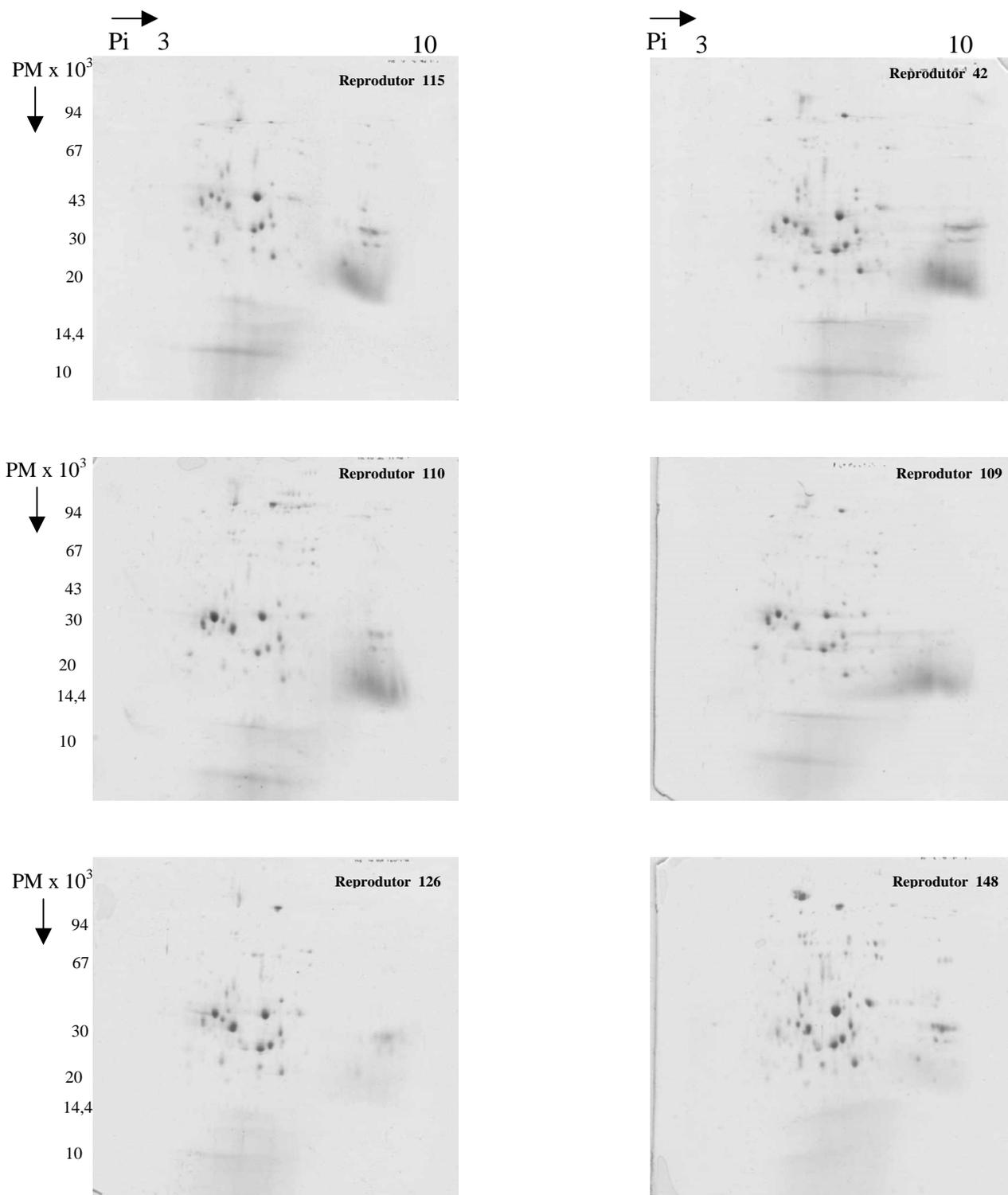


Figura 15 - Géis de eletroforese 2-D da membrana plasmática de espermatozóides descongelados, de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função da terceira época (seca- chuvosa) de inseminação artificial.

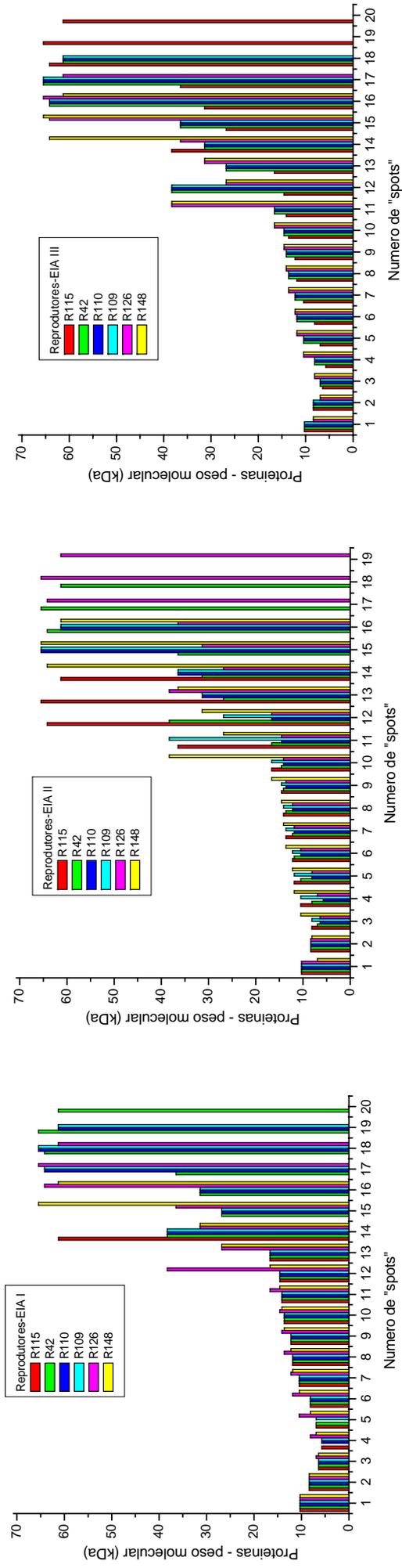


Figura 16 - Representação gráfica das proteínas da membrana plasmática de espermatozoides de caprinos da raça Anglo-nubiana, em função das épocas de inseminação artificial (I, II e III).

