

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS
DA RAÇA MORADA NOVA

NADIANA MARIA MENDES SILVA

SOBRAL – CE
SETEMBRO – 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA RAÇA MORADA
NOVA**

NADIANA MARIA MENDES SILVA

**SOBRAL – CE
SETEMBRO – 2010**

NADIANA MARIA MENDES SILVA

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA

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

Área de concentração: Reprodução Animal

ORIENTADORA:
DRA. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY.
CO-ORIENTADOR:
DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO

SOBRAL – CE
SETEMBRO – 2010

**CIP - BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL:**

B

SILVA, Nadiana Maria Mendes

Proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova /
Nadiana M^a Mendes Silva. - Sobral - CE: UVA / Centro de Ciências
Agrárias e Biológicas, 2010.
75f.: il.

Orientadora: Ângela Maria Xavier Eloy

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Vale do
Acará / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas / Mestrado em
Zootecnia, 2010.

1. Zootecnia - Ovinos – Proteína seminal. 2. Bandas protéicas. 3.
Fertilidade. 4. Sêmen. 5. Parâmetros seminais. 6. Eletroforese
unidimensional

I. Eloy, Ângela Maria Xavier. II. Universidade Estadual Vale do Acaraú.
III. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas. IV. Proteínas do plasma
seminal de ovinos da raça Morada Nova.

CDD

Nadiana Maria Mendes Silva

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA RAÇA MORADA
NOVA**

Dissertação defendida e aprovada em ____/____/____ pela Comissão
Examinadora constituída por:

Dra. Ângela Maria Xavier Eloy
(Orientadora)
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
(Co-orientador)
UVA-Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr. Olivardo Facó
(Examinador)
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr. José Adalmir Torres de Souza
(examinador)
UFPI

Aos meus pais

Dedico minha vida,
acompanhada de lutas e triunfos,
que foram sempre guiados por
seus ensinamentos, apoio e
constante amor, prevalecendo,
sempre, os valores.
Obrigada!

Aos meus orientadores, Ângela
Eloy e Hélio Manso Filho, que de
uma forma ou de outra também
foram um pouco meus pais,
estando ao meu lado e me
acompanhando durante todos
esses anos.

Ofereço

“Se você não quer ser esquecido quando morrer, escreva coisas que valham a pena ler ou faça coisas que valham à pena escrever.”

Benjamin Franklin

AGRADECIMENTOS

“Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que dispensa comentários”.

Grande é minha lista de agradecimentos (o que me torna uma pessoa de sorte). A realização deste trabalho contou com a colaboração, consciente ou inconsciente, de um conjunto amplo de familiares, amigos, colegas, professores e instituições, aos quais agradeço sinceramente.

Aos meus pais, Maria Mendes Dias e João Batista Silva, que sempre confiaram em meus sonhos, mesmos nos mais loucos, e me ensinaram a acreditar que é possível realizá-los, além de me mostrarem que trabalho duro, perseverança e honestidade são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas.

As minhas irmãs, Nádia Mendes e Nágila Mendes, pela compreensão, incentivo e amor que manifestaram ao longo de minha jornada.

A meu amigo, Theófilo Maciel Melo, que me apoiou nos momentos mais difíceis, me ajudando na dura tarefa de morar longe de casa.

A Bruno Recamonde, pelas risadas e constante alegria que me proporciona, você nem imagina como ajuda a manter meu equilíbrio.

Sempre estou em dívida com meu amigo e mestre Hélio Cordeiro Manso Filho pelo incentivo que deu no início de minha vida acadêmica. Sinto apenas que a distância não tenha permitido usufruir mais de seus conhecimentos e de seu convívio.

A minha orientadora e pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Ângela Maria Xavier Eloy, que me abriu caminhos nunca antes pensados, além de me apresentar, na prática, a outras possibilidades de ensinamentos.

Ao meu co-orientador e pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Dr. Raimundo Rizaldo, pelo tempo dispensado na correção deste trabalho.

Aos pesquisadores da Embrapa Caprinos e Ovinos Dr. Diones Oliveira Santos e Olivardo Facó pelas incontáveis dúvidas que me esclareceram e pelo incentivo à pesquisa científica, estando sempre por perto quando precisava de ajuda.

Aos meus verdadeiros mestres que se mostraram capazes de colaborar com o aprendizado de nós alunos, em especial aos meus antigos professores, que me ensinaram

com prazer e dedicação parte do que sei e, o que é mais importante, me ensinaram a aprender sozinha.

As minhas amigas, Andréa Zilá e Sâmia Gomes, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, dizendo sempre que posso tudo que realmente quero e sou capaz de fazer tudo aquilo que desejo, pois acreditam na minha capacidade.

As minhas amigas de “república” se é assim que podemos denominar a nossa moradia, Ismênia, Roberta e Juliana, por estarem comigo e me ajudarem nas horas necessárias.

As Zootecnetes Daniele, Kelma, Raquel, Rosalba e Tatiana por terem me recebido em seu ciclo de amizade e me proporcionarem momentos de alegria e lazer.

A todos da turma do Mestrado em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú, pelos momentos que passamos juntos.

A João Ricardo e Nóbrega Medeiros pela paciência em repassar seus conhecimentos.

A Osmarilda, Jamile, Helena, Jorge e Felipe, por terem de ajudado de alguma forma.

A José Leão, Sr. Chiquinho e Mascote por cuidarem tão bem dos animais do experimento.

Aos professores Ana Sancha, Adalmir e Kátia Parente pelas contribuições neste trabalho.

A todos meus amigos do Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, me apoiando com suas críticas e sugestões.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, pela oportunidade da realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo

A EMBRAPA Caprinos e Ovinos, pelo financiamento, disponibilidade das instalações e execução do projeto.

A Cidade de Sobral por ter me acolhido.

Aos animais experimentais, meu profundo respeito.

As demais pessoas, que de diversas maneiras, apesar de não citadas aqui, deram crédito à realização deste trabalho e tornaram esse sonho possível. É muito difícil agradecer a

todos sem esquecer, inevitavelmente, de alguém, mas aos que esqueci meu pedido de perdão e meus agradecimentos sinceros!”

SUMÁRIO

	PÁGINA
Lista de tabelas.....	XII
Lista de figuras.....	XIII
Resumo geral.....	XIV
Considerações gerais.....	01
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
Introdução.....	04
1. Rebanho ovino.....	04
1.1. Raça morada nova.....	04
2. Sêmen.....	05
2.1. Avaliação seminal.....	06
2.2. Espermatozóides.....	07
2.3. Plasma seminal.....	07
2.3.1 composição.....	07
2.3.2. Função da proteínas.....	08
2.4. Proteínas do plasma seminal.....	09
3. Método de estudo das proteínas seminais.....	12
3.1. Eletroforese.....	12
Referências bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2 – PLASMA SEMINAL DE OVINOS MORADA NOVA E SUA RELAÇÃO COM OS PARÂMETROS METEOROLÓGICOS.....	24
Resumo	25
Introdução	27
Material e métodos	28
Resultados e discussão	31
Conclusões	34
Referências bibliográficas	35
CAPÍTULO 3 – RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E BANDAS PROTÉICAS DOS OVINOS MORADA NOVA COM OS DADOS METEOROLÓGICOS.....	38
Resumo	39
Introdução	41
Material e métodos	43
Resultados e discussão	48
Conclusões	55
Referências bibliográficas	56
CAPÍTULO 4 - PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA.....	61
Resumo	62
Introdução	64
Material e métodos	66
Resultados e discussão	70
Conclusões.....	72
Referências bibliográficas.....	73
Considerações finais.....	75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

1. Principais componentes protéicos do plasma seminal nas diferentes espécies.....	10
--	----

CAPÍTULO 2

1. Frequência das bandas protéicas presentes nos géis de eletroforese dos ovinos da raça Morada Nova distribuídas de acordo com o seu peso molecular.....	31
---	----

CAPÍTULO 3

1. Dados referentes à temperatura (°C), Umidade (%) e Precipitação pluviométrica (mm) de outubro de 2008 a setembro de 2009 na região semiárida do Nordeste.....	41
2. Valores médios dos períodos seco e chuvoso para volume do ejaculado (mL), concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL), motilidade progressiva individual (%), vigor (1-5) e proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de animais da raça Morada Nova no semiárido do Nordeste.....	48
3. Análises de variância com os respectivos valores do teste F para as fontes de variação, segundo as características estudadas em ovinos Morada Nova na região semiárida do Nordeste.....	49
4. Médias para a variável concentração espermática, segundo a estação do ano e o reprodutor ovino Morada Nova na região semiárida do Nordeste.....	51
5. Frequência amostral das bandas protéicas durante os 12 meses do ano (outubro/2008 a setembro/2009), nos períodos seco e chuvoso.....	54

