

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 88

On line

Marcadores Moleculares no Plasma Seminal de Caprinos

***Angela Maria Xavier Eloy
João Ricardo Furtado
Nadiana Maria Mendes Silva***

Embrapa Caprinos e Ovinos
Sobral, CE
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145

CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400 - Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: www.cnpcc.embrapa.br

SAC: <http://www.cnpcc.embrapa.br/sac.htm>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Lúcia Helena Sider

Secretário-Executivo: Diônes Oliveira Santos

Membros: Alexandre César Silva Marinho, Carlos José Mendes

Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Verônica Maria

Vasconcelos Freire, Fernando Henrique M. A. R. Albuquerque,

Jorge Luís de Sales Farias, Mônica Matoso Campanha e Leandro

Silva Oliveira.

Supervisor editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisor de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Cópias & Cores

1ª edição on line (2009)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Caprinos e Ovinos

Eloy, Angela Maria Xavier.

Marcadores moleculares do plasma seminal de caprinos / por Angela Maria Xavier Eloy, João Ricardo Furtado e Nadiana Maria Mendes Silva. – Sobral : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009.

33 p : il. – (Documentos / Embrapa Caprinos e Ovinos , ISSN 1676-7659 ; 88).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpcc.embrapa.br>> .

1. Reprodução. 2. Caprino. 3. Marcador Genético. I. Furtado, João Ricardo. II. Silva, Nadiana Maria Mendes. III. Embrapa Caprinos e Ovinos. IV. Título. V. Série.

CDD 636.09

Autores

Angela Maria Xavier Eloy

Médica Veterinária, Ph.D

Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos

Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal

145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE

E-mail: angela@cnpic.embrapa.br

João Ricardo Furtado

Físico, B. Sc.

Assistente de Pesquisa da Embrapa Caprinos e

Ovinos

E-mail: ricardo@cnpic.embrapa.br

Nadiana Maria Mendes Silva

Zootecnista, Mestranda

Bolsista da Capes

Apresentação

Sumário

Introdução	9
O que é proteômica?	10
O que são marcadores moleculares?	15
Plasma seminal: composição e função	16
Marcadores moleculares na reprodução animal	19
Descobertas recentes das proteínas no avanço do conhecimento no mundo	24
Considerações gerais	25
Referência bibliográfica	26

Marcadores Moleculares no Plasma Seminal de Caprinos

Angela Maria Xavier Eloy

João Ricardo Furtado

Nadiana Maria Mendes Silva

Introdução

O aumento da produção pecuária no Brasil constitui um impulso importante para que a indústria animal se torne mais competitiva. Este aumento, em decorrência da melhoria da qualidade de vida da sociedade no cenário atual, está demandando produtos de melhor qualidade e abrindo portas de mercados antes inexistentes. No entanto, o nível de aplicação tecnológica disponível nas explorações caprinas no país, de uma maneira geral, ainda é muito baixo, quando comparado com outras espécies, tais como frangos de corte, suínos e bovinos.

O melhoramento científico-tecnológico vem substituindo gradativamente a forma empírica de seleção utilizada anos atrás. Isto tem ocorrido em função de uma série de razões, entre as quais o avanço da ciência nas áreas de bioquímica, proteômica, biologia molecular e bioinformática; a difusão do conhecimento científico nas áreas de reprodução, nutrição e melhoramento genético; o aumento do número de pesquisadores com especialização em áreas avançadas; a maior disponibilidade e acessibilidade a computadores com maior capacidade de armazenagem e processamento de informações e de baixo custo, e a disponibilização de aplicativos voltados para análises de parâmetros genéticos; a globalização e democratização dos conhecimentos.

Portanto, através de ferramentas da biotecnologia, como a utilização da eletroforese, cromatografia líquida e espectrofotometria de massa é possível a determinação de marcadores moleculares que demonstrem o potencial genético de um animal em líquidos orgânicos, contribuindo para a seleção de genótipos superiores para determinadas características produtivas e reprodutivas.

Apesar da relevância do plasma seminal no processo de fertilização, estudos detalhados focados no papel dos seus componentes em caprinos ainda são escassos, e pouca informação é disponibilizada do ponto de vista científico e técnico visando sua aplicação na produção animal. O objetivo deste documento é fazer uma breve revisão sobre a função do plasma seminal e sua aplicabilidade do ponto de vista proteômico, como marcadores de características ligadas à produção e reprodução em caprinos.

O que é proteômica?

Todos os sistemas biológicos de um microrganismo ou de um animal requerem certas substâncias e reações químicas para se manterem vivos, crescerem e reproduzirem-se. A unidade fundamental desse sistema é a célula, capaz de incorporar nutrientes do fluido circundante. Com o avanço da ciência, descobriu-se que certos grupos de macromoléculas são de extraordinária importância para o organismo, grupos esses conhecidos como o das proteínas e dos ácidos nucleicos.

As proteínas são substâncias complexas, de elevado valor biológico, que contêm nitrogênio, carbono, hidrogênio e oxigênio. Quando são degradadas, resultam em uma mistura de moléculas orgânicas simples contendo nitrogênio chamadas aminoácidos (Fig. 1 e 2). As proteínas são formadas por, no mínimo, três aminoácidos (Fig. 3).

Aminoácidos são ácidos orgânicos que contêm em sua molécula um ou mais grupamentos Amina. Existem vários tipos de aminoácidos, sendo os mais importantes os alfa-aminoácidos. Em 1906 já haviam sido identificados 15 tipos de aminoácidos liberados pela degradação de proteínas; em 1935 esse número subiu para 18 e, em 1940, chegou a 20, completando a lista dos aminoácidos que ocorrem naturalmente nas proteínas dos seres vivos.