4. Fertilidade dos reprodutores

A fertilidade do sêmen descongelado foi avaliada estatisticamente pelo qui-quadrado. A avaliação foi realizada após a inseminação de 321 cabras distribuídas entre os seis reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiana, nas três épocas de inseminação artificial, verificando a taxa de congelabilidade pela taxa de prenhez. A análise estatística não revelou diferença significativa ($P>0,05$) entre reprodutores, para fertilidade do sêmen descongelado ($\chi = 0,6326$). A taxa de prenhez, média, considerando a totalidade dos reprodutores e inseminações foi de 15,26 % (Tabela 9). Não houve diferença na taxa de prenhez entre reprodutores ($P>0,05$).

Tabela 9 – Número de cabras e taxa de prenhez após inseminação com sêmen descongelado de reprodutores da raça Anglo-nubiana.

Reprodutor	Cabras inseminadas/taxa de prenhez			
	Prenhe	Não Prenhe	Total	(%)
115	11	47	58	18,97
42	09	43	52	17,31
110	09	46	55	16,36
109	09	47	56	16,07
126	07	39	46	15,22
148	04	50	54	7,41
Total	49	272	321	15,26

Qui-quadrado, 5 Graus de liberdade = 3,4390, $P = 0,6326$, Não significativo.

No entanto, houve diferença estatística ($P<0,05$) na taxa de fertilidade dos reprodutores quando a taxa de prenhez foi avaliada em função de EIA, observando-se redução da primeira para a terceira época (Tabela 10).

Tabela 10 – Número de cabras e taxa de prenhez após inseminação com sêmen descongelado de reprodutores da raça Anglo-nubiana, nas três épocas de inseminação artificial (I, II, III).

Reprodutor	Época de Inseminação Artificial/Taxa de prenhez											
	I				II				III			
	P	NP	Total	%	P	NP	Total	%	P	NP	Total	%
115	06	20	26	23,08 ^a	03	12	15	20,00 ^a	02	15	17	11,76 ^b
42	05	17	22	22,73 ^a	03	12	15	20,00 ^a	01	14	15	6,67 ^b
110	05	19	24	20,83 ^a	02	14	16	12,50 ^a	02	13	15	13,33 ^a
109	05	18	23	21,74 ^a	03	15	18	16,67 ^a	01	14	15	6,67 ^b
126	04	12	16	25,00 ^a	03	11	14	21,43 ^a	00	16	16	0,00 ^b
148	02	18	20	10,00 ^a	01	18	19	5,26 ^a	01	14	15	6,67 ^a
Total	27	104	131	20,61	15	82	97	15,46	07	86	93	7,53

P = Prenhe; NP = Não Prenhe

Qui-quadrado, 10 Graus de liberdade = 19,3573, P = 0,0360, Significativo.

I = época seca; II = época chuvosa-seca; III = época seca-chuvosa.

DISCUSSÃO

1. Parâmetros espermáticos

O quadro espermático dos seis reprodutores caprinos usados neste estudo está dentro da normalidade e atende aos padrões estabelecidos pelo CBRA (1998) para o processamento de sêmen, visando a congelação. Ainda, estão de acordo com os achados de SANTOS (1995) quando avaliou esses mesmos parâmetros no sêmen das raças Moxotó e do meio-sangue Moxotó-Pardo Alpina, nas mesmas condições de ambiente e manejo. E, de conformidade com AZEREDO et al. (2001), ao trabalhar com animais da raça Saanen, de porte e idade bastante heterogênea.

A motilidade individual progressiva no sêmen a fresco apresentou valores médios superiores a 60,0%. Valores estes que após o sêmen ser submetido a criopreservação e à descongelação, declinaram a valores médios abaixo de 30,0%. Considerando os padrões de qualidade de sêmen caprino congelado preconizados pelo CBRA (1998) os valores obtidos após a descongelação não são compatíveis para uso em I.A.

Segundo WATSON (2000) e KELLY et al. (1997), a criopreservação pode comprometer a MIP, afetando a habilidade da célula espermática de atingir o local da fecundação. Outra consequência é a diminuição do período de sobrevivência dos espermatozóides no útero, após serem submetidos ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000). A criopreservação dos espermatozóides dos ovinos afeta a mitocôndria além da membrana do acrossoma com a consequente perda do conteúdo do acrossoma, impede a penetração da zona pelúcida (NISHIZONO et al., 2004). Para MARTIN et al. (2004), a criopreservação induz a apoptose em espermatozóides bovinos, abrindo os poros da mitocôndria, dessa forma reduzindo o potencial de proteção da membrana, com perda de fatores que ativados, levam a degradação da célula espermática.

Possivelmente, o processo de criopreservação do sêmen caprino que inclui a remoção do plasma seminal, diminua a proteção aos choques térmicos devido a insuficiente presença de lecitina e de outros fatores importantes no processo da fecundação. A criopreservação e a descongelação, também, podem levar a alterações na membrana plasmática após a lavagem ou a diluição do ejaculado e, até mesmo, a remoção de proteínas, o que implicará em mudança na composição protéica na população de espermatozóides (HAMMERSTEDT et al.

1990; COLLIN & BAILEY, 1999), interferindo, negativamente no mecanismo da fecundação. Portanto, com a remoção de determinadas proteínas pode haver modificações na relação dos lipídios, impedindo os processos de reação acrossômica, de ligação do espermatozóide à zona pelúcida e de fecundação (LESSARD et al., 1999).

O plasma seminal tem como funções, dentre outras, o transporte dos espermatozóides, a garantia da sobrevivência dessas células no sistema genital feminino previne a capacitação espermática prematura (YANAGIMACHI, 1994) e protege as células espermáticas contra danos peroxidativos (SCHÖNECK et al., 1996). E, ainda, neutraliza o pH ácido da vagina, tendo uma ação imunossupressora. O papel do plasma seminal deve-se a sua composição: grande quantidade de proteínas, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, fatores antifertilidade ou imunossupressivos, ligadores de andrógenos, inibina e imunoglobulinas (YANAGIMACHI, 1994).

O plasma seminal também é rico em antioxidantes. Apesar disso, as células espermáticas se tornam sensíveis, principalmente, quando submetidas ao estresse térmico, levando a produção de espécie oxigênio reativo (ROS), aumento de peroxidação lipídica, queda da motilidade e danos no citoesqueleto (WILLIAMS & FORD, 2004).

Em função dos fatores acima mencionados é questionável a criopreservação de sêmen caprino durante a época de transição seca-chuvosa, que compreende os meses de dezembro a janeiro, na grande maioria do semi-árido nordestino. SANTOS et al. (1999) constataram, em caprinos das raças Anglo-nubiana, Pardo Alpina e Saanen, que a produção de doses de sêmen aprovada para uso, nesta época é baixa, e não compatível com o custo do processamento.