CAPÍTULO 4

1. Avaliação individual dos parâmetros espermáticas dos ovinos da raça Morada Nova.....	70
2. Relação das bandas protéicas no gel de eletroforese que se diferenciam entre os animais da raça Morada Nova; número total de bandas protéicas e taxa de fertilidade de cada animal avaliado em estação de monta.....	71
3. Taxa de fertilidade dos ovinos Morada Nova no semiárido do Nordeste Brasileiro.....	71

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 1**

1. Representação esquemática de eletroforese.....	13
---	----

CAPÍTULO 2

1. Gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova, onde as bandas circuladas são as que se expressaram individualmente nos animais estudados.....	33
---	----

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil protéico do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova ao longo do ano, relacionando-o aos parâmetros meteorológicos, às características espermáticas e à fertilidade. No primeiro experimento foi realizado um estudo preliminar das bandas protéicas visando identificar os pesos moleculares, sua distribuição e frequência. Foi coletado sêmen de 14 reprodutores Morada Nova da região semiárida do Ceará para análise dos géis de eletroforese. Observou-se a presença de quatro bandas protéicas (14, 20, 22 e 55 kDa) em 100% das amostras e que as proteínas de massa molecular de 33, 50, 52 e 115 kDa apresentaram menor frequência. No segundo experimento foram utilizados quatro destes reprodutores onde se relacionou os dados meteorológicos aos parâmetros espermáticos e as bandas protéicas nos períodos seco e chuvoso. As coletas de sêmen ocorreram semanalmente de outubro/2008 a setembro/2009 e as bandas protéicas foram analisadas através de eletroforese unidimensional SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida a 12,5%. A concentração espermática foi a variável influenciada ($P < 0,05$) pela época do ano, pelo indivíduo, pela interação época do ano vs reprodutor e pela data da coleta. Verificou-se correlação significativa ($P < 0,05$) entre os parâmetros seminais e meteorológicos durante o dia e o mês. Ao se analisar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal pode-se observar um total de 44 proteínas diferenciadas, sendo 29 proteínas menores que 50 kDa e 15 proteínas maiores que 50 kDa, variando seus pesos moleculares de 12 a 135 kDa. Houve uma variação de 7 a 28 bandas em cada animal ao longo do ano. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os períodos seco e chuvoso quanto a manifestação de determinadas bandas protéicas. Comparando-se os animais, a banda de massa molecular de 75-80 kDa apresentou maior frequência ($P < 0,05$) em um deles. No terceiro experimento foi avaliada a fertilidade dos quatro reprodutores que foram submetidos a duas estações de monta, totalizando 20 fêmeas por animal. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) quanto à taxa de fertilidade, apesar dos animais terem apresentado diferentes bandas protéicas. Concluiu-se que, mesmo tratando-se de uma raça naturalizada, as características espermáticas e a expressão das bandas protéicas da raça Morada Nova sofreu influência dos parâmetros meteorológicos na região semiárida do Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: bandas protéicas, fertilidade, parâmetros espermáticos, sêmen

GENERAL ABSTRACT

This study aimed at identifying the protein profile of seminal plasma of Morada Nova sheep throughout the year, relating to the meteorological parameters, sperm characteristics and fertility. In the first experiment was a preliminary study of protein bands to identify the molecular weights, their distribution and frequency. Semen from 14 sires New Address of the semiarid region of Ceará for the analysis of electrophoresis gels. We observed the presence of four protein bands (14, 20, 22 and 55 kDa) in 100% of the samples and the proteins of molecular mass of 33, 50, 52 and 115 kDa showed a lower frequency. The second experiment used four of these players where weather data related to sperm parameters and the protein bands during the dry and rainy. Semen collections were weekly for October/2008 September/2009 and the protein bands were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis on polyacrylamide gels or 12.5%. The sperm concentration was the variable influence ($P < 0.05$) by season, by the individual, the interaction time of the year vs. player and collection date. There was a significant correlation ($P < 0.05$) between semen parameters and weather during the day and month. When analyzing the electrophoretic profile of seminal plasma proteins can be observed a total of 44 different proteins, 29 proteins smaller than 50 kDa and 15 kDa proteins larger than 50, their molecular weights ranging from 12 to 135 kDa. There was a variation from 7 to 28 bands in each animal throughout the year. Significant difference ($P < 0.05$) between dry and rainy seasons as the manifestation of certain protein bands. Comparing the animals, the band of molecular mass of 75-80 kDa showed a higher frequency ($P < 0.05$) in one. In the third experiment the fertility of the four players who underwent two breeding seasons, totaling 20 females per animal. No difference was observed ($P > 0.05$) on the fertility rate, although the animals have been presented different protein bands. It was concluded that, even in the case of a naturalized race, the sperm characteristics and the expression of protein bands Morada Nova influenced by meteorological parameters in the semiarid region of northeastern Brazil.

Keywords: protein bands, fertility, sperm parameters, semen

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie ovina foi a primeira a ser domesticada estando presente na história da humanidade como uma atividade que proporciona alternativas para subsistência fornecendo lã e pele para vestuário e carne e leite para alimentação.

A raça Morada Nova, naturalizada brasileira e com origem no Nordeste do Brasil, é uma das principais raças nativas de ovinos deslanados, explorada para produção de carne e pele. Adaptada às condições climáticas do semiárido, devido sua menor exigência nutricional quando comparadas a outras raças, adequando-se aos sistemas de produção baseados em pastagens, tornando-se um componente produtivo nas pequenas propriedades. Esta raça apresenta elevada prolificidade, aliada ao menor intervalo entre partos e elevada habilidade materna.

A eficiência reprodutiva é o principal fator para o aumento da lucratividade do rebanho, sendo a taxa de fertilidade, em grande parte, influenciada pelo macho. Desse modo, é interessante que dentre os parâmetros utilizados para sua seleção, estejam às características reprodutivas. Logo, uma técnica utilizada é a avaliação seminal desses animais.

O potencial reprodutivo, em geral, é estimado a partir de parâmetros de qualidade de sêmen após avaliações *in vitro*. Essas avaliações incluem métodos convencionais, como estimativas de motilidade, vigor e morfologia espermática, ou aspectos ligados à atividade funcional da célula, tais como a capacitação, a reação acrossômica e a capacidade de ligação e penetração no oócito.

O plasma seminal tem sido objeto de estudo de várias linhas de pesquisa, sob a justificativa da sua importância na viabilidade espermática, principalmente em relação às proteínas, por estarem em maior concentração do que outros componentes e, por participarem ativamente do processo de fecundação. Alguns autores baseando-se nas diferenças apresentadas na qualidade seminal, com o uso de bovinos férteis e com degeneração testicular experimental, sugeriram que os conteúdos do plasma seminal influenciavam na fertilidade masculina. Entretanto, os mecanismos moleculares de ação destes polipeptídeos ainda não foram elucidados, uma vez que poucas proteínas foram realmente identificadas e caracterizadas.

O conhecimento sobre a bioquímica espermática e os estudos relacionados aos seus componentes representam uma ferramenta importante para o conhecimento da

fertilização, podendo variar de acordo com a raça, localização geográfica e época do ano já que diversos autores identificaram problemas reprodutivos relacionados à época seca em pequenos ruminantes. Portanto, este estudo molecular procurou caracterizar as proteínas do plasma seminal dos ovinos da raça Morada Nova, sua distribuição e frequência, sua relação com as diferentes épocas do ano e fertilidade, estando este experimento de acordo com as normas de bem-estar animal.