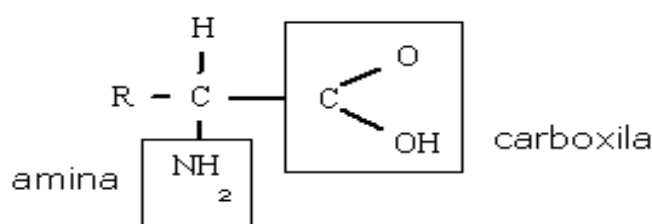


Fig. 1. Fórmula geral de um alfa-aminoácido



Fig. 2. Estrutura molecular dos Aminoácidos

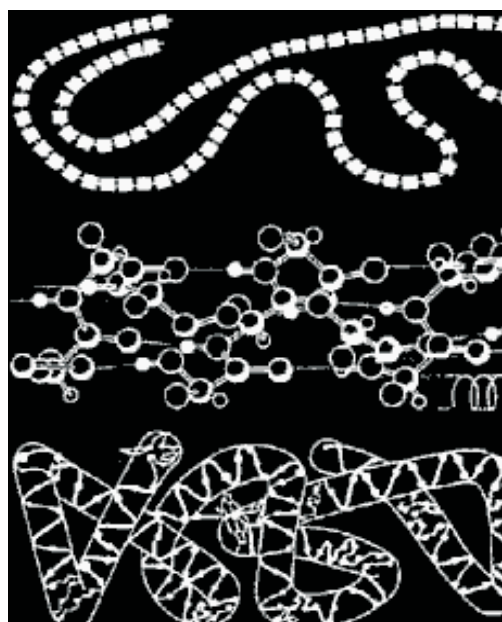


Fig. 3. Estrutura molecular das Proteínas

Fonte: <http://www.universitario.com.br/celo/topicos/subtopicos/citologia/bioquimica/proteinas.html>

As proteínas podem ser classificadas em três grupos:

1. Proteínas Simples

Também denominadas de homoproteínas, são constituídas exclusivamente por aminoácidos. Em outras palavras, fornecem exclusivamente uma mistura de aminoácidos por hidrólise. Como exemplo, temos as albuminas, as globulinas e as escleroproteínas.

2. Proteínas Conjugadas

São também denominadas heteroproteínas, sendo constituídas por aminoácidos e por mais outro componente não-protéico chamado grupo prostético. Dependendo do grupo prostético, têm-se as Cromoproteínas (pigmento hemoglobina, hemocianina e citocromos); as Fosfoproteínas (caseína do leite); Glicoproteínas (mucina); as Lipoproteínas encontradas na membrana celular e no vitelo dos ovos e as Nucleoproteínas (ribonucleoproteínas e desoxiribonucleoproteínas).

3. Proteínas Derivadas

As proteínas derivadas formam-se a partir de outras por desnaturação ou hidrólise. Como exemplos, temos as proteoses e as peptonas, formadas durante a digestão.

As propriedades e funções das proteínas são determinadas pelo número e tipo de aminoácidos e pela sua estrutura tridimensional. De uma maneira geral, as proteínas desempenham nos seres vivos as seguintes funções: estrutural, enzimática, hormonal, de defesa, nutritivo, de coagulação sanguínea e de transporte.

O termo proteoma foi inicialmente proposto em 1995 e definido como a caracterização em larga escala do conteúdo de proteínas que são expressas em um organismo, tecido ou tipo celular (HAYNES e YATES, 2000).

O estudo do proteoma permite obter informação sobre os perfis de expressão das proteínas referentes à sua abundância e localização e, ainda, às modificações químicas ou interações.

A eletroforese é o método de separação de moléculas que consiste na migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando são dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente é aplicada. Esta técnica de separação foi desenvolvida pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas em soro, tendo recebido por este trabalho o prêmio Nobel em 1948. A tecnologia predominante para separação e isolamento das proteínas consiste na eletroforese unidimensional (1D) (Fig. 4) e bidimensional (2D) (Fig. 5). A eletroforese 1D é uma ferramenta usada na separação das proteínas de acordo com a massa molecular em presença de sulfato de duodecil de sódio – SDS, sendo de simples execução e usada para separar proteínas com massa molecular entre 1 e 300 kDa. A separação das proteínas por eletroforese 2D foi inicialmente realizada em 1975 pelos pesquisadores O'Farrel, Klose e Scheele, a qual consiste na separação das proteínas pelo ponto isoelétrico (pI) através da focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão e, de acordo com sua massa molecular, através da eletroforese em gel de polia-crilamida na presença de SDS na segunda dimensão (O'FARREL, 1975).

Atualmente, as técnicas mais comumente utilizadas para estudo das proteínas são as que usam a eletroforese bidimensional associada à métodos de espectrometria de massa para sua identificação.

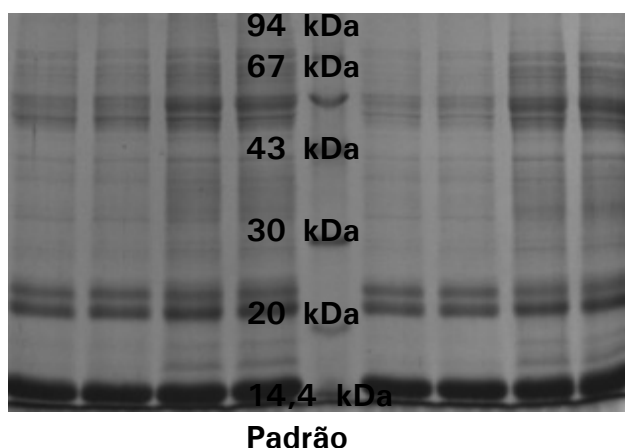


Fig 4. Exemplo de eletroforese unidimensional SDS-PAGE a 12 % do plasma seminal de caprinos. Fonte: Teixeira et al. (2008)