Além da MIP à descongelação, também, a morfologia espermática, considerando os defeitos totais, na maioria dos reprodutores, sofreu aumento. No entanto, convém lembrar que, mesmo no sêmen a fresco, a taxa dos defeitos foi alta e em desacordo com os padrões de qualidade para uso na inseminação artificial (SILVA et al., 1993). O fato de que ocorreu aumento no percentual de defeitos à descongelação evidenciou o conhecido efeito negativo da criopreservação (Watson, 2000), com a possibilidade de ter, também, ocorridos danos funcionais às células espermáticas, contribuindo para a reduzida fertilidade ao parto, observada no estudo.

A criopreservação afeta a integridade do acrossoma e pode antecipar a capacitação e queda na capacidade de fecundação *in vitro* (MARTIN et al., 2000; WATSON, 2000). PARKS e GRAHAM (1992) afirmam que, a criopreservação do espermatozóide provoca alterações nas membranas plasmáticas, reduzindo a fertilidade. Essa redução é atribuída às

alterações estruturais e funcionais das membranas durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento e, traz como consequência queda na qualidade da célula espermática. A observação de alterações no número de defeitos morfológicos, na integridade do acrossoma e na MIP deve ser considerada uma vez que existe correlação positiva e elevada entre elas e a capacidade fecundante da célula espermática (BELLACHEY et al., 1988; NAGY et al., 2000).

No entanto, neste trabalho, o controle de qualidade do sêmen, não foi acompanhado de testes funcionais como preconizados por VALCARCEL et al. (1994) e WATSON (1995), principalmente em programas de inseminação artificial. Em vista disso, não foram identificados alguns dos fatores funcionais que poderiam ter influenciado a taxa de fertilidade. Os danos causados às membranas e organelas espermáticas nem sempre são observados pelas avaliações morfológicas de rotina, através da microscopia óptica, resultando numa avaliação incompleta da funcionalidade das células espermáticas (SILVA, 1998).

Um dos fatores funcionais que poderia ser, também, considerado entre os responsáveis pela baixa fertilidade alterada pelo processo de criopreservação é a mudança na composição lipídica, importante fator de integridade estrutural e funcional (PARKS & LYNCH, 1992). Este fator afeta a mitocôndria, diminuindo a produção de energia (NISHIZONO et al., 2004), e altera a permeabilidade da membrana espermática aos íons Ca^{++} , HCO^- e K^+ , antecipando a capacitação e a reação acrossômica (PURDY & GRAHAM, 2004).

No entanto, vale ressaltar que a fertilidade é um atributo que envolve os dois sexos, masculino e feminino. Portanto, a baixa taxa de prenhez obtida após a inseminação artificial, isto é, 15,26%, considerando a média de todos os reprodutores poderia ser oriunda não apenas da baixa eficiência da célula espermática, após descongelamento, mas também associada a possíveis problemas de manejo, particularmente da nutrição e reprodutivos da fêmea. Ressalte-se que as fêmeas poderão ter contribuído para a baixa taxa de prenhez devido as condições de manejo, especificamente nutricional. Já foi descrito que a deficiência da nutrição mesmo de macro e microminerais pode ser causa de falhas na manutenção da prenhez, implicando na reabsorção e em abortos (SILVA & UNANIAN, 1989).

2. Proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides identificada pela eletroforese 2-D

O componente protéico da membrana plasmática do espermatozóide é fundamental como fator de ligação e receptor no mecanismo de fecundação *in vivo* e *in vitro*.

Considerando o conteúdo de proteína total da membrana dos espermatozóides, é interessante observar que houve influência da época de colheita e processamento do ejaculado sobre este parâmetro. A maior concentração de proteína total seminal deu-se na época de transição chuvosa-seca (EIA II) refletindo a influência da qualidade do volumoso, achado este semelhante ao descrito por PINHEIRO et al. (1996) que estudaram os níveis de proteína total do plasma seminal de caprinos ao longo do ano.

Ao pesquisar o componente protéico da membrana plasmática dos espermatozóides, por meio de eletroforese bidimensional, foi enfocada a identificação de peptídeos, isto é proteínas de baixo peso molecular, em função da sua importância e constatada relação, cada vez mais crescente, com a capacidade de fecundar (BELLIN et al., 1998; KILIAN et al., 1999; MARQUES et al., 2001; SILVA et al., 2003).

Embora, o direcionamento do nosso estudo foi à identificação de peptídeos, os demais trabalhos, que utilizaram espermatozóides, constataram que, a maioria das proteínas era de baixo peso molecular, independentemente da condição dos espermatozóides, isto é, frescos ou congelados (REYES-MORENO et al., 2002; LIMA DIAS, 2000). Este fato condiz com a proposta e os resultados do nosso estudo.

Do ponto de vista qualitativo e, principalmente, quantitativo, o único material “rico” em proteínas, em função das secreções das glândulas anexas, é o plasma seminal (SHIVAJI et al., 1990), mas o plasma seminal não fez parte do nosso trabalho. No entanto, ao ser ejaculado grande parte das proteínas do plasma seminal está ligada à membrana do espermatozóide. Assim sendo, é racional admitir que as proteínas encontradas na membrana plasmática, também, estão presentes, em maior ou menor frequência, no plasma seminal (MANJUNATH & SAIRAM, 1987).

Em referência ao material analisado, a membrana plasmática de espermatozóides de caprinos à descongelção, é possível que ocorreram alterações no conteúdo protéico encontrado, uma vez que, o estresse térmico durante o processo de congelação pode levar a diminuição da quantidade de proteínas (OLERO et al., 1997; WATSON, 2000; LIMA DIAS, 2000).

Neste estudo, os pesos moleculares das proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides dos reprodutores caprinos variaram de 5,7 a 65,4 kDa. Considerando a totalidade das proteínas observadas esses pesos são semelhantes aos encontrados, em bovinos por ARORA & JAIN (1994), de 7 a 71 kDa, e por LIMA DIAS (2000), peptídeos de 3,8 a 45 kDa.

A técnica da eletroforese bidimensional permitiu visualizar um grande número de proteínas, com maior frequência daquelas de baixo peso molecular, ou seja, inferiores a 14,5 kDa. Achados semelhantes foram descritos por SOUZA (2004) no plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês em função da idade e do desenvolvimento corporal, além daquelas de peso molecular inferior a 16,6 kDa.