Levaram-se em consideração as seguintes hipóteses: Existe diferença na distribuição e frequência das bandas protéicas entre as estações do ano no plasma seminal de ovinos Morada Nova no semiárido do Nordeste; Os fatores climáticos interferem nas características espermáticas; A fertilidade é influenciada pela distribuição e frequência das bandas protéicas do plasma seminal de ovinos Morada Nova na região Nordeste.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Rebanho ovino

De acordo com o Censo agropecuário de 2006 (Censo, 2008) a população ovina do Brasil está estimada em 13.856.747 animais, havendo maior concentração do rebanho na região Nordeste (7.752.139) seguido pelas regiões Sul (3.998.753), Centro-Oeste (867.736), Sudeste (763.617) e Norte (474.502), tendo o Estado do Ceará 1.556.574 cabeças de ovinos. No Brasil, o efetivo da região Sul, onde predominam raças lanadas, observou-se uma queda de 50% entre 1980 e 2001, enquanto nas regiões onde predominam as raças deslanadas, se verificou aumento do efetivo, havendo no Nordeste um acréscimo de 13,5% no mesmo período (Couto, 2003).

1.1. Raça Morada Nova

Nos anos de 1937 e 1938 no Município de Morada Nova, no Ceará, foi registrado a presença de animais deslanados, de pelagem vermelha, queixo curto, olhos pequenos, cascos pretos e o rabo com ponta branca (Domingues, 1941), a qual foi considerada importante para o homem e para a região (Domingues, 1950). Nos anos subsequentes, esses animais foram também observados também em outros municípios cearenses e no Piauí.

Segundo Domingues (1954), a raça Morada Nova (Figura 1) descenderia diretamente dos carneiros Bordaleiros de Portugal, trazidos para o Brasil na época da colonização e que, desde então, teriam passado por um processo de seleção natural que resultara na ausência de lâ. Já Mason (1979), acreditava que estes animais teriam vindo da África, provavelmente na época do tráfico de escravos. Figueiredo (1980), baseado nas duas possibilidades, acreditavam que a raça resultou do cruzamento de ovinos Bordaleiros, vindos de Portugal, com ovinos deslanados africanos.

Segundo Facó et al. (2008), a origem da raça Morada Nova permanece incerta até os dias atuais, levando em consideração a ausência de um maior controle sobre a importação de animais e sobre os acasalamentos/cruzamentos nos rebanhos ovinos do Brasil colonial. Portanto, é provável que a raça Morada Nova tenha contribuições tanto de carneiros ibéricos quanto de africanos, tendo seus descendentes passados pelo processo de seleção natural.

A raça Morada Nova é uma das principais raças nativas de ovinos deslanados do Nordeste do Brasil, dotada de características morfofuncionais que lhe conferem um alto grau de adaptabilidade ao ambiente quente, sendo animais resistentes, de fácil manejo e que podem viver com facilidade em regiões do semiárido, alimentando-se da vegetação da caatinga e apresentando boa capacidade reprodutiva, tendo a produção de carne como principal característica (Souza et al, 2003). De acordo com Fernandes (1992), esses animais possuem aptidão para carne e pele de alta qualidade, apresentando peso entre 40 kg e 60 kg para machos adultos e de 30 kg a 50 kg para fêmeas adultas; têm boa habilidade materna e alta taxa de fertilidade.

2. Sêmen

O sêmen é uma suspensão celular líquida contendo espermatozóides e secreções dos órgãos acessórios do trato reprodutivo do macho. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal, cuja composição consta de substâncias oriundas de uma série de fontes, incluindo os testículos, os epidídimos, as glândulas acessórias (Hafez e Hafez, 2004) e os ductos deferentes (Evans e Maxwell, 1990).

Durante a ejaculação, os espermatozóides previamente estocados na porção caudal do epidídimo, são misturados com secreções produzidas nas glândulas sexuais acessórias (Way et al., 2000). Segundo Hafez e Hafez (2004), o método ideal para avaliar a fertilidade do reprodutor, além de sua habilidade de produzir a gestação, é através do exame do sêmen.

A composição do sêmen é variável, não somente entre as espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie. Estas características podem ser avaliadas por diferentes métodos que se completam, tais como:

- Exame macroscópico no qual se observa o volume, a viscosidade e o aspecto;
- Provas bioquímicas do metabolismo espermático;
- Prova de resistência às modificações de temperatura;
- Provas de diluição;
- Análise do pH e da condutividade elétrica;

- Exame microscópico no qual avalia-se a motilidade individual, o vigor e a porcentagem de vivos e mortos através de corantes vitais como a eosina-nigrosina e patologia espermática.

2.1. Avaliação seminal

A avaliação da qualidade espermática está ligada à necessidade de prever a fertilidade dos reprodutores para servirem nos rebanhos ou para serem utilizados em programas de reprodução programada (CBRA, 1998). Além do exame sanitário, as características físicas e químicas e caracteres microscópicos devem ser levados em consideração no julgamento do sêmen.

As características físicas compreendem o volume, a cor, o aspecto, o odor e a densidade (Mies Filho, 1987). O volume médio do ejaculado ovino é de 1,0 mL e a concentração espermática varia entre dois e seis bilhões, apresentando um aspecto cremoso (CBRA, 1998). Já os caracteres microscópicos são a motilidade, expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozóides que apresentam movimento (Hafez e Hafez 2004), sendo a média da motilidade de 75% de espermatozóides móveis e o vigor, representado pela força do movimento que acaba por influenciar a velocidade com que os espermatozóides se movimentam, classificado de 0 a 5; onde 0 é a ausência de movimento progressivo e 5 é um movimento vigoroso e veloz dos espermatozóides, sendo o valor mínimo aceitável para ovinos 3,0 (CBRA, 1998).

Vários critérios têm sido utilizados para buscar indicadores confiáveis do potencial reprodutivo dos animais, desde a avaliação da motilidade e defeitos morfológicos, a análise computadorizada do sêmen e aos testes avançados de função espermática, como a integridade acrossômica ou da cromatina (Holt et al. 1997; Souza et al., 2001; Gadea, 2005). Rodriguez-Martinez et al., (1997) e Zhang et al., (1998) relataram que os parâmetros avaliados rotineiramente têm capacidade limitada na avaliação da fertilidade potencial de reprodutores. Larson e Miller (2000), afirmaram que reprodutores com características seminais semelhantes podem apresentar diferença de 20 a 25% nos índices de fertilidade, sendo necessários estudos em busca de parâmetros que tenham maior afinidade com a fertilidade. Em estudos recentes foram demonstradas uma relação entre a expressão de proteínas no fluido do trato reprodutivo e a fertilidade dos reprodutores (Braundmeier e Miller, 2001; Moura et al., 2006a,

2007). Neste contexto, a biologia molecular tem sido uma ferramenta muito utilizada na tentativa de identificar marcadores para esta característica.

2.2. Espermatozóides

Os espermatozóides são células haplóides, diferenciadas, produzidas nos testículos e maturadas no epidídimo possuindo propriedades únicas entre as células do organismo, sendo suas reservas energéticas limitadas, não realizando a síntese protéica, possuindo pouco citoplasma, uma membrana plasmática bastante polarizada contendo várias proteínas, e um citoesqueleto inteiramente especializado para o deslocamento (Dacheux e Gatti 1995). Na espécie ovina o espermatozóide tem forma de clava e mede aproximadamente 9 µm de altura por 5 µm de diâmetro em sua maior circunferência (Derivaux, 1980).

Para que os espermatozóides sejam considerados qualitativamente viáveis e potencialmente férteis é necessário que possuam morfologia normal, atividade metabólica e membrana plasmática perfeitamente íntegra. Esta condição constitui-se em um pré-requisito para que aconteçam os eventos relacionados ao processo de fertilização (Rodriguez-Martinez, 1997).

2.3. Plasma seminal

2.3.1. Composição

O plasma seminal é definido como sendo o meio líquido no qual os espermatozóides se encontram imersos após a ejaculação (Mann e Lutwak-Mann, 1981). É uma complexa mistura de secreções dos túbulos seminíferos, epidídimo, ducto deferente, ampola, vesículas seminais, próstata e glândulas bulbo-uretrais (Evans e Maxwell, 1990; Hafez, 2000; Pesch et al., 2006) que têm efeito benéfico (Barrios et al, 2000) e deletério (Leboeuf, 2000) sobre estes.