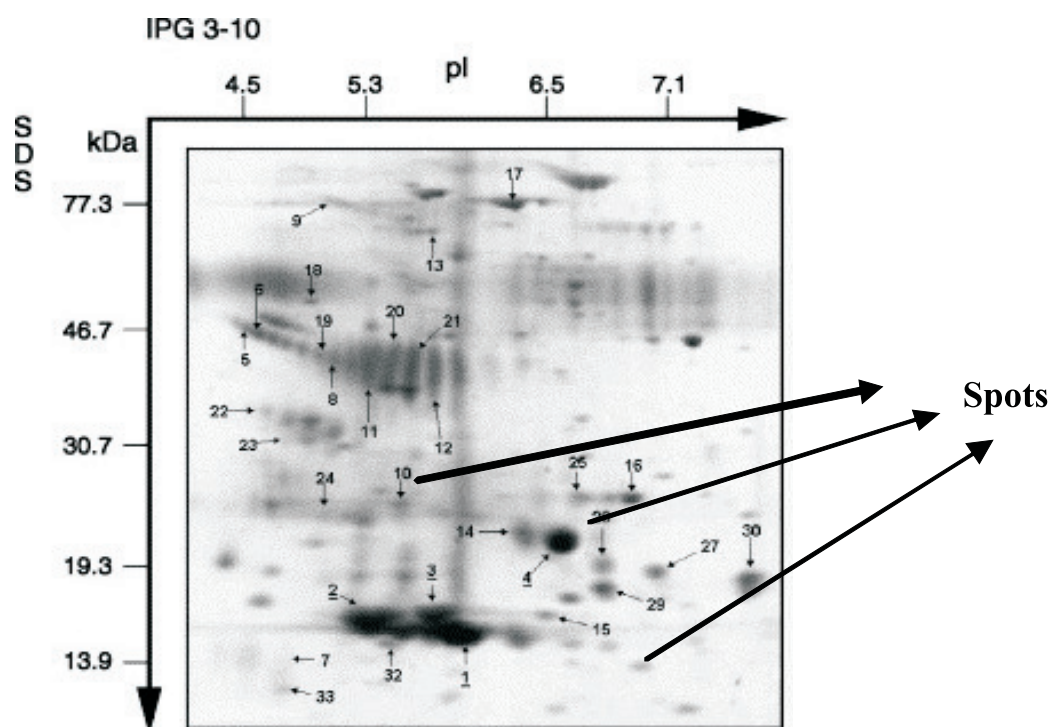


Fig. 5. Exemplo de eletroforese bidimensional (2D) SDS-PAGE do plasma seminal de carneiro. Fonte: Cardozo et al. (2006).

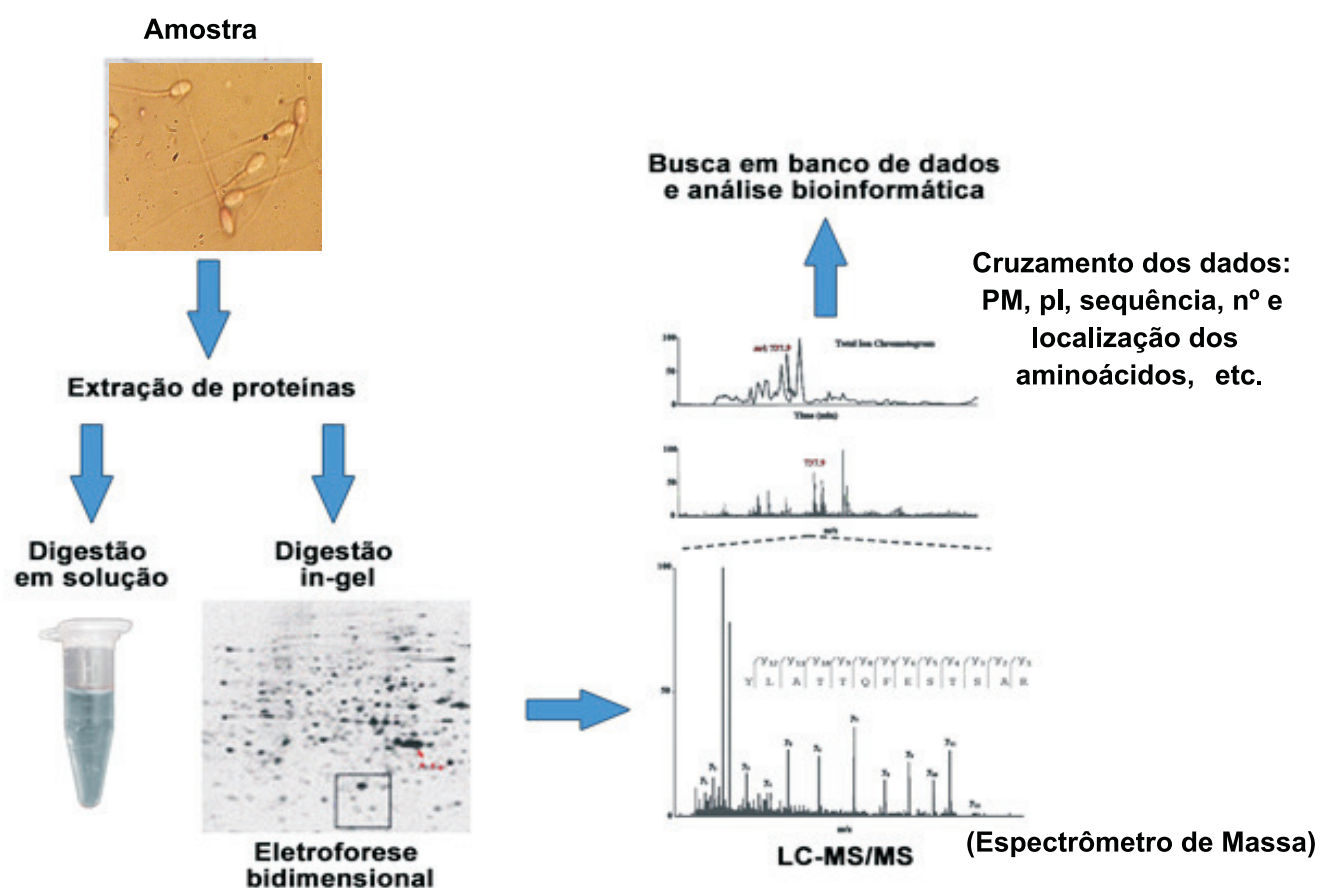


Fig. 6. Exemplo esquemático de estratégia utilizada para o estudo do proteoma. Fonte: Adaptado de Kalume *et al.* 2005.

O que são marcadores moleculares?

Os marcadores moleculares podem ser divididos em dois grupos: os protéicos e os genômicos. Os mais representativos entre os protéicos são os grupos sanguíneos e as isoenzimas. As proteínas podem apresentar variações alélicas em populações. Um caso clássico de um polimorfismo protéico é aquele apresentado pelas hemoglobinas na espécie humana. Existe a hemoglobina A, também chamada de hemoglobina normal e a hemoglobina S, que em indivíduos homozigotos para essa forma apresentam a anemia falsiforme. A eletroforese permite distinguir as duas formas e a identificação é imediata, pois a hemoglobina é muito abundante no sangue e tem coloração avermelhada. As duas formas diferem em um aminoácido que apresenta carga elétrica diferente, o que resulta em taxas de migração diferentes sob um campo elétrico.

Os marcadores genômicos, ao contrário dos protéicos, revelam a variação existente no genótipo, não sendo necessário, para isso, fazer-se inferência a partir do fenótipo protéico e são divididos em marcadores gerados por DNA e por RNA.