As proteínas identificadas nas membranas dos espermatozóides de caprinos descongelados, respectivamente de 11,8 e 14,1 kDa foram, também, observadas nos espermatozóides pós-descongelção, de bovinos, por LIMA DIAS (2000), utilizando eletroforese unidimensional e SYNTIN et al. (1996), utilizando eletroforese 2-D. O peptídeo de 14,1 kDa é semelhante à proteína descrita por NAZ & AHMED (1994) na membrana do espermatozóide humano a fresco, responsável pelo processo de ligação à zona pelúcia ou associada à uma atividade semelhante aos fatores de crescimento, como sugerido por EINSPANER et al. (1993).

Ainda, os pesos moleculares, 6,9 e 10,3 kDa, observados na membrana espermática de caprinos foram, também, encontrados por ARORA & JAIN (1994), pesquisando componentes protéicos presentes na cabeça de espermatozóides bovinos.

Os peptídeos, 8,4 e 10,3 kDa, identificados nos espermatozóides dos caprinos, no sêmen descongelado, são semelhantes aos descritos por LIMA DIAS (2000), peptídeos de 8,5 e 10,3 kDa, em espermatozóides de bovinos, no sêmen a fresco. Segundo o autor esses peptídeos, estavam correlacionados à motilidade de 70 a 80%. Nos caprinos, a motilidade alta (68 a 86%) no sêmen a fresco diminuiu à descongelção (21 a 28%). Tratando-se de sêmen congelado esses peptídeos, provavelmente, atuam de forma inversa. Este resultado condiz com o relatado por AL-SOMAI et al. (1994), que observaram ser esses peptídeos associados à queda da motilidade na pós-descongelção. No entanto, resultados contrários foram descritos por SOUZA (2003). Este autor observou que a existência de proteínas no plasma seminal de ovinos, pós-púberes, estava associada a melhora na motilidade individual progressiva e concentração espermática.

Em particular, a proteína de 10,3 kDa foi também, descrita como inibidora de $Na^+K^+ATPase$ e em parte responsável pela motilidade (CHAO et al., 1996). Os peptídeos de 10 a 12 kDa, que estavam presentes em todas as amostras e épocas de inseminação artificial foram semelhantes aos relatados por De LAMIRADE et al. (1984) no plasma seminal de bovinos, coelhos e suínos, sendo considerados pelos autores como inibidores de motilidade.

É interessante observar que, em geral, a proteína de 10,3 kDa aparece com maior frequência, não apenas neste estudo como, também, na maioria dos trabalhos de identificação de proteínas do sêmen em outras espécies animais.

Os peptídeos de 5,7 kDa encontrados na membrana plasmática de caprinos foram, também, identificados no plasma seminal de bovinos (UNANIAN et al., 2001) e suínos (STRZEZEK et al., 1992). Nesta última espécie tendo sido associados ao efeito inibidor sobre a motilidade, tanto no sêmen a fresco quanto congelado. Ainda, SHIVAJI (1988) estudando plasma seminal de ratos e humano, observou que as proteínas acima de 5 kDa se assemelham ao *seminiplasmin*, peptídeo relacionado à baixa motilidade e à reação acrossômica.

Os peptídeos de peso molecular de 5,7 e 6,4 kDa foram ambos identificados na membrana espermática somente dos reprodutores 109, 110 e 115, na primeira época de inseminação artificial. Enquanto nos reprodutores 42, 126 e 148 foram identificados, apenas o peptídeo de 6,4 kDa, nesta mesma época. Estes peptídeos também foram observados na membrana plasmática de espermatozóides ejaculados e plasma seminal de roedores (AARONS et al, 1991; IRWIN ET AL., 1983). Nestes animais esses peptídeos foram considerados inibidores de protease, propiciando a indução da reação acrossômica necessária à penetração dos espermatozóides nos ovócitos.

Por outro lado, a abundância de proteínas espermáticas de baixo peso molecular evidenciada neste estudo poderá ser responsável pela baixa fertilidade encontrada após a inseminação artificial. O que está de acordo com os achados de UNANIAN et al. (2001) ao apontarem a presença de proteínas de baixa massa molecular como a causa para a baixa fertilidade, em bovinos da raça Nelore. Neste sentido, os resultados do nosso estudo estão, também de acordo com os de KILLIAN et al. (1993), que descreveram a existência de proteínas de 16 kDa como responsáveis pela baixa fertilidade em touros.

Já, as proteínas de peso molecular 31,3 kDa encontradas se assemelham às glicoproteínas descritas por MILLER & AX (1990) e BELLIN et al (1998), em plasma seminal e espermatozóides de bovinos, e mesmo nos ratos (SHIVAJI et al., 1990). Mais

recentemente foi constatado que essas proteínas fazem parte de um grupo, o *heparin binding protein* (HBP) relacionado à capacitação e reação acrossômica (LENZ et al., 2000).

Ainda, a proteína de 38,3 kDa identificada neste estudo, também, foi descrita por COOPER (1990), como tendo ação agregadora no espermatozoide humano.

Uma outra proteína considerada como glicoproteína, é a de 61,3 kDa, encontrada em nosso trabalho. Esta proteína foi descrita, no plasma seminal de hamsters, por SHIVAGI et al. (1990), além de que foi sugerido ser similar à proteína de 71 kDa registrada em espermatozoides oriundos do epidídimo de ovinos. Ela foi considerada andrógeno-dependente, sendo sintetizada na cabeça do epidídimo. Provavelmente, essa proteína tem influência sobre a maturação espermática e participa da fecundação dos ovócitos. Em caprinos, PELLICER-RUBIO et al. (1997) descreveram uma glicoproteína com 60 kDa e a relacionaram com a capacidade fecundante da célula espermática. Essas duas proteínas por apresentarem pesos moleculares muito próximos, e por serem ambas glicoproteínas, é possível fazerem parte de um mesmo grupo.

A proteína de 65,4 kDa foi também relatada por SHIVAJI et al. (1990), na membrana plasmática de espermatozoides ovinos, sendo originária do epidídimo e envolvida na maturação da célula espermática.

Embora a eletroforese bidimensional, usada neste estudo, identificou proteínas que funcionalmente são ligadas ao processo de fecundação, aparentemente, a presença dessas proteínas não influenciou positivamente a fertilidade. A atuação das proteínas de baixo peso molecular, peptídeos, provavelmente, se sobrepôs as demais encontradas na membrana plasmática dos espermatozoides. Assim, a baixa fertilidade, neste estudo, possivelmente, ocorreu em função da maior presença e atividade das proteínas de baixo peso molecular, condizendo com os achados de UNANIAN et al. (2000). Entretanto, a fertilidade depende de mudanças na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides, isto é adesão e liberação de proteínas, que atuam no processo da fecundação. Porém, o estresse térmico pode provocar fraturas e desligamentos de proteínas (DONAGHUE et al., 1992), que comprometem a ligação do espermatozoide à zona pelúcida, impedindo a fecundação.