É constituído por compostos orgânicos e inorgânicos, entre estes íons, como sódio, potássio, cloreto e magnésio (Hafez e Hafez, 2004); aminoácidos; lipídeos; carboidratos; ácido ascórbico; peptídeos; ácidos graxos; enzimas; constituintes

antimicrobianos, entre eles as imunoglobulinas de classe IgA e proteínas, sendo estas o constituinte orgânico em maior abundância (Frazer e Bucci, 1996; Pilch e Mann, 2006). Além disso, possui uma variedade de hormônios incluindo os andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH (Hormônio Folículo Estimulante), LH (Hormônio Luteinizante), hormônio do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, hormônio liberador da tireóide e encefalinas (Hafez, 2000)

Segundo Guerra et al. (2004) e Almeida e Ball (2005), o plasma seminal contém antioxidantes importantes para a preservação dos espermatozóides, entre eles, a vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina. Hafez (2000) também afirmou que as glândulas vesiculares secretam açúcares como a glicose, ribose, sorbitol, inositol e frutose que atuam no metabolismo energético do espermatozóide.

O volume e a composição bioquímica do plasma seminal variam entre as espécies (Mann e Lutwalk, 1981) e os períodos do ano (Martins Júnior et al., 1995; Roncoletta et al., 1997; Roncoleta, 1999; e Catunda, 2007).

2.3.2. Função das proteínas

A bioquímica do plasma seminal dos mamíferos vem sendo estudada por diversos motivos, seja por sua capacidade de influenciar a fertilidade potencial do espermatozóide ou por serem importantes na avaliação da capacidade de secreção das glândulas sexuais anexas, que dependem da produção de andrógenos pelos testículos para o desempenho de suas funções (Mann, 1974).

Muitas são as evidências da importância do plasma seminal no processo reprodutivo (Marchini et al, 1990; Morgentaler et al, 1990; Autiero et al, 1991; Wolfe et al, 1993; Frazer e Bucci, 1996), sobre os quais vários pesquisadores destacaram o papel positivo do plasma seminal na capacitação (Miller et al., 1990; Therien et al., 1999), na motilidade espermática e na habilidade de alcançar, reconhecer e se ligar ao oócito (Evans e Maxwell, 1990; Maxwell e Johnson, 2000), servindo de nutriente, estimulando o metabolismo e transportando-o até o trato genital feminino (Evans e Maxwell, 1990; Kraus et al., 2005; Troedsson et al., 2005;), influenciando assim na fertilidade masculina (Autiero et al., 1991; Wolfe et al, 1993).

Dentre os benefícios do plasma seminal na reprodução podemos citar o remodelamento da superfície espermática, o estabelecimento de reservas de

espermatozóides no oviduto, a modulação da capacitação, a interação entre gametas (Topfer-Petersen et al., 2005), a modulação da resposta inflamatória e a proteção dos espermatozóides no útero (Troedson et al., 2002).

Além de influenciar no equilíbrio osmótico e na inibição imunológica, algumas proteínas presentes, especialmente enzimas catalíticas, estão envolvidas no metabolismo espermático (Shivaji et al., 1990). Também tem ação bactericida, neutraliza metabólitos espermáticos e é responsável por aumentar a viabilidade espermática em carneiros (Graham, 1994).

Atualmente o plasma seminal vem sendo mais estudado, principalmente em relação às proteínas, por estarem em maior concentração do que outros componentes e, por participarem ativamente do processo de fecundação (Mc Couley et al, 1997; Bellin et al., 1998).

A biologia molecular na área da reprodução animal traz novas ferramentas para o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal, cuja seleção de genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas, possa ser incrementada (Roncoletta, 1999)

O plasma seminal também é utilizado em diferentes processos biotecnológicos, como na criopreservação espermática (Graham 1994; Aurich et al., 1996) e na separação de espermatozóides x e y (Maxwell e Johnson, 2000).

2.4. Proteínas do plasma seminal

As proteínas do plasma seminal são parcialmente originárias do plasma sanguíneo e, parte delas sintetizadas e secretadas pelos testículos, epidídimo e glândulas vesiculares (Topfer-Petersen et al., 2005). A adição e remoção de uma variedade de proteínas durante a maturação no epidídimo e, por ocasião da ejaculação, têm influência sobre a motilidade espermática (Sánchez-Luengo et al., 2004), capacitação do espermatozóide, viabilidade e fertilização (Brandon et al., 1999), variando entre as diferentes espécies (Villemure et al., 2003). Sendo relatado na espécie ovina a expressão de proteínas que exercem efeito positivo sobre a capacitação espermática e proteção dos espermatozóides de carneiros adultos de raças européias (Pérez-Pé et al., 2001; Barrios et al., 2005; Fernández-juan et al., 2006; Cardozo et al., 2007).

Podemos dividir as proteínas seminais em três famílias principais (Tabela 1):

- Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP);
- Proteínas que contém o domínio fibronectina tipo II (Fn-II);
- Família das espermedesinas.

No plasma seminal também foram descritas outras proteínas como a Gp 54 (Complexo glicoprotéico de 54 kDa), precursora da proteína SMIF (peptídeo inibidor da motilidade espermática), a proteína fosfatase ácida fosfotirosina, envolvida no controle da proliferação e diferenciação celular, o fator ativador das plaquetas de acetilhidrolase (PAF-AH), encarregada de regular os níveis de PAF e a ubiquitina cuja função é degradar as proteínas danificadas, podendo estar relacionada ao processamento dos espermatozoides epididimários anormais (Posadas, 2007).

Tabela 1. Principais componentes protéicos do plasma seminal nas diferentes espécies

Família de proteínas	Espécie	Nome	Referência
Proteínas CRISP	Humanos	CRISP1, CRISP2, CRISP3	Udby et al., 2005
	Equinos	CRISP1, CRISP2, CRISP3	Topfer-Petersen et al., 2005
	Ratos	CRISP1, CRISP2, CRISP4	Jalkanen et al., 2005 Udby et al., 2005
	Javali	CRISP1, CRISP2	Brooks e Tiver 1983 Udby et al., 2005
Proteínas com o domínio Fn-II	Cavalo	HSP-1, HSP-2, EQ-12	Calvete et al., 1995b Töpfer-Petersen et al., 2005 Saalmann et al., 2001
	Carneiro	RSVP-14, RSVP-20, RSP-15 RSP-22, RSP-24	Barrios et al., 2005 Bergeron et al., 2005
	Touro	BSP-A1, BSP-A2, PDC-109 BSP-30 kDa	Manjunath e Sairam 1987 Manjunath e Therien 2002
	Caprino	GSP-14, GSP-15, GSP-20, GSP-22 kDa	Villemure et al., 2003
	Bubalino	BISV-16, BISV-17, BISV-18, BISV-28 kDa	Boisvert et al., 2004
	Javali	pB1	Calvete et al., 1997a
Espermedesinas	Cavalo	HSP-7	Reinert et al., 1996
	Carneiro	Espermedesina de 15'5 kDa	Bergeron et al., 2005
	Touro	aSFP, Z13	Wempe et al., 1992 Tedeschi et al., 2000
	Javali	AWN, AQN-1, AQN-3, PSPI/PSP-II	Calvete et al., 1995b Varela et al., 1997

(Fonte: Tabela adaptada de Posadas, 2007)

Várias proteínas do plasma seminal foram relacionadas com os índices de fertilidade de reprodutores bovinos (Killian et al., 1993), suínos (Flowers, 1998) e equinos (Brandon et al., 1999) e com a congelabilidade (Roncoletta et al., 2000) e a viabilidade do sêmen (Al Somai et al., 1994; Barrios et al., 2000), sendo também

relacionadas a fatores de infertilidade em equinos (Brandon et al., 1999) e suínos (Jonakova et al., 2007). Também são importantes para a manutenção da motilidade em touros e carneiros e protegem a membrana espermática dos espermatozóides de suínos e ovinos aos danos causados pelas baixas temperaturas de preservação (Barrios et al., 2000; Perez-Pe et al., 2001).

Algumas proteínas já foram identificadas por influenciarem na motilidade dos espermatozóides, como as BSP A1/A2, A3 (Manjunath e Thérien, 2002; Sanchez-Luengo et al., 2004), BSP 30 kDa, aSFP e a fosfolipase A2 em bovinos (Manjunath e Therien, 2002).

A proteína ácida do fluido seminal (aSFP) também está relacionada com a inibição do estresse oxidativo do espermatozóide, prevenção do ataque imunológico (Moura et al., 2006) e a fosfolipase A2 (PLA2) está relacionada à reação acrossômica e à fusão das membranas dos gametas (Yuan et al., 2003), estimulando as células imunológicas e realizando uma atividade antimicrobiana no plasma seminal (Granata et al., 2005). Desse modo, as proteínas do plasma seminal exercem múltiplos efeitos sobre a função espermática e desempenham um importante papel na capacitação dos espermatozóides (Calvete et al., 1994; Barrios et al., 2000; Jonáková et al., 2007).