Na espécie humana, estudos da proteômica têm sido realizados para diagnosticar pacientes com problemas ligados à fertilidade, pacientes vasectomizados, etc. (STARITA-GERIBALDI et al., 2001), como também marcadores de azoospermia (YAMAKAWA et al., 2007) (Fig. 6). Os níveis de PSA, uma glicoproteína de cadeia simples e peso molecular de 33 a 34 kDa, aumentam no soro de indivíduos com patologia prostática e têm sido utilizados na detecção precoce de progressão ou recorrência de neoplasia da próstata e também no acompanhamento de pacientes após terapia sistêmica, cirúrgica ou radioterápica (SAWAYA; ROLIM, 2003; SHARIAT et al., 2004; THOMPSON et al., 2007).

Na produção animal já se pode observar um interesse crescente na utilização da proteômica. A aplicabilidade da proteoma está relacionada ao estudo do sistema imunitário de espécies aviárias Burgess (2004); à parasitologia (DE VENEVELLES et al., 2004), à reprodução (STRZEZEK et al., 2005) e à nutrição (FUCHS et al., 2005).

A identificação dos vários grupos protéicos no sêmen das espécies pode dar suporte a linhas de pesquisas voltadas para a criopreservação de gametas, determinando marcadores de congelabilidade; para o melhoramento de técnicas de fertilização artificial, caracterizando proteínas exclusivas de cada espécie envolvidas na atividade espermática, potencializando técnicas de geração de animais transgênicos em massa, como SMGT (Sperm-Mediated Gene Transfer).

Plasma seminal: composição e função

O plasma seminal contém secreções de origem testicular, epididimária e das glândulas sexuais acessórias (EVANS e MAXWELL, 1987) (Fig. 7), contendo grande variedade de moléculas, principalmente produzidas por estas últimas. Nesse fluido, os espermatozóides adquirem inúmeras proteínas durante o trânsito epididimário e na ejaculação que podem influenciar sua capacidade fecundante (MILLER et al., 1990; YANAGIMACHI, 1994; MAXWELL et al., 1999).

A anatomia das glândulas acessórias como também sua composição química e funções variam de acordo com a espécie (MANN e LUTWAK-MANN, 1981) e representam um papel importante na capacidade de fertilização do espermatozóide.

Proteínas do fluido seminal têm sido implicadas na regulação da reação do acrossoma (FLORMAN e FIRST, 1988), na regulação dos íons de cálcio pelo espermatozóide (KILIC et al., 1996; MARQUES et al., 2000), na modulação

da capacidade espermática (DESNOYERS e MANJUNATH, 1992; MILLER et al., 1990) e também como marcador de câncer de próstata em humanos (OESTERLING, 1991).

Os espermatozóides dos mamíferos quando coletados diretamente dos testículos são imóveis e incapazes de se ligar e de fertilizar o oócito. Estas propriedades são adquiridas gradualmente, enquanto eles transitam através do epidídimo, ocasião na qual perdem fragmentos de citoplasma e sua membrana passa por uma profunda mudança, incluindo adição, remoção ou transformação de proteínas e lipídios (COOPER, 1998; KIRCHHOFF, 1998; JONES, 1998). Por ocasião da ejaculação, fatores responsáveis pela decapitação dos espermatozóides originados das vesículas seminais, cuja maioria das proteínas isoladas e caracterizadas nos carneiros pertencem ao grupo das espermadesinas, ligam-se à superfície dos espermatozóides (MAXWELL et al., 2007). Portanto, o processo de tratamento imposto ao sêmen por ocasião da congelação, pode desestabilizar as membranas, ocasionando a pré - capacitação do espermatozóide, o que poderá vir a encurtar sua vida fértil. Nesta linha de raciocínio, estes pesquisadores aventam a possibilidade de melhorar os índices de fertilidade com sêmen congelado de carneiros pela adição de proteínas plasmáticas individualmente ou em combinação aos espermatozóides nos diferentes estágios de conservação.

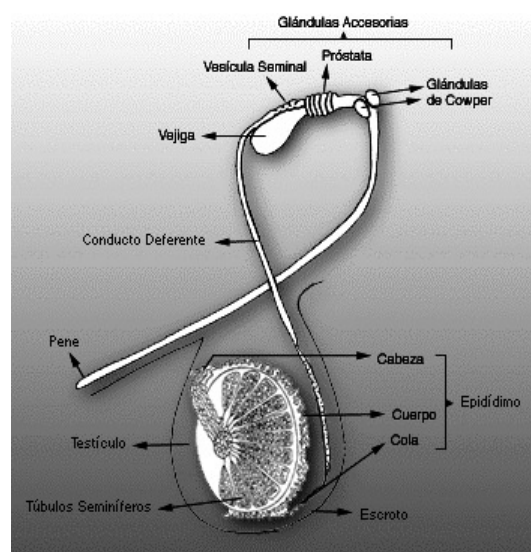


Fig. 7. Sistema genital masculino em geral.

Retirado de http://www.puc.cl/sw_educ/prodanim/caracter/fi.htm

Autiero et al. (1991), Baccetti et al. (1979) e Marchini et al. (1990) observaram que o conteúdo do plasma seminal poderá influir na fertilidade do macho com base na composição do plasma de animais e/ou homens férteis e inférteis.

De acordo com Poiani (2006) o fluido do plasma seminal exerce três grandes papéis na reprodução dos machos, a saber: contribuem para o processo de capacitação do espermatozóide; exercem influência sobre a competição espermática através da produção de dispositivos que transportam ferormônios, os quais agem nas fêmeas com propriedades espermicida, modificando a velocidade do espermatozóide e reduzindo a receptividade sexual da fêmea. Finalmente, contribui para o processo de fertilização, facilitando o movimento e alimentando os espermatozóides, controlando o pH, participando da reação do acrossoma, na estocagem dos espermatozóides e na defesa dos mesmos contra o ataque do sistema imunológico no sistema reprodutor da fêmea e desenvolvimento de tecido ovariano (Fig. 8).