CONCLUSÃO

O estudo estabeleceu o protocolo para extração e identificação de proteínas da membrana plasmática de espermatozóides congelados de caprinos, para uso na eletroforese bidimensional (2-D).

O perfil eletroforético revelou a presença de peptídeos de peso molecular 5,7 a 26,8 kDa e proteínas de 31,3 a 65,4 kDa.

Não houve variação, entre reprodutores, quanto à presença da maioria das proteínas identificadas na membrana plasmática de espermatozóides congelados de caprinos.

Os peptídeos de 5,7 a 6,9 kDa não apareceram na membrana plasmática de espermatozóides congelados de caprinos em algumas das épocas de congelação, sugerindo variação do conteúdo protéico em função das épocas.

REFERÊNCIAS*

- AARONS, D., BOETTGER-TONG, H., HOLT, G., POIRIER G.R. Acrossome reaction induced by immunoaggregation of a proteinase inhibitor bound to the murine sperm head. **Molec. Reprod. Dev.**, v. 30, p.258-64, 1991.
- AIRWIN, M., NICHOLSON, N., HAYWOOD, J.T. et al. Immunofluorescent localization of a murine seminal proteinase inhibitor. **Biol. Reprod.**, v.28, p.1201-06, 1983.
- AL SOMAI, N., VISHWANATH, R., MOLAN, P.C. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. **Molec. Reprod. Dev.**, v. 39, p. 1329-33, 1989.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1996. Rio de Janeiro: IBGE, 1996. v.56, p.3-86.
- ARORA, N., JAIN, M.C. Molecular weights of proteins in bovine sperm fractions: a preliminary report. **Indian Vet. J.**, v. 8, p. 781-4, 1994.
- ASHWORTH, P.J.C., HARRISON, R.H.P., MILLER, N.G.A., PLUMMER, J.M., WATSON, P.F. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.6, n.2, p.173-80, 1994.
- AURICH, J.E., KÜHNE, A., HOPPE, H., AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p. 791-7, 1996.
- AUSTIN, C.R. The capacitation of the mammalian sperm. **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. **J. Androl.**, v.12, n.3, p.191-200, 1991.
- AZEREDO, G.A., ESPER, C.R., RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Res.**, v.41, n.3, p. 257-65, 2001.
- BACCETI, B., BURRINI, A.G., MAVER, A., PALLINI, V., RENIERI, T. "9+0" Immotile spermatozoa in an infertile man. **Andrologia**, v.11, n.6, p.437-43, 1979.

*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BALLACHEY, B.E., EVENSON, D.P., SAACKE, R.G. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate test of semen quality and heterospermic performance of bulls. **J. Androl.**, v.9, p.109-15, 1988.
- BELLIN, M.E., OYAORSO, J.N., HAWNKINS, H.E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.2032-9, 1998.
- BELLIN, M.E., HAWKINS, H.E., AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.244-7, 1994.
- BERKELMAN, T., STENSTEDT, T. **2-D electrophoresis**: using immobilized pH gradients, principles & methods. Piscataway: Amersham Pharmacia Biotech, 1998. 50p.
- BAILEY J.L., BUHR, M.M. Cryopreservation alters the Ca flux of bovine spermatozoa. **Can. J. Anim. Sci.**, v.74, p.45-51, 1994.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-9, 1987.
- BOLLAG, D.M., EDELSTEIN, S.J. **Protein methods**. New York: Wiley-Liss, 1991. 230p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-54, 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.863-73, 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.1293-301, 1997.
- CHANG, M.C. A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilization capacity of sperm. **Nature**, v.179, p.258-9, 1957.
- CHANG, M.C. Fertilization capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. **Nature**, v.168, p.697-8, 1951.
- CHAO, C.-FANG, CHIOU, S.-TAI, JENG, H, CHANG, W.C. The porcine sperm motility inhibitor is identical to b microsernoprotein and is a competitive inhibitor of Na, K-ATPase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218, p.623-8, 1996.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

- COLLIN, S., BELEY, J.L. Assessment of intracellular calcium levels in cryopreserved bovine sperm by flow cytometry. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.341, 1999.
- COOPER, T.G. Secretory proteins from the epididymis and their clinical relevance. **Andrology**, v. 22, Supl. 1, p.155-65, 1999.
- CORTEEL, J.M. Production, storage and insemination of goat semen. In: SYMPOSIUM OF MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN SHEEP AND GOATS, 1977, Madison. **Proceedings...** Madison: University of Wisconsin, 1977. p.41-57.
- De LAMIRADE, E., BELLES-ISLES, M., GAGNON, M.C. Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 438, p. 125-31, 1984.
- De LEEUW, F.E., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. In: BOAR SEMEN PRESERVATION, 2., INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 2, 1990, Beltsville, MA, USA. **Proceedings...** Beltsville: [sn], 1990. p.95-104.
- DONAGHUE, A.M., JOHNSON, L.A., SEAL, U.S., ARMSTRONG, D.L., SIMMONS, L.G., GROSS, T., TILSON, R.L., EILDT, D.E. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat egg in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 96, p.555-64, 1992.
- EINSPAINER, R., AMSELGRUBER, W., SINOWATAZ, F., HELEN, T., ROPKE, R., SCHAMS, D. Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos Taurus*). **J. Reprod. Fertil.**, v. 98, n.1, p. 241-4, 1993.
- EVERETT, R.W., BEAN, B. Environmental influences on semen output. **J. Dairy Sci.**, v.65, p.1303-10, 1982.
- FOOD AND AGRICULTURAE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Production yearbook**. Rome: FAO, v.11, n.1/2, p.77-106, 1998.
- FELICIANO SILVA, A.E.D., LIMA DIAS, A., UNANIAN, M.M., FREITAS, A.R., BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de peptídeos e avaliações morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, supl.2, p.1890-900, 2004.
- FERNANDES, C. E., FELICIANO SILVA, A. E. Análise de agrupamento para caracterização protéica do sêmen e correlação com o espermograma em touros submetidos a degeneração testicular. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004. Campo Grande-MS. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, p.1-4 CD-ROM.