Em ovinos foi identificada uma proteína que tem propriedade de se ligar ao ferro, lactoferrina (Araújo, 2000), sendo um dos principais componentes do fluido epididimal (Fouchécourt et al., 2000; Dacheux et al., 2006), chegando a compor mais de 40% do total de proteínas em algumas regiões, participando como agente antimicrobiano e regulando a expressão gênica (Furmanski, 1995; Nozaki et al., 2002; Dacheux et al., 2005), possui a propriedade de liga-se aos espermatozóides durante o trânsito epididimário (Jin et al., 1997) ou durante a ejaculação (Thaler et al., 1990) e é provável que estes efeitos estejam relacionados à sua capacidade de sequestrar ferro iônico, prevenindo a formação de peróxidos lipídicos, danosos à membrana espermática (Wakabayashi et al., 1999). Outra proteína identificada em ovinos foi a clusterina, uma glicoproteína presente em inúmeros tecidos e fluidos fisiológicos, como o leite e o sêmen (Watts et al., 1990; Kounnas et al., 1995), tendo sido isolada, pela primeira vez, do fluido da *rete testis* de carneiros e tendo como função: interações intercelulares (Fritz et al., 1983), maturação espermática, regulação da ativação do sistema complemento (Jenne e Tschopp, 1989), metabolismo de lipídeos, secreção endócrina (Tenniswood et al., 1992) e remodelamento da membrana celular (Humphreys et al., 1999).

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

3. Método de estudo das proteínas seminais

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é o melhor método de separação e estudo das proteínas, separando-as através do peso molecular e do ponto isoeletrico, mas o método mais utilizado é o da eletroforese unidimensional do tipo SDS-PAGE, por ser uma alternativa mais barata e utilizada em estudos preliminares.

Além das análises de eletroforese existem outros métodos de estudo das proteínas como a purificação através dos diferentes tipos de cromatografias (afinidade, gel-filtração) e os equipamentos de cromatografia líquida (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Também pode utilizar a espectrometria de massa que determina as massas molares e podem mapear as interações moleculares (Cunha et al., 2006).

3.1. Eletroforese

Nas décadas de 1950 e 1960, a técnica de eletroforese começou a ser utilizada para mapear e identificar componentes protéicos solúveis no ejaculado (Larson e Salisbury, 1954). Segundo esses mesmos autores, inicialmente foi utilizada a eletroforese em soluções de sacarose a qual foi substituída pelos géis de amido (Szumowski, 1956), mas os melhores resultados foram obtidos na eletroforese em géis de poliacrilamida (Killian et al., 1993; Brandon et al., 1999).

A eletroforese tem sido utilizada como método de referência para o fracionamento e quantificação das proteínas séricas em bioquímica clínica (Kaneko, 1997), sendo também utilizada para purificar macromoléculas (proteínas e ácidos nucléicos) de diferentes tamanhos, carga ou conformação. Nela podemos observar

várias alterações que ocorrem nas frações protéicas nos vários estados fisiológicos e nas diversas enfermidades (Herz e Hod, 1969; Naoum, 1990).

Há um grande número de variáveis que influenciam o padrão eletroforético das proteínas, tais como: espécie, sexo, idade, manejo dos animais, condições ambientais, tipo de meio e técnicas utilizadas na eletroforese.

Os princípios da eletroforese estão baseados nos conhecimentos da composição química das proteínas e nos fatores como carga elétrica e peso molecular, que determinam sua migração eletroforética (Naoum, 1990), utilizando-se mais o SDS-PAGE (SDS-POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS). Esta técnica foi descrita por Laemmli em 1970, na qual as amostras são desnaturadas pelo calor, na presença de agentes que fazem essa função, como o beta-mercaptoetanol, que rompe as pontes de dissulfeto.

A eletroforese, em geral, ocorre dentro de uma matriz ou gel que é submerso em um tampão que possui íons para a corrente passar e manter o pH mais ou menos constante para que as moléculas migrem para o pólo positivo ou negativo devido ao campo elétrico, tendo as proteínas carga líquida negativa ou positiva (Figura 2).

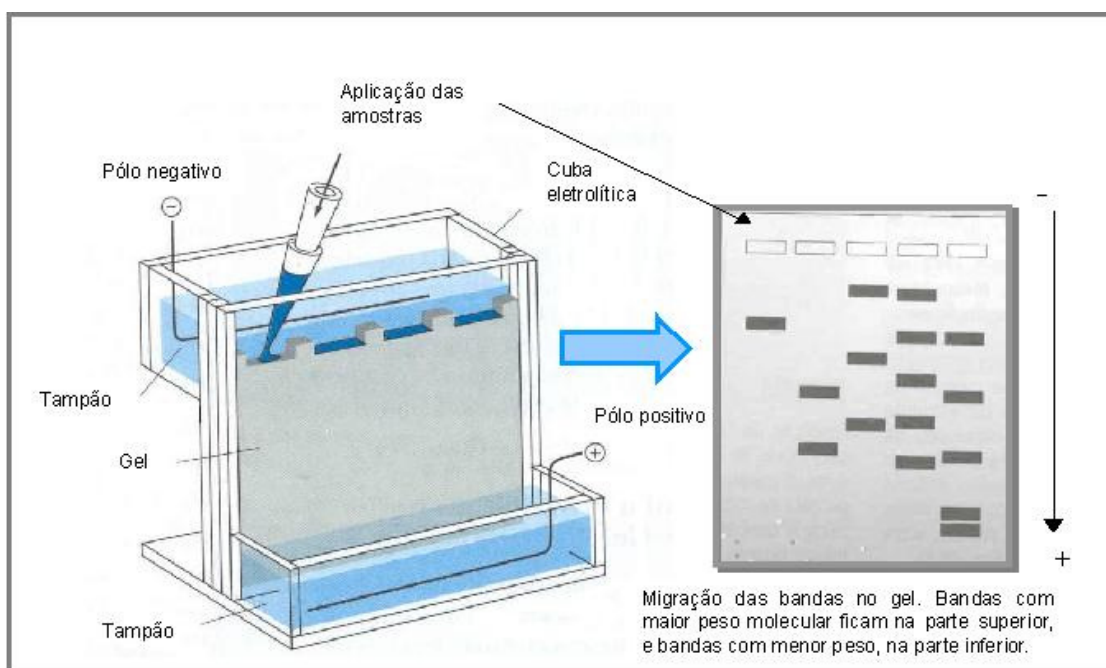


Figura 2. Representação esquemática de eletroforese.
(Embrapa, 2010)

Na avaliação das proteínas presentes no plasma seminal pela técnica de eletroforese unidimensional, as proteínas são separadas pelo seu peso molecular, enquanto que na avaliação pela técnica de eletroforese bidimensional, as proteínas são

separadas pelo peso molecular e ponto isoelétrico. Portanto, a técnica bidimensional possui a vantagem de separar proteínas com o mesmo peso molecular e potenciais isoelétricos diferenciados, facilitando a identificação de possíveis marcadores ligados à fertilidade e congelabilidade de sêmen em machos de diferentes espécies, como bovinos (Wolfe et al., 1993; Jobim et al., 2004), humanos (Autiero et al., 1991), equinos (Frazer e Bucci, 1996; Brandon et al., 1999).

Referências bibliográficas

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321- 337, 2005.

AL-SOMAI A. N.; VISHWANATH B.C. R., SHANNON B.; MOLA C.P. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull Sperm. **Reproduction Fertility Development**, v. 6, p.165-171, 1994.

ARAÚJO, A.A. **Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle**. Tours. L'Universite François-Rabelais de Tours. These de Doctorat. 200p, 2000.

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, p.14 191-200, 1991.

AURICH, J. E.; KÜNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma effects embrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p. 791-797, 1996.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑOBLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1531- 1537. 2000.

BARRIOS B. FERNANDEZ-JUAN, M.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **International Journal of Andrology**, v.27, 588–595, 2005.

BARRIOS B, FERNÁNDEZ-JUAN M, MUIÑO-BLANCO T, CEBRIÁN-PÉREZ JA. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **Journal of Andrology**, 26:539–49, 2005.

BRINSKO, S.P. Van Wagner, G. S.; Graham, J. K.; Squires EL. Motility, morphology, and triple stain analysis of fresh, cooled, and frozen-thawed stallion sperm. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, v.56, p.111- 120, 2000.

BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science**., v.76, p.2032-2039, 1998.

BERGERON A, VILLEMURE M, LAZURE C, MANJUNATH P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction Dev**. 71; 461-470. 2005.

BOISVERT M, BERGERON A, LAZURE C, MANJUNATH P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology Reproduction**. 70; 656-661. 2004.

BRANDON C.I., HEUSNER G.L., CAUDLE A.B. e FAYER-HOSKEN R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**. 52: 863-873, 1999.

BRAUNDMEIER, A.G., MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.84, p.1915-1925, 2001.

BROOKS DE, TIVER K. Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**. 69; 651-657. 1983.

CALVETE JJ, MANN K, SCHAFER W, RAID A, SANZ L, TÖPFER-PETERSEN E. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modification, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. **FEBS Lett** 365, 179-182. 1995a.

CALVETE, J. J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E.; TÖPFER- PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction Domestic Animal**, v. 29, p. 411-426, 1994.

CALVETE, J.J.; SANS, L.; DOSTALOVIA, Z; TOPFER-PETERSEN, E. Spermadhesins; sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. **Fertility**, v. 11 p. 35-40, 1995b.

CATUNDA, A.G.V. **Composição bioquímica do plasma seminal de caprinos sem padrão racial definido (SPRD) em clima tropical úmido**. 2007, 39p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

COUTO, A.F.A.d. Dimensionamento do Mercado de Carne Ovina e Caprina no Brasil. In: II Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte. **Anais...** João Pessoa, PB. p.71-81. 2003.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, 36, 40-46. 2006.

DACHEUX, J.L. M. Belghazi, Y. Lanson and F. Dacheux^a. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 36-42, 2006.

DACHEUX, J. L. e GATTI, J. L. Bases moleculaires du mouvement flagellaire. **Andrologie**. v.5, p.15-30, 1995.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Editorial Acribia. Zaragoza. 1980. 446p.

DOMINGUES, O. Carneiro deslanado de Morada Nova. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v.4, n.1, p.122, 1941.

DOMINGUES, O. Os carneiros deslanados de Morada Nova. **Revista de Agronomia**, v.9, n.3, p.257-259, 1950.

DOMINGUES, O. **Sobre a origem do carneiro deslanado no Nordeste**. Fortaleza: Seção de Fomento Agrícola do Ceará, 28 p. (Seção de Fomento Agrícola no Ceará. Publicação, 3). 1954.

EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. **Salamon Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1990. 191p.

FACÓ, O.; PAIVA, S. R.; ALVES, L. R. N.; LÔBO, R. N. B. e VILLELA, L. C. V. **Raça Morada Nova: Origem, características e perspectivas**. Documentos 75. Embrapa Caprinos e Ovinos. Sobral – CE, 2008.

FACÓ, O; LÔBO, R. N. B.; SILVA, J. R. F.; SOUSA, W. H. de; BOMFIM, M. A. D.; VILLELA, L. C. V. **Teste de desempenho individual de reprodutores da raça Morada Nova: resultados da prova em Morada Nova, CE-2008**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 27 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 91)

FERNANDES, A.A.O. Genetic and phenotypic parameter estimates for growth, survival and reproductive traits in Morada Nova hair sheep. Texas: Oklahoma State University, 1992. 183p. Tese Doutorado, 1992.

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

FIGUEIREDO, E. A. P. de. Morada Nova of Brazil. In: MASON, I. **Prolific tropical sheep**. Rome: FAO, 1980. p.53-58. (FAO Animal Production and Health Paper, 17).

FRAZER, G.S., BUCCI, D.M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v.46, p.1389– 1402, 1996.

FURMANSKI, P.H.J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. **Nature**, v.23, p.721-724, 1995.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431–444, 2005.

GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculat spermatozoa of the bull during the cryupreservation process. **Treriogenology**., v. 41,p. 1151-1162, 1994.

GRANATA, F.; PETRAROLI, A.; BOILARD, E.; BEZZINE, S.; BOLLINGER, J.; DEL VECCHIO, L.; GELB, M. H.; LAMBEAU, G.; MARONE, G.; TRIGGIANI, M.

Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. **Journal Immunology**, 174, 464-474. 2005.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri, SP: Manole. 513p. 2004.

HAFEZ, S.E. **Reprodução animal**. 7a. ed. São Paulo: Manole, , p. 335-42, 2000.

HERZ, A. E HOD, I. The albumin/alpha globulin ratio in various physiological states in cattle. **Brasilian Veterinary Journal**., v.125, p.326-329, 1969.

IBGE. **Censo agropecuário**, 2006. Disponível em: www.ibge.gov.br/.../agropecuaria/censoagro/default.shtm Acesso em: 09 ago 2010.

JALKANEN J, HUHTANIEMI I, POUTANEN M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. **Biology Reproduction**. 72; 1268-1274. 2005.

JENNE, D.E., TSCHOPP, J. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytolysis inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein-2, a constituent of rat testis fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.7123-7127, 1989.

JIN, Y.Z. BANNAI, S; DACHEUX, F; DACHEUX, J.L; OKAMURA, N. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 490-496, 1997.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.61, p.255-266, 2004

JONAKOVA, V.; MANASKOVA P.; TICHA, M. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, p. 307-314, 2007.

KILLIAN GJ, CHAPMAN DA, ROGOWSKI L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**, v.49, p1202-7, 1993.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNA, B.; PEKNIKOVA, J.; JONAKOVA, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**. v.65, p. 33-46, 2005.

KANEKO J.J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS M.L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th edn. San Diego: Academic Press, p.317-367. 1997.

KOUNNAS, M.Z. *et al.* Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, p.13070-13075, 1995.

LARSON BL, SALISBURY GW. The proteins of bovine seminal plasma. Preliminary and electrophoretic studies. **Journal Biology Chemical**, v.206, p.741-749, 1954.

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

LEBOEUF, B. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.

MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 179- 188, 1974.

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

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

MANJUNATH P, CHANDONNET L, LEBLOND E, DESNOYERS L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology Reproduction**. 49, 27–37. 1993.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I.; Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal Reproduction Immunology**, 53, 109-119. 2002.

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. **Fertility Steril.**, v. 53,n. 3, p. 541-545,1990.

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

MASON, I. L. **Straightening Agricultural Research in Brazil**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1979. 30 p. Final Report presented to the Interamerican Institute of Agricultural Sciences

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.

McCOULEY, T.O.C., BELLIN, M.E.O., AX, R.L. Localization of a heparin-binding protein to distinct region of bovine sperm. **Journal Animal Science**, v. 74, p. 429-38, 1997.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. Porto Alegre, Sulina. 6ed. v. 2. 750p, 1987.

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

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

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN GJ. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.27, p.201–211, 2006a.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, 2006.

NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Livraria Santos, 1990. 174p.

NOZAKI, A. et al. Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C. **Nippon Rinsho**, v.60, p.819-829, 2002.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, 66, 307-313. 2006.

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

PILCH, B.; MANN, M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. **Genome Biology**, 7, 1-10. 2006.

POLAKOSKI, K. L.; KOPTA, M. **Seminal Plasma**. In: ZANEVELD, L. J. D.; CHATTERTON, R. T. (org). **BIOCHEMISTRY OF MAMMALIAN REPRODUCTION**. Wiley Interscience Publicações, p. 89–117. 1982.

POSADAS, I. C. **Estudio del plasma seminal y la espermadhesina PSP-I/PSP-II sobre la funcionalidad de los espermatozoides de verraco**. Tese de Doutorado. Faculdade de Veterinária-Universidade de Murcia. XXp, 2007

REINERT M, CALVETE JJ, SANZ L, MANN K, TÖPFER-PETERSEN E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **Europe Journal Biochemical**. 242; 636-640. 1996.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSSON, B. E PERTOFT, H. Evulation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p 297-308, 1997.

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

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

RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA. 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.135-140, 1997.

SAALMANN A, MUNZ S, ELLERBROCK K, IVELL R, KIRCHHOFF C. Novel spermbinding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. **Molecular Reproduction Dev**. 58; 88-100. 2001.

SANCHEZ-LUENGO, S.; AUMULLER, G.; ALBRECHT, M.; SEN, P. C.; ROHM, K.; WILHELM, B. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. **Journal Andrology**, 25, 234-244. 2004.