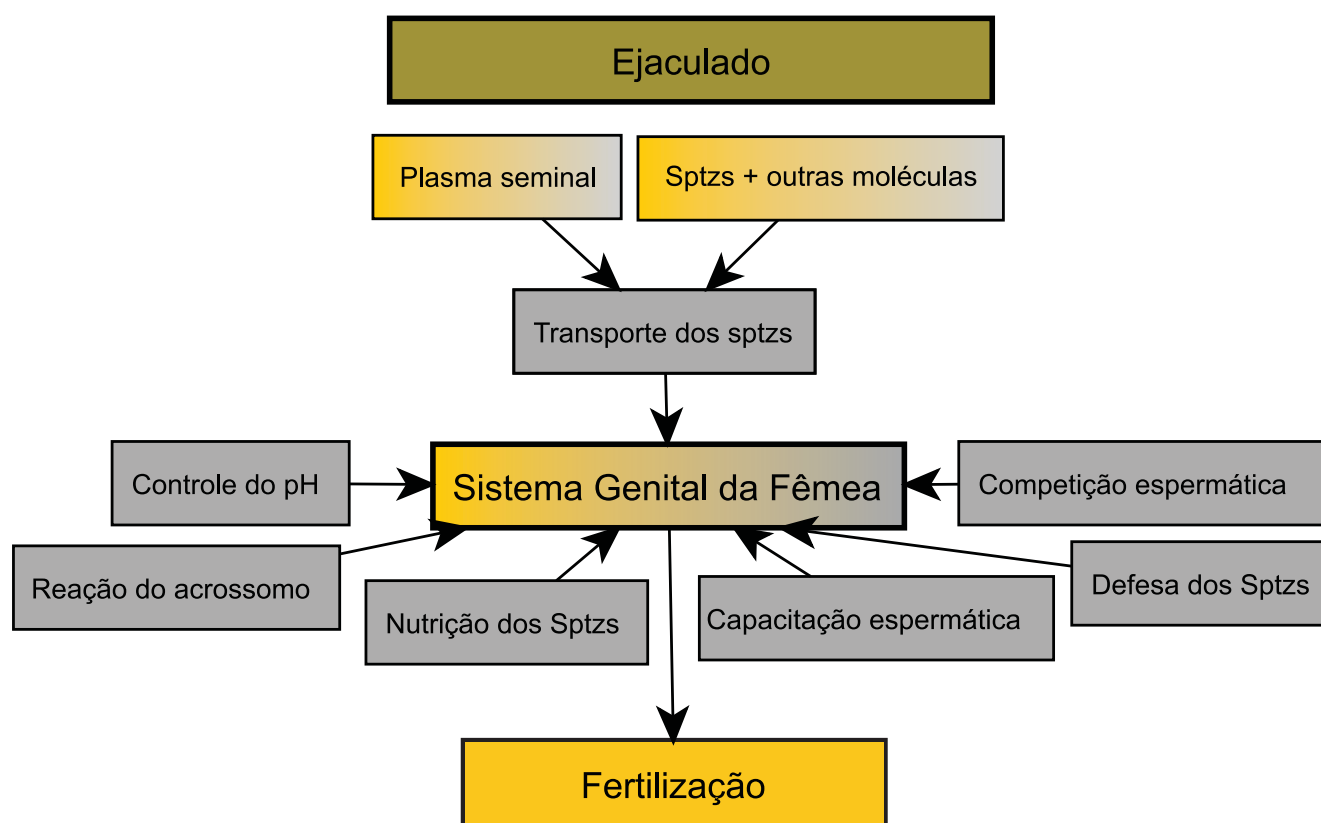


Fig. 8. Funções do plasma seminal em vertebrados.

Os perfis eletroforéticos das proteínas do plasma seminal têm sido atualmente utilizados como marcadores no auxílio da avaliação clínica em casos de infertilidade; em casos de esterilidade oriunda de defeito de peça intermediária dos espermatozóides; nas diferenças entre os polipeptídeos no plasma seminal e espermatozóides de animais sadios e animais que sofreram degeneração testicular induzida pelo calor, etc.

A determinação do perfil protéico do plasma seminal é fundamental para identificar as funções e propriedades destes polipeptídeos no mecanismo de regulação molecular dos parâmetros fisiológicos reprodutivos, uma vez que o fluido seminal é constituído por uma mistura de proteínas. De acordo com Strzezek et al (2005) a proteômica é uma das principais alternativas para compreender as interações do plasma seminal com os espermatozóides, podendo vir a ser um modelo para o estudo da interação entre o sêmen e a superfície do espermatozóide.

Marcadores moleculares na reprodução animal

Estudos em bovinos e ovinos

Tem-se observado na década de 90 que técnicas sofisticadas, como a análise computadorizada da motilidade e o teste de integridade acrossômica, embora auxiliem na avaliação do sêmen, não apresentam alta correlação com os índices de fertilidade (JANUSKAUSKAS et al., 2000; KJAESTADD et al., 1993). Respalando esta afirmação, Larson e Miller, (2000) observaram em reprodutores bovinos que apresentavam características seminais semelhantes, diferenças de 20 a 25% nos índices de fertilidade.

Muitos são os trabalhos com eletroforese para isolar e identificar as proteínas do sêmen de bovinos, tanto do espermatozóide como do plasma seminal. Rattan (1972), comparando diferenças climáticas e de manejo entre animais, encontrou perfis protéicos característicos em cada estação e verificou também algumas alterações semelhantes nos perfis protéicos individuais, ou até mesmo grupais.

Já foi constatado que o conteúdo do plasma seminal pode influenciar na fertilidade dos machos (KILLIAN et al., 1993). Esses autores associaram touros férteis de uma determinada população com duas proteínas do plasma seminal, caracterizadas por apresentarem peso molecular (PM) de 26kDa e pl 6,2 e PM de 55kDa pl 4,5 como predominantes em touros com alta fertilidade e duas proteínas de PM 16kDa pl 4,1 e PM 16KDa pl 6,7 como predominantes em animais de baixa fertilidade.

Jobim et al. (2003) encontraram 12 bandas protéicas, das quais quatro apresentaram-se quantitativamente superiores ($P < 0,05$) nas amostras dos reprodutores bovinos pertencentes ao grupo de maior congelabilidade, bandas 3 (15-16kDa; pl 4,7-5,2), 7 (11-12kDa; pl 4,1-4,8), 11 (13-14kDa; pl 6,90-6,50) e 23 (18-20kDa; pl 4,8-5,2), enquanto que a banda protéica de 25-26kDa; pl 6,0-6,5, mostrou-se significativamente superior ($P < 0,05$) nos reprodutores de menor congelabilidade do sêmen. Portanto, as evidências mostram que existem diferenças no perfil protéico dos reprodutores com maior e menor congelabilidade do sêmen, sugerindo as proteínas 3, 7, 11, 23 como possíveis marcadores da congelabilidade do sêmen, e a proteína 25 como indicativo da menor congelabilidade do sêmen.