- GERENA, R., IRIKURA, D., URADE, Y., EGUCHI, N., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthetase. **Biol. Reprod.**, v.58, n.3, p.826-33, 1998.
- GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v.21, p.1037-53, 2000.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperms: what we ask them to survive. **J. Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.
- IBORRA, A., MORTE, C., FUENTES, P., GARCIA-FRAMIS, V., ANDOZ, P., MARTINEZ, P. Human sperm coating from seminal plasma origen. **American J. Reprod. Immun.**, v.36, n.2, p.118-25, 1996.
- IJAZ, A., HUNTER, A.G. Induction of bovine sperm capacitation by test-yolk semen extender. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2683-90, 1989.
- KARABINUS, D., VOGLES, C.J., SAACKE, R.G., EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in bovine sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **J. Andrology**, v.18, p. 549-55, 1997.
- KASTROP, P.M.M., BEVERS, M.M., DESTRÉE, O.H.J., KRUIP, A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.90, p.305-10, 1990.
- KATZ, D.F., YANAGIMACHI, R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. **Biol. Reprod.**, v.22, p.759-60, 1980.
- KELLY, M.P., CORSON, S.L., GOCIAL, B., BATZER, F.R., GUTMAN, J.N. Discontinuous Percoll gradient preparation for donor insemination determinants for success. **Human Reprod.**, v.12, p. 2682-6, 1997.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v.49, n.6, p.1202-7, 1993.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A., CANCEL, A.M., GERENA, R.L., RODRIGUES, C.M., DAY, J.R. Male factors affecting sperm fertility. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.2, p.83-5, 1999.
- LAEMMLI, I.O.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.
- La FALCI, V.S.N., TORTORELLA, H. RODRIGUEZ, J.L. BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v.57, p.1035-48, 2002.

- LESSARD, C., PARENT, S., LECLERC, P., SULLIVAN, R. The protein p23b: a possible explanation of the lost of fertility of towed bull sperm, **Theriogenology**, v.51, p.347, 1999.
- LIMA DIAS, A. **Estudos morfofisiológicos de componentes protéicos para caracterizar diferenças entre espermatozoides do ejaculado e epidídimo, em bovinos.** 2002. 82p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- MACHADO, R., SIMPLÍCIO, A.A. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semi-árida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v.2, p.433.
- MACHADO, R., SIMPLÍCIO, A.A., SANTOS, D.O. Congelação de sêmen de bode. Seleção de machos doadores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991, v.2, p.431.
- MAHADEVAN, M., TROUSON, A.O., NAYUDA, R.V. Human seminal lectin. I. Demonstration and association with male infertility. **Fertil. Steril.**, v.34, n.5, p.490-5, 1980.
- MANJUNATH, P. Gonadotropin release and stimulatory proteins in bull seminal plasma. In: SAIRAM, M.R., ATKINSON, L.E. (Eds.). **Gonadal Proteins and Peptides and Their Biological Significance.** Singapore: World Scientific Publishing CO. 1984, p.49-61.
- MANJUNATH, P., SAIRAM, M.R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochem. J.**, v.241, p.685-92, 1987.
- 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.541-5, 1990.
- MARQUES, A.L., GOULART, L.R., FELICIANO SILVA, A.E.D. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrosome reaction. **Genetic Mol. Biol.**, v.23, n.4, p.825-9, 2000.
- MARTIN, G., SABIDO, O., DURAND, P., LEVY, R. Cryopreservation induces on apoptosis like mechanism in bull sperm. **Biol. Reprod.**, v.71, p. 28-37, 2004.

- MARTINS, C.F., SILVA, A.E.D.F., MATARAZZO, R., RUMPF, R. Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididymal spermatozoa by analysis of motility, acrosomal status, penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin. **Biol. Reprod.**, v.62, Suppl. 1, p.156, 2000.
- 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.
- MAXWELL, W.M.C. , WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 55-65, 1996.
- McCOULEY, T.O.C., BELLIN, M. E.O., AX, R. L. Localization of a heparin-binding protein to distinct region of bovine sperm. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.429-38, 1997.
- MILLER, D.J., AX, R.L. Carbohydrates and fertilization in animals. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, p.184-98, 1990.
- MORAND-FEHR, P., BRANCA, A., SANTUCCI, P. Methodes d'estimation de l'etate corporel des chéves reproductrices. In: SYMPOSIUM CEE-FAO, 1987, Fonte Boa (Vale Santarém), Portugal. **Recueil des Communications...** EUR Publications: Paris, 1989. p.202-20.
- MORGENTALER, A., SCHOPPERLE, W.M., CROCKER, R.H., WOLF, W.C. Protein differences between normal and oligospermic human sperm demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis. **Fertil. Steril.**, v.54, n.5, p.902-5, 1990.
- NAABY-HANSEN, S., FLICKINGER, C.J., HERR, J.C. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.56, p.771-87, 1997.
- NAGY, S.Z., MERESZ, L., VARZEGI, J., SZATZ, F., IVANCSICS, J., KOVACS, A. Relationship between sperm membranes integrity and motility. **Theriogenology**, v. 53, p.204, 2004.
- NAUC, V., LANE, M.E., MANJUNATH, P. Quantification of BSP-A1/A2 and BSP-30 kDa protein, and their role in sperm capacitation and storage. **Biol. Reprod.**, v.60, Suppl. 1. p.102, 1999.
- NAZ, R.K., AHMED, K. Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida: nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity and involvement of FA-1. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 39, p.397-408,1994.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2002. 912p.

- NISHIZONO, H., SHIODA, M., TKEO, T., IRIE, T., NAKAGATA, N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. **Biol. Reprod.**, v.71, p.973-8, 2004.
- 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, 1989. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989, p.188-91.
- O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.4007-21, 1975.
- O'FLAHERTY, C., BECONI, M., BEORLEQUEI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269-275, 1997.
- PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.1-2, p.209-22, 1992.
- PARKS, J.E., LINCH D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255-66, 1992.
- PELLICER-RUBIO, M.T., MAGALLON, T., COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase. **Biol. Reprod.**, v.57, n.7-8, p.1023-31, 1997.
- PEREIRA FILHO, J.M., ARAÚJO FILHO, J.A., REGO, M.C., CARVALHO, F.C., PONTE, S.C.M. Variações plurianuais da composição florística do estrato herbáceo de uma caatinga raleada, submetida ao pastoreio alternado ovino-caprino. In: EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos - RELATÓRIO TÉCNICO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS, 1987-1995. Sobral, CE, 1996. p.23-8.
- PINHEIRO, R.R, MACHADO, R., PINHEIRO, A.A., SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNA, 33, 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. p.416-18.
- PURDY, P.H., GRAHM, J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes pm sérm capacitation the acrossome reaction and fertility. **Biol. Reprod.**, v. 71, p.522-7, 2004.
- RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS 1982-1986. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1989. 284p.