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

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; LIMA, A. C. B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p.196-198, 2001.

SOUZA, W.H. de; LÔBO, R.N.B.; MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: Estado de Arte e Perspectivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2003. p. 501 - 522. CD-ROM. 2003.

STRZEÝEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P.; TYSKIEWICZ, A.; JASTRZEBSKI. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports** 22, 255 – 266, 2002.

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

TEDESCHI G, OUNGRE E, MORTARINO M, NEGRI A, MAFFEO G, RONCHI S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. **Europe Journal Biochemical**. 267; 6175-6179. 2000.

TENNISWOOD, M. P. et al. Active cell death in hormone-dependent tissues. **Cancer Metastasis Reviews**, v.11, p.197-220, 1992.

THALER, C. J.; VANDERPUYE, O. A.; MCINTYRE, J. A.; FAULK, W. P. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.43, p.712-717, 1990.

THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1999.

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

TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v.58, p.453-456, 2002.

UDBY L, BJARTELL A, MALM J, EGESTEN A, LUNDWALL A, COWLAND J, BORREGARD N, KJELDSSEN L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. **Journal Andrology**. 26; 333-342. v.32, p.455-466, 2005.

VARELA PF, ROMERO A, SANZ L, ROMAO MJ, TÖPFER-PETERSEN E, CALVETE JJ. The 2,4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP- I: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **Journal Molecular Biology**. 274; 635-649. 1997.

VILLEMURE M, LAZURE C, MANJUNATH P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproduction Biology Endocrinology** 1; 39. 2003.

WAKABAYASHI, H.; Matsumoto, H.; Hashimoto, K.; Teraguchi, S.; Takase, M.; Hayasawa, H. et al. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, v.63, p.955-957, 1999.

WATTS, M. J.; DANKER, J. R.; MORGAN, E. P. Characterization of the active site of human multicatalytic proteinase. **The Biochemical Journal**, v.265, p.471-477, 1990.

WAY, A. L., GRIEL JR, L. C. E KILLIAN. G. J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**. 21: 213-219. 2000.

WEMPE F, EINSPANIER R, SCHEIT KH. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal fluid protein. **Biochemical Biophys Res Commun.** 183; 232-237. 1992.

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.

YUAN, Y. Y.; CHEN, W. C.; SHI, Q. X.; MAO, L. M.; YU, Q.; FANG, X.; ROLDAN, E. R. S. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology Reproduction**, 68, 904-913. 2003.

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

CAPÍTULO 2

ESTUDO PRELIMINAR DA DISTRIBUIÇÃO E DA FREQUÊNCIA DAS BANDAS PROTEICAS DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS MORADA NOVA

RESUMO

O uso da biologia molecular na área da reprodução animal insere novas ferramentas para o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal. O estudo do plasma seminal, através de sua bioquímica, tem recebido considerável atenção por diversos motivos, seja por influenciar a fertilidade potencial do espermatozóide ou por participar ativamente de várias reações destes. A raça de ovinos Morada Nova é uma raça adaptada às condições edafoclimáticas da região semiárida do Nordeste, mas vem diminuindo gradativamente o seu rebanho devido à cultura por parte dos produtores a trabalharem com animais exóticos e de maior porte. Trabalhos relacionados a essa raça ainda são escassos, logo, a caracterização das proteínas seminais destes animais nos permitiu identificar como estas se apresentam, observando-se os valores máximos e mínimos dos pesos moleculares destas proteínas. Foram utilizados 14 reprodutores ovinos da raça Morada Nova de diversas localidades da região semiárida do Ceará, onde se analisou as bandas protéicas através de eletroforese unidimensional SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida a 12,5%, corados por Comassie Blue. Foram encontradas em 100% das amostras quatro bandas protéicas com os respectivos pesos moleculares 14, 20, 22 e 55 kDa. Sendo as bandas de 14 e 55 kDa já identificadas em outras espécies como as espermadesinas e a osteopontina, respectivamente. Neste estudo 12 dos 14 animais apresentaram a banda de peso molecular 66 kDa, identificada por outros autores como a albumina. As proteínas de peso molecular 33, 50, 52 e 115 kDa foram as que apresentaram menor frequência, aparecendo cada uma em animais diferenciados. Este trabalho permitiu a visualização e distribuição das bandas protéicas e a variação do peso molecular das mesmas em animais da raça Morada Nova, dando suporte a estudos posteriores sobre proteômica seminal.

Palavras-chave: eletroforese unidimensional, peso molecular, proteína seminal.

ABSTRACT

The use of molecular biology in the area of animal reproduction inserted new tools for genetic improvement through the use of biochemical markers in body fluids to demonstrate the genetic potential of an animal. The study of seminal plasma, by their biochemistry, has received considerable attention for various reasons, either to influence fertility potential of sperm or to participate actively in several of these reactions. The Morada Nova breed of sheep is a breed adapted to the ecological conditions of the semiarid region of Northeast, but has gradually diminished due to his flock culture for producers to work with exotic animals and larger. Work related to that breed are scarce, so the characterization of seminal proteins identified in these animals as they present themselves, observing the maximum and minimum values of molecular weights of these proteins. We used 14 players Morada Nova sheep from several localities in the semiarid region of Ceará, where the protein bands was analyzed by electrophoresis dimensional SDS-PAGE on polyacrylamide gels or 12.5%, stained with Comassie Blue. 100% were found in four samples of protein bands with their molecular weights 14, 20, 22 and 55 kDa. Since the bands of 14 and 55 kDa as identified in other species such as spermadhesins and osteopontin, respectively. In this study 12 of the 14 animals showed a band of molecular weight 66 kDa, identified by other authors such as albumin. The proteins of molecular weight 33, 50, 52 and 115 kDa showed the lowest frequency, appearing each in different animals. This work allowed the visualization and distribution of protein bands and molecular weight variation of the same animals in Morada Nova, supporting further study of seminal proteomics.

Keywords: dimensional electrophoresis, molecular weight, seminal protein.

INTRODUÇÃO

A raça Morada Nova é uma raça nativa de ovinos deslanados do Nordeste, sendo adaptada as condições climáticas do semiárido (Souza et al., 2003) e fonte de proteína para as populações rurais (Fernandes, 2001). Esta raça, embora apresente particularidades importantes do ponto de vista reprodutivo e produtivo nas condições onde habita, não está despertando interesse dos criadores, devido à cultura existente por animais de maior porte, levando à retração do rebanho da região. Em vista disso, pesquisadores e instituições de fomento estão procurando investir em pesquisas de caracterização da raça através de estudos da genômica e da proteômica, visando identificar marcadores de interesse econômico para a produção.

Em algumas práticas de manejo reprodutivo é importante que se faça alguma distinção entre os fatores que afetam as características do sêmen, sendo a qualidade e a quantidade do sêmen fatores determinantes na reprodução dos machos (Perez e Mateos, 1996).

Muitas são as evidências da importância do plasma seminal no processo de reprodução (Frazer e Bucci, 1996; Wolfe et al., 1993; Autiero et al., 1991), sendo também relacionadas a fatores de infertilidade em equinos (Brandon et al., 1999) e suínos (Jonakova et al., 2007).

O estudo das proteínas seminais vem se sobressaindo como ferramenta na avaliação de animais para reprodução, uma vez que as proteínas oriundas das glândulas acessórias desempenham importante papel no processo de fertilização, o que tem despertado o interesse em muitos pesquisadores (Roncoletta, 1999; Kowalski et al., 2003; Lahnsteiner et al., 2004).

Associações entre marcadores protéicos, fertilidade e resistência espermática à criopreservação vêm sendo estudadas em humanos (Autiero et al., 1991), bovinos (Wolfe et al., 1993; Killian et al., 1993; Bellin et al., 1998; Jobim et al., 2004), caprinos (Villemure et al., 2003), ovinos (Barrios et al., 2000), equinos (Frazer e Bucci, 1996; Brandon et al., 1999) e bubalinos (Asadpour et al., 2007). No entanto, são poucos os estudos focados entre essas associações na espécie ovina, em especial aos ovinos da raça Morada Nova.