Roncoletta et al. (1999) verificaram em bovinos da raça Gir no Sul do Brasil a existência de uma banda no grupo de alta congelabilidade, cujo fragmento polipeptídico desta proteína tem mobilidade relativa (M_r) 20,3 e PM aproximado de 61.800 Da.

A maior proteína ácida encontrada no plasma seminal de bovinos representa a família das chamadas BSP (Bovina Seminal Plasma) (MANJUNATH e SAIRAM, 1987). Seu papel na fertilização, em especial na capacitação espermática, deve-se à sua ligação ao grupo colina dos fosfolipídios presentes na membrana do espermatozóide, às lipoproteínas de alta densidade (HDL) e às glycosaminoglycans-heparina presentes nos fluidos folicular e do oviduto (THERIEN et al., 1995; THERIEN et al., 1997; THERIEN et al., 2001).

Peréz-Pé et al. (2001) verificaram, através da eletroforese 2D, variação nas proteínas do plasma seminal de carneiros entre as estações do ano. Barrios et al. (2005) investigando a variação mensal das proteínas do

plasma seminal de carneiros através de eletroforese bidimensional, observaram que 12 spots apresentaram significativa variação quantitativa ao longo do ano, enquanto que outros 17 spots, que mostraram correlação com alguns parâmetros de qualidade do sêmen, não variaram quantitativamente entre os meses do ano. Marco-Jimenez et al. (2008) observaram que aproximadamente 80% do total relativo das proteínas do plasma seminal de carneiros são representados por quatro frações de proteínas de peso molecular em torno de 15, 21, 24 e 50 kDa. Também observaram que dois spots (15 kDa ; 5,5 e 22kDa; 5,2 para peso molecular e ponto isoelétrico, respectivamente) aumentaram significativamente quando o sêmen foi coletado através de eletroejaculador, enquanto que um spot de aproximadamente 25 kDa e ponto isoelétrico de 5,2 somente foi encontrado no plasma seminal de ejaculado obtido através da vagina artificial.

Estudos em caprinos

Os estudos da proteômica seminal na espécie caprina, em geral, ainda são incipientes, estando em estágio de conhecimento do perfil eletroforético das bandas em diferentes situações e sua relação com os parâmetros seminais.

Villemure et al. (2003) através de análise de frações de proteínas de plasma seminal de caprinos, observaram, através da eletroforese SDS-PAGE, a presença de quatro bandas protéicas que foram chamadas de GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa and GSP-22 kDa (GSP, Goat Seminal Plasma Proteins). A análise da sequência de aminoácidos destas proteínas indicaram que as GSP são homólogas às BSP (Bovine Seminal Plasma Proteins), sugerindo que a família das BSP seja onipresente no plasma seminal de mamíferos e que existam em diversas formas em cada espécie e, possivelmente, desempenhem atividade biológica comum.

Ahmad e Noakes (1996) estudando os parâmetros espermáticos em caprinos na Inglaterra observaram que o efeito dos meses e das estações do ano foram significativos para todos os parâmetros de qualidade do sêmen. Teixeira et al. (2008) observaram que os parâmetros seminais

volume, aspecto e concentração apresentaram diferença significativa entre as épocas seca e chuvosa no semi-árido do Nordeste brasileiro. Também Martinez e Eloy (2005) observaram em caprinos, através de levantamento realizado em Central de Inseminação localizada no Nordeste do Brasil, maior número de doses aprovadas pós-congelação no período seco do que no período chuvoso.

La Falci et al. (2002) investigando o efeito das estações do ano sobre as proteínas seminais de caprinos no Sul do Brasil, observaram importante diferença no modelo das proteínas que têm afinidade pela heparina (HAPs), tais como as bandas de 178 kDa somente presentes na época natural de cobertura; uma diminuição nas bandas de 119 kDa e um aumento nas proteínas de 73 a 104 kDa, indicando que as proteínas do plasma seminal estão sob o controle da estação e associadas com a função espermática durante as épocas de reprodução em climas temperados.

Teixeira et al. (2008) trabalhando com eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal de caprinos Anglo-nubiano no Nordeste do Brasil, observaram diferença nos perfis eletroforéticos entre as épocas seca e chuvosa na região, identificando presença de duas bandas de 79 kDa e 91 kDa em maio (período chuvoso), as quais não foram encontradas em novembro (período seco). Por outro lado, o mês de novembro apresentou três bandas de 28 kDa, 72 kDa e 133 kDa que não estavam presentes em maio. Portanto, a distribuição das bandas ao longo do ano nas regiões tropicais sofre influência das estações e, tendo em vista que as proteínas exercem uma importante função na fertilização, sugere-se a interferência do ambiente sobre a qualidade do sêmen de caprinos nestas regiões.

Eloy (2008) investigando o perfil eletroforético (SDS-PAGE) do plasma seminal de animais da raça Anglo-Nubiano de acordo com a capacidade de congelamento do sêmen, observaram bandas de 112 kDa e de 55 kDa em animais que apresentaram congelabilidade e não congelabilidade do sêmen, respectivamente (Fig. 9). Possivelmente, a banda de 112 kDa possa vir a ser considerada como um marcador de congelabilidade em caprinos. A literatura relata a presença da banda de 55 kDa em búfalo, sendo esta relacionada com a viabilidade do sêmen fresco (ASADPOUR et al., 2007).

Azerêdo (2003) investigando os perfis protéicos de caprinos na região do Rio Preto, estado de São Paulo, através de eletroforese 2D, observou que os géis dos animais de alta congelabilidade apresentaram um número maior

de proteínas (55,3% do total) do que os géis dos animais de baixa congelabilidade. Também verificou que o número médio de proteínas observado em cada gel foi de 32,5, com as amostras da estação seca, apresentando mais proteínas do que a estação chuvosa, mesmo sem haver diferença estatística entre as mesmas. Teixeira et al., (2002) mostraram o isolamento, purificação, N-terminal e massa molecular de uma proteína estruturalmente caracterizada como a primeira espermedesina de bodes (BSFP). As espermedesinas são uma família de proteínas presentes no plasma seminal de diversas espécies de mamíferos e está sendo muito estudada em suínos. A função biológica destas proteínas ainda está sendo estudada, sugerindo-se que elas possam participar do processo de capacitação, reconhecimento e ligação entre os gametas masculino e feminino (CALVETE et al., 1994).