- RODRIGUES-MARTINEZ, H., LARSON, B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, n.1-3, p.297-308, 1997.
- RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Históricos avanços e aspectos éticos das biotécnicas de reprodução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.24, n.1, p.10-17, 2000.
- RONCOLETA, M., FRANCESCHINI, P.H., LIMA, V.F.M.H., RODRIGUES, L.H., OLIVEIRA, M.A., SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. **ARS Veterinária**, v.13, n.2, p.135-40, 1997.
- RONCOLETA, M. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozóides e plasma seminal relacionadas com a congelabilidade do sêmen de touros**. 1999. 109p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- RUSSEL, L.D., PETERSON, R.N., HUNT, W., STRACK, E. Posttesticular surface modification and contributions of reproduction tract fluids to the surface polypeptide composition of boar spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.30, p.959-78, 1984.
- SAIRAM, M. R., RANGANATHAN, M. R. RAMASHRMA, K., LAMOTHE, P. Isolation and characterization of a bovine seminal plasma protein inhibition pituitary FSH secretion. **Mol. Cell Endoc.**, v.22, n.2, p.231-50, 1981.
- SALAMON. S., MAXWELL, W.M.C. frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 38, p.1036, 1995.
- SANTOS, D.O. **Insulação escrotal em caprinos (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758) adultos e suas conseqüências nas características escroto-testiculares e do sêmen**. 2002. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- SANTOS, D.O., SIMPLÍCIO, A.A., MACHADO, R., MELLO, A.A. Congelação de sêmen caprino de raças exóticas na Embrapa Caprinos em Sobral, Ceará. **Ciênc. Vet. Tróp.** v.2, n.3, p.191-5, 1999.
- SCHONECK, C., BRAUN, J., EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced “in vitro” by the bovine seminal protein aSF: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, v.45, p.633-42, 1996.
- SHIVAJI, S., SCHEIDT, K., BHARGAVA, P.M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990. 526p.

- SHABANOWWITZ, R.B., KILLIAN, G.J. Two dimensional electrophoresis of protein in principal cells, spermatozoa and fluid associated with the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, v.36, p.753-68, 1987.
- SILVA, A.E.D.F. **Reação acrossômica induzida**: método indicador da fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 35).
- SILVA, E.D.F., UNANIAN, M.M. Estudos associando a subnutrição no aborto caprino na região Nordeste do Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.24, p.1221-8, 1989.
- SNEDCOR, G., COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. 7. ed., Ames: Iowa State University Press, 1982, 507p.
- SOUZA, C.E.A. **Avaliação da função reprodutiva de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida: Estudo do desenvolvimento testicular, produção espermática e caracterização das proteínas do plasma seminal**. 2003. 159p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- STRZEZEK, J., KORDAN, W., KOSTYRA, H., ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Anim. Reprod. Sci.**, v.29, p.35-52, 1992.
- THUNDAHIL, J., GILL, J., JANUSKAUSKAS, A., LARSSON, B., SODERQUIST, L., MAPLETOFT, R., RODRIGUES-MARTINEZ, H. Premature capacitation on fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.351, 1999.
- VALCARCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., PEREZ, L. MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and postthaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-9, 1994.
- UNANIAN, M.M., BLOCH JUNIOR, C., SILVA, A.E.D.F. Proteínas de baixa massa molecular do plasma seminal de bovinos (*Bos indicus*) indicadas pelo método MALDI-TOF/MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. CD-ROM.
- VIURELA, M., RAJANIEMI, H. Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Reprod. Fertil.**, v.58, p.483-489, 1980.

- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reprod. Sci.**, v. 60-61, p.481-92, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, n.3-4, p.871-91, 1995.
- WILLIAMS, A.C. & FORD, W.C.L. Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. **Biol. Reprod.**, v. 71, p.1309-16, 2004.
- WILLIAMS, W.L., ABNEY, T.O., CHERKNOFF, W.R., DUKELOW, W.R., PINKSER, M.C. Biochemistry and physiology of decapacitation factor. **J. Reprod. Fertil.**, v.2, p.11-23, 1967, Suppl.
- WOLFE, D.F., BRADLEY, J.T., RIDDELL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v.40, p.1083-91, 1993.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: E. KNOBIL & J.D. NEIL (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed., v.I. Raven Press, New York, p.189-317, 1994.

ANEXOS

Anexo 1

Item 1 - Protocolo de congelação de sêmen caprino - LATSIA, Embrapa Caprinos.

Método e regime de coleta de sêmen: vagina artificial; três vezes por semana.

Avaliação Laboratorial - Valores mínimos aceitáveis: Volume: 0,3 ml;

Concentração: 1×10^9 spz/mm³

Aspecto: leitoso;

MIP e Vigor: 60% e 3,0

Lavagem: Dupla centrifugação a 1.400 G (3.000 rpm), Solução de Krebs-Ringer-fosfato (modificada), na proporção de 1 : 9; duração: 10 minutos, cada.

Diluição*- Fração sem crioprotetor: adicionada à temperatura ambiente

Fração com crioprotetor (5%): à temperatura de 4 °C, e em três etapas, a intervalos de dez minutos entre elas.

*Calculo do volume de diluidor/ejaculado: volume X concentração X MIP ÷ concentração da palheta (0.3) ÷ 2 duas etapas de diluição ÷ 3 diluições com crioprotetor.

Envase: O sêmen é aspirado em palhetas, previamente identificadas e, lacradas com álcool polivinílico ou massa de modelar.

Vaporização: Palhetas sobre a rampa de congelação, em posição horizontal, numa altura de dez centímetros do fundo do tanque e cinco da coluna de nitrogênio líquido e submetidas aos vapores, por oito minutos.

Congelamento: Palhetas mergulhadas em nitrogênio líquido e, transferidas para um botijão criogênico.