Este trabalho teve como objetivo identificar o perfil das bandas protéicas do plasma seminal dos ovinos Morada Nova no semiárido do Nordeste.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização dados climatológicos

O experimento foi realizado na fazenda sede da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, Ceará, na região semiárida do Nordeste, à 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros. Os solos são do tipo Bruno não-cálcico e lotólico, cobertos por uma vegetação de caatinga sucessional, hiperxerófila, com árvores de porte pequeno a médio. Segundo a classificação climática de Köppen, a região possui um clima do tipo AW de savana caracterizado por uma estação seca que vai de julho a dezembro e uma chuvosa de janeiro a junho, com uma precipitação média de 758,8 mm, temperatura média anual é de 30°C, com médias, mínima e máxima, de 22°C e 35°C, respectivamente, e umidade relativa do ar de 69% (Funceme, 2009).

Teste de desempenho individual de reprodutores

As provas zootécnicas de desempenho individual de reprodutores estão descritas na série de documentos 91 da Embrapa Caprinos e Ovinos, onde consistiu na submissão de um grupo de animais machos, oriundos de diversos rebanhos, às mesmas condições ambientais, para identificação dos indivíduos superiores por meio de suas diferenças genéticas. No início da prova os animais foram inspecionados quanto ao aspecto sanitário, zootécnico, peso e idade, sendo vermifugados e recebendo suplemento vitamínico injetável (ADE). O peso corporal, o perímetro escrotal, a altura de cernelha, a largura de peito, a largura de garupa, o comprimento de garupa, o comprimento corporal, a profundidade corporal, o perímetro torácico e o escore corporal (ECC), avaliado com notas subjetivas de 1 a 5, foram tomados no início e no final da prova. Para a classificação final dos animais, foi utilizado um índice que considerava o ganho de peso médio diário durante a prova (GPMD), a área de olho de lombo (AOLp = AOL / Peso Final^{0,75}) e o perímetro escrotal final (PEp = PE / Peso Final^{0,75}), ponderados pelo peso metabólico, a espessura de gordura (EG) e o somatório dos escores visuais (EV) (Facó et al., 2009).

Animais e colheita de sêmen

Para a análise preliminar da distribuição das bandas protéicas foram utilizados 14 reprodutores de diversas propriedades da região semiárida do Nordeste, com idade variando de 18 a 21 meses e submetidos a regime de criação intensivo, recebendo volumoso no cocho e 200g de concentrado duas vezes ao dia.

Foi realizada uma coleta de sêmen através de vagina artificial, utilizando-se uma fêmea estrogenada (Cipionato de estradiol) como manequim, em dezembro/08.

Avaliação seminal

Foram avaliados as seguintes variáveis: aspecto, volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva individual (0,0-100%), vigor (0-5) e concentração espermática ($\times 10^6 \text{ mm}^3$) do sêmen.

Quantificação de proteínas totais

Para análise das proteínas totais, o sêmen colhido foi centrifugado por 30 minutos a 1.500g em temperatura de 4°C para obtenção do plasma seminal, sendo o sobrenadante recentrifugado por 60 minutos a 10.000g à temperatura de 4°C para retirada de fragmentos de células.

O plasma foi aliquoteado, sendo uma parte destinada a mensuração da proteína total, através de espectrofotometria, e a outra acondicionada em tubos de eppendorff, mantidos congelados a -18°C para realização da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) a 12,5% de separação e 12% de compactação.

O plasma destinado à quantificação de proteínas totais foi submetido à técnica descrita por Bradford (1976), que se baseia na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G250 às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro FP-901 (Chemistry Analyser Labsystems) pelo método de absorbância que representa a quantidade de luz que é absorvida, sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e usando-se como

padrão a Albumina Sérica Bovina (BSA) em diferentes concentrações servindo como base para a curva de concentração x absorbância.

Eletroforese unidimensional

Para preparação das amostras de plasma utilizou-se 200 µg de proteína total do plasma seminal que foi diluída ao tampão de amostra, ficando uma concentração final de 2 µg/µL. O gel utilizado tinha dimensão de 10 x 8 cm onde colocou-se 15 µL da amostra do plasma em cada “poço” da placa de gel, sendo utilizado como padrão o kit LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION da Pharmacia Biotech., que apresenta as seguintes bandas de massas moleculares: 94 (Fosforilase B); 67 (Albumina Sérica Bovina); 43 (Ovalbumina); 30 (Anidrase Carbônica); 20,1 (Inibidor de Tripsina) e 14,4 kDa (Alpha-lactoalbumina). A eletroforese foi conduzida por uma corrente elétrica de 1A, 170 volts e 10 wats, por aproximadamente 2 horas.

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 por aproximadamente duas horas e descorados com etanol (30%) e ácido acético (7,5%), por aproximadamente duas horas, sob agitação constante. Para captura da imagem esses géis foram escaneados e analisados usando-se o software Bio Doc-IT-LS[®] 6.0 and VisiDoc-It, Gel Documentation System da UVP, o qual determina a densidade óptica das bandas protéicas expressa em pixels e quantifica em percentagem relativa ao total da amostra.

Para a secagem dos géis, os mesmos foram colocados entre duas folhas de papel celofane, hidratadas com solução de secagem contendo etanol (10%) e glicerol (2,5%) sobre uma placa de vidro, em temperatura ambiente por 24 horas.

Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva da presença das bandas de massa molecular encontradas nos géis de eletroforese e teste T de Student para comparação das médias das características espermáticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as médias dos 14 animais para motilidade progressiva (82%) e vigor (3,5) foram superiores as médias referenciadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), já o valor médio do volume do ejaculado (0,8 mL), mostrou-se inferior e o da concentração espermática ($5,14 \times 10^6$ spz/mL) dentro dos limites de referência, não havendo diferença estatística ($P>0,05$) entre os animais estudados com relação a esses aspectos avaliados. O valor médio da proteína total foi de 15,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ variando de 9,55 a 22,37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Souza et al. (2002) encontraram em carneiros pós-púberes valor médio de 19,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Os géis de eletroforese unidimensional SDS-PAGE, mostraram que houve uma diferença na distribuição das bandas protéicas entre os animais, onde o peso molecular delas variaram de 14 a 125 kDa. Também foi observado que o número de bandas diferiu entre os animais (11-16 bandas), apesar de serem da mesma raça, com idades aproximadas e criados em um mesmo sistema (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência das bandas protéicas presentes nos géis de eletroforese dos ovinos da raça Morada Nova distribuídas de acordo com o seu peso molecular.

kDa	Animais													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
21		42,8	42,8	42,8	42,8					42,8	42,8			
23	21,4							21,4	21,4					
24						57,1	57,1	57,1	57,1	57,1	57,1	57,1	57,1	57,1
26						42,8	42,8				42,8	42,8	42,8	42,8
38	57,1	57,1	57,1			57,1	57,1	57,1		57,1	57,1			
42	71,4	71,4	71,4	71,4	71,4			71,4	71,4	71,4	71,4			71,4
45					28,6			28,6					28,6	
48	28,6	28,6	28,6							28,6				
60		78,6	78,6	78,6	78,6	78,6	78,6	78,6	78,6			78,6	78,6	78,6
66	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7			85,7	85,7	85,7	85,7	85,7
72				28,6					28,6		28,6	28,6		
77	57,1	57,1		57,1	57,1	57,1	57,1					57,1	57,1	
80	42,8		42,8					42,8	42,8	42,8		42,8		42,8
90		35,7	35,7		35,7	35,7							35,7	
96	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7		85,7	85,7		85,7	85,7	85,7
118						21,4	21,4				21,4			
122						28,6	28,6						28,6	28,6
125												14,3	14,3	
Total	13	14	14	13	13	16	15	12	11	12	12	15	15	12

Observou-se a presença das bandas de peso 14, 20, 22 e 55 kDa presentes em 100% dos animais avaliados. Jobim et al. (2003) relacionou uma proteína de 14 kDa a manutenção da motilidade espermática em caprinos e Villemure et al. (2003) a

identificou proteína semelhante, chamada de GSP-4 (Goat Seminal Plasma Proteins), é responsável por ligar a membrana espermática durante o transito epididimário atuando na capacitação espermática dessa espécie. Estes mesmos autores identificaram mais três proteínas no mesmo grupo das GSPs com pesos de 15, 20 e 22 kDa, sendo estas homólogas às BSP (Bovine Seminal Plasma Proteins), sugerindo-se uma possível atividade biológica comum entre os mamíferos.

Barrios et al. (2000) afirmaram que a banda de 20 kDa encontrada em seu experimento poderia ser responsável pela reconstituição das características de permeabilidade da membrana do espermatozóide. A banda de 55 kDa foi identificada por