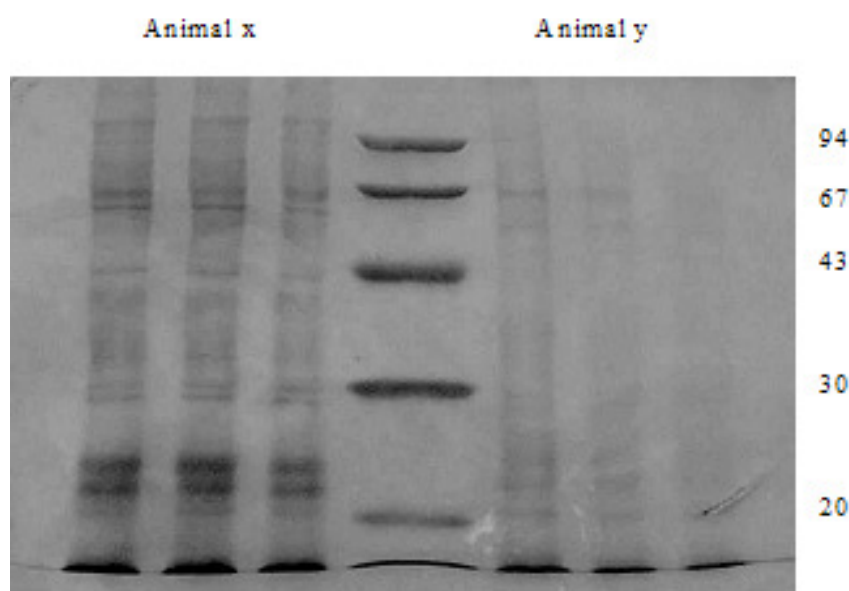


Fig. 9. Perfil eletroforético das proteínas seminais em caprinos com alta (x) e baixa (y) congelabilidade. Fonte: Eloy (2008)

Descobertas recentes das proteínas no avanço do conhecimento no mundo

Nesses últimos anos, cientistas descobriram uma pequena proteína no cérebro, chamada kisspeptin, responsável pelo desencadeamento do início da ovulação, desempenhando papel chave neste processo durante a puberdade (SWANSON et al., 2001; TENA-SEMPERE, 2006; ROA et. 2008).

Atualmente um grupo da Universidade de Otago dirigido pelo professor Allan Herbison em colaboração com pesquisadores da Universidade de Cambridge publicaram um trabalho evidenciando a primeira sinalização emitida pela kisspeptin no cérebro que também é essencial para desencadear a ovulação em adultos. Este achado é de grande importância, uma vez que há mais de 30 anos pesquisadores tentam encontrar como precisamente o cérebro controla a ovulação.

Também se identificou no fluido seminal fatores protéicos que, ao serem transferidos do macho para a fêmea na cobertura, afetam o sucesso reprodutivo. Isto acontece em várias espécies, desde o grilo até os primatas. Na mosca da fruta, por exemplo, proteínas do fluido seminal exercem influência sobre a habilidade de competição do espermatozóide e alteram o comportamento pós cobertura da fêmea, bloqueando seu interesse por outros machos e induzindo a mesma a pôr seus ovos. Usando novos métodos da proteoma, cientistas da Universidade de Washington (UW) descobriram mais de 80 proteínas, antes desconhecidas em desempenhar papel na reprodução, que são transferidas para a fêmea da mosca da fruta pelo fluido seminal.

Considerações Gerais

Os marcadores moleculares foram identificados há pouco mais de três décadas e já são considerados como uma ferramenta ímpar no diagnóstico de doenças e de infertilidade, em especial na espécie humana, onde os estudos estão mais avançados.

Em produção animal, para que trabalhos de melhoramento genético sejam realizados de modo sustentável, a seleção de características positivas para produção e reprodução, alicerçada em bases da proteômica e da genômica, é o que a sociedade está demandando como um todo, e em especial, o setor produtivo. Na espécie caprina, embora os trabalhos nesta área ainda estejam se iniciando, espera-se que no futuro próximo sejam identificados marcadores para fertilidade, prolificidade, congelabilidade, doenças, características da carne e do leite, etc., de importância fundamental para formação de rebanhos produtivos e de características específicas.

Predizer a fertilidade e doenças do sistema reprodutivo do macho não são os únicos benefícios que o conhecimento das funções do plasma seminal e de seus marcadores moleculares trarão para a produção animal, mas, também servirá para avaliar metodologias de processamento de sêmen nas espécies animais, em especial na espécie caprina.

Sabe-se que ainda há um longo caminho a percorrer, mas o importante é que as pesquisas estão avançando com foco no comportamento reprodutivo e na função das proteínas seminais de caprinos nativos e adaptados que habitam a região semi árida do Nordeste do Brasil.

Referência bibliográfica

AHMAD, N.; NOAKES, D. E. Seasonal variations in the semen quality of young British goats. **Brasilian Veterinary Journal**, v.2, p.225-236, 1996.

AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 191-200, 1991.

ASADPOUR, S.M. et al. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.308-313, 2007.

AZERÊDO, G. A. **Avaliação das características seminais, dos níveis séricos de testosterona e do perfil proteico de ejaculado de caprinos por eletroforese bidimensional**. 2003. 74 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

BACCETTI, 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.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **Journal of Andrology**, v.26, n. 4, p. 539-49, Jul./Aug. 2005.

BURGESS, S. C. Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases. **Poultry Science**, v.83, p.552-573, 2004.

CALVETE, J. J.; SOLÍS, D.; SANZ, L.; DIAZ-MAURINO, T.; TÖPFER-PETERSEN, E. Glycosilated boar spermadhesin AWN-1 isoforms: biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites and effect of glycosylation on ligand binding. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, n. 10, p. 667-673, 1994.

CARDOZO, J. A.; FERNANDÉZ - RUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 841-850, 2006.

COOPER, T. G. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 53, p.119-136, 1998

DE VENEVELLES, P.; CHICH, J. F.; FAIGLE, W.; LOEW, D.; LABBE, M.; GIRARD-MISGUICH, F.; PERY, P. Towards a reference map of Eimeria tenella sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **International Journal of Parasitology**, v.34, n. 12, p.1321-1331,2004.

DESNOYERS, L; MANJUNATH , P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 267, n. 4, p. 10149–10155, May. 1992.