Avaliação pós-descongelamento: Aprovadas partidas com valores mínimos aceitáveis para:
MIP e Vigor: 40,0% e 3,0

Item 2 - Diluidor à base de leite de vaca desnatado

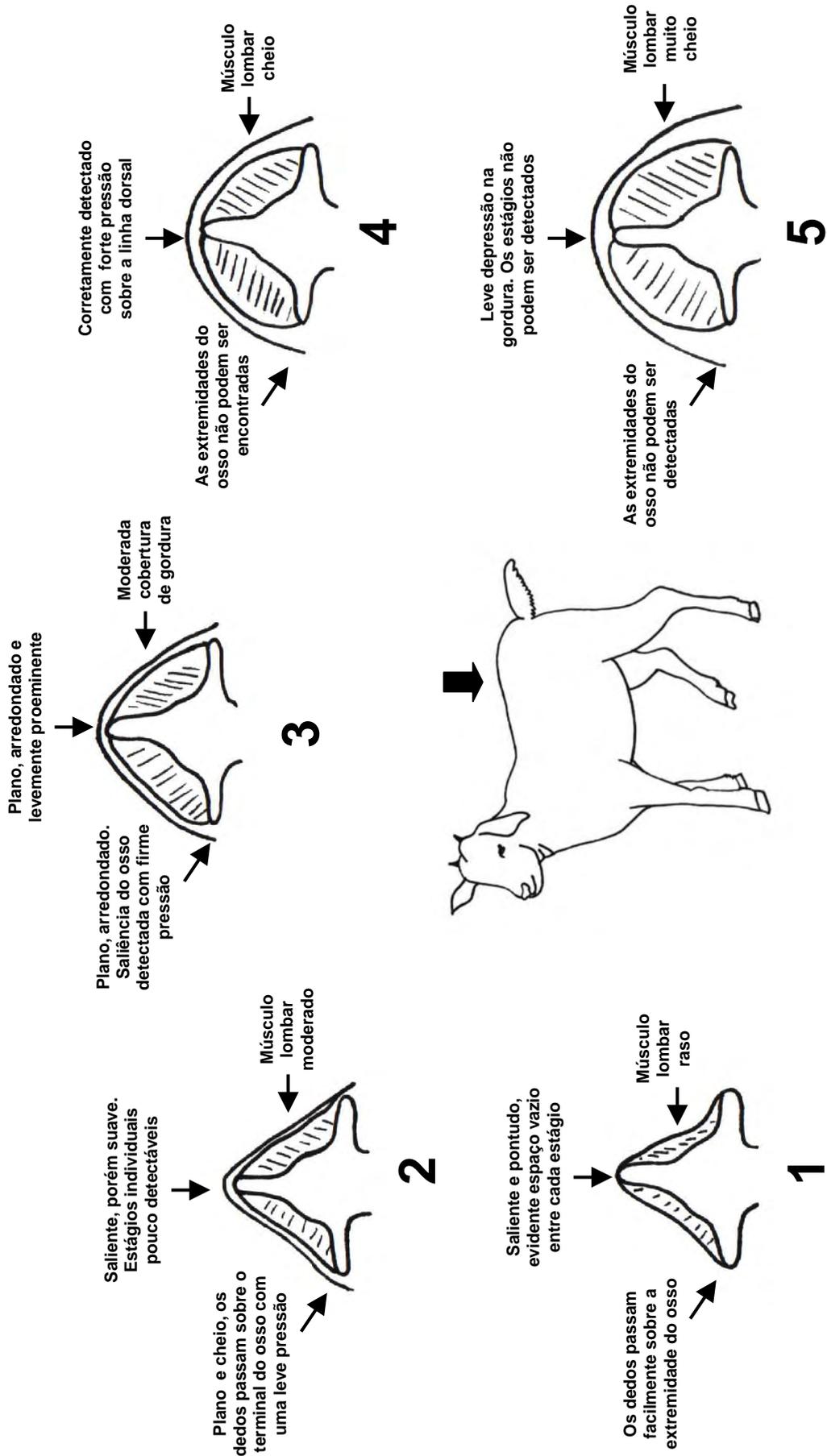
Leite em pó desnatado 10g

Glicose 194mg

Água destilada100ml

Diluir a glicose na água destilada. Em seguida, adicionar o leite em pó e deixar em água fervente, durante 10 minutos. Deixar “esfriar” à temperatura ambiente e adicionar 100 UI de penicilina e 50 mg de estreptomicina por 100 mL de diluidor.

Anexo 2 – Avaliação da condição corporal segundo MORAND-FEHR et al. (1989)



Anexo 3

Item 1 – Protocolo para extração de proteínas totais de membrana de espermatozóides congelados de caprinos, adaptado de BERKELMAN & STENSTED (1998)

- Descongelar o sêmen a 37 °C, durante 30 segundos e adicionar tampão de lavagem: Solução *Tris-Cloreto (TC)*, pH 7,4; (Item 2);
- Centrifugar o conjunto à 4 °C a 300 G, durante 10 minutos por 4 vezes, para lavar os espermatozóides e remover o diluidor;
- Adicionar o tampão de extração protéica, composto da Solução TC + *Triton X 100*, a 0,2%); agitar por cinco minutos e centrifugar a 9.300 G durante 15 minutos;
- Recolher o sobrenadante e precipitar com 10% de Ácido tricloroacético (TCA);
- Agitar em vortex e centrifugar a 9.300 G, durante 15 minutos;
- Lavar em acetona gelada e centrifugar por quatro vezes a 9.300 G durante cinco minutos.
- Secar o extrato protéico obtido, a temperatura ambiente até a dosagem.

Item 2 - Solução *Tris-Cloride*, pH 7.4 (Tampão TC)

<i>Tris</i> - 4 mM	48 mg
CaCl ₂ - 2 mM	22 mg
Água bidestilada (q.s.p)	100 mL

Item 3 - Tampão de extração de proteína de membrana de espermatozóide

Tampão TC	20 mL
<i>Triton x 100</i> a 0,2%	40 µl

Item 4 - Solução de Reidratação (SR)

Uréia - 7 M	2,10 g
Tiouréia - 2 M	0,75 g
Q.S.P.....	5 mL*

* Preparar 5 mL de Uréia/Thiouréia 9 M - incubar com 1% de *Amberlyte*, filtro em pó. Agitar a frio (em geladeira) por 1 hora. Filtrar em millipore, 0,22 µm. Armazenar em alíquotas de 1 mL, em freezer. No momento da reidratação, acrescentar por alíquota:

- <i>Ditiotreitol (DTT)</i> - 65 mM	10 mg
- <i>Pharmalyte 3-10</i> ; 0,5%	5 µl
- <i>Triton X 100</i> - 0,5%	10 µl
- Azul de <i>Bromophenol</i>	traços

Item 5 - Solução de equilíbrio

Tris-HCl - 1,5 M; pH 8,8	1,65 mL
Urea - 6M	15,0 mL
Glicerol - 30%	18,02 g
SDS - 2%	1,0 g
Bromofenol	Traços
Água bidestilada q.s p.	50,0 mL

Item 6 - Solução Corante *PhastGel Blue R-350***Corante estoque**

Dissolver 1 tablete em 80mL de água bidestilada sob agitação, durante 10 minutos.

Adicionar 120mL de metanol e agitar até completa dissolução. Filtrar Corante

Preparar 1.000 mL para uso:

Corante estoque	100mL
Metanol	900mL