ELOY, A. M. X. Electrophoresis profile in plasma semen from Anglo Nubian goats according to freezing ability in Northeast of Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 9.; REUNIÓN NACIONAL SOBRE CAPRINOCULTURA, 23, 2008, Querétaro, México. **Sustainable goat production: challenges an opportunities of small and large enterprises**; proceedings. Querétaro: International Goat Association, 2008. p. 238

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Austrália: Butterworths, 1987. 194 p.

FLORMAN , H. M. ; FIRST, N. L. Regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. **Development of Biology**, v. 128, n. 2, p. 464–473, 1988.

FUCHS, D.; WINKELMANN, I.; JOHNSON, I. T.; MARIMAN, E.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 302-314, 2005.

HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteome profiling-pitfalls and progress. **Yeast**, v. 1, n. 2, p. 81-87, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; SONDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between Sperm Response to Glycosaminoglycans in vitro and Non-return Rates of Swedish Dairy AI Bulls **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, N. 5, p. 207-212, 2000.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; MATTOS, R. C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n. 1, p. 21- 30, 2003.

JONES R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 53, p. 73-84, 1998.

KALUME, D. E.; OKULATE, M.; ZHONG, J.; REDDY, R.; SURESH, S.; DESHPANDE, N.; KUMAR, N.; PANDEY, A. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. **Proteomics**, v.5, n. 14, p. 3765–3777, 2005.

KJAESTADD, H.; ROPSTAD, E. BERG, K. A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinary Scandinavia**. 1993, v.34, n. 3, p. 299-303, 1993.

KILIC, S.; SARICA, K.; YAMAN, Ö.; SOYGÜR, T.; GÖGUS, O.; YAMAN, L. S. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. **Urologia internationalis**, v. 56, p. 215-218. 1996.

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

KIRCHHOFF C. Molecular characterization of epididymal proteins. **Review of Reproduction**, v. 3, n. 2, p.86-95, May 1998.

LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p.1035-1048, Feb. 2002.

LARSON, J. L.; MILER, D. J. Can Relative Spermatozoal Galactosyltransferase Activity be Predictive of Dairy Bull Fertility. **Journal of Dairy science**, v. 83, n. 11, p.2473-2479, 2000.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemistry Journal**, v. 241, n. 3, p. 685-692, 1987.

MANN, T.; LUTWAK-MANN , C. Male reproductive function and semen. Berlin : Springer-Verlag, 1981. 495p.

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

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Seminal Plasma Composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 403–408, Aug. 2008.

MARQUES, V. A.; GOULART, L. R.; FELICIANO SILVA, A. E. D. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A2 concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrosome reaction. **Genetic Molecular Biology**, v.23, 825-829, 2000.

MARTINEZ, P. M.; ELOY, A. M. X. Efeito da sazonalidade sobre a congelção de sêmen caprino no Nordeste. IN: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2005. Teresina, PI. **Anais eletrônicos...** Teresina: UFPI, 2005. 1CD-ROM.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; MORTIMER, S. T; GILLAN, L.; GELLATLY E. L.; McPHIE, C. A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 2, p. 123-126, 1999.

MAXWELL, W. M.; DE GRAAF, S. P.; GHAOUI, REL-H; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society of Reproduction and Fertility**, Suppl, v. 64, p. 13-38, 2007.

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

O'FARREL, P.H. High resolution two - dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, May 1975.

OESTERLING, J. E. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. **Journal of Urology**, v. 145, n. 5, p. 907-923, May 1991.

PÉREZ-PÉ, R.; CÉBRIAN-PÉREZ, J.Á.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 425-434, Aug. 2001.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 60, n. 3, p. 289–310, Jul. 2006.

RATTAN, P. J. S. Eletrophoretic studies on bovine semen. **Indian Journal of Animal Science**, v.42, n. 2, p. 77-84, 1972.

ROA, J.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontier in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 48-64, Aug. 2008.

RONCOLETTA, 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 doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 82-86, 1999.

SAWAYA, M. C. T., ROLIM, M. R. S. Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório. Juruá, Curitiba, 2003. 150 p.

SHARIAT, S.F., CANTO, E. I.; KANTTAN, M. W.; SLAWIM, K. M. Beyond Prostate-Specific Antigen: New Serologic Biomarkers for Improved Diagnosis and Management of Prostate Cancer. **Journal Urology**, v. 6, n. 2, p. 58-72, 2004.

STARITA-GERIBALDI, M.; POGGIOLI, S.; ZUCCHINI, M.; GARIN, J.; CHEVALLIER, D.; FENICHEL, P.; POINTIS, G. Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n.8, p. 715-722, Aug. 2001.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M. Proteomics of boar seminal plasma current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 3, p. 279-290, Nov. 2005.

SWANSON, W. J.; CLARK, A. G.; WALDRIP-DAIL, H. M.; WOLFNER, M. F.; AQUADRO, C. F. Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. **Proceeding of National Academic Science USA**, v. 98, p. 7375–7379, Jun. 2001.

TENA-SEMPERE, M. GPR54 and kisspeptin in reproduction. **Human Reproduction Update**. v. 12, n. 5, p. 631-639, 2006.

TEIXEIRA, D. I. A.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; HAVT, A.; BLOCH, C. J.; PRATES, M. V.; MORENO, F. B.; SANTOS, E. A.; GADELHA, C. A.; GADELHA, T. S.; CRISÓSTOMO, F. S.; FREITAS, V. J. Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 4, p. 331-335, Aug. 2002.

TEIXEIRA, A. V.; ELOY, A. M. X.; FURTADO, J. R.; PONTES, M. S. Seminal parameters and its correlation with plasma proteins in Anglo Nubian goats. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 9.; REUNIÓN NACIONAL SOBRE CAPRINOCULTURA, 23, 2008, Querétaro, México. **Anais...** Querétaro: International Goat Association, 2008. 408 p.

THERIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 52 p.1372-1379, 1995.

THERIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, v. 57, p.1080-1088, 1997.

THERIEN, I.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 41-51, 2001.

THOMPSON, I. M., ANKERST, D. P. Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer. **Canadian Medical Association** , n. 13, Jun. 2007.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding protein from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 39, p. 39-50, Apr. 2003

YAMAKAWA, K.; YOSHIDA, K.; NISHIKAWA, H.; KATO, T.; IWAMOTO, T. Comparative Analysis of Interindividual Variations in the Seminal Plasma Proteome of Fertile Men With Identification of Potential Markers for Azoospermia in Infertile Patients. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 858–865, 2007.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, v. 2, n. 4, p. 371-372, Nov. 1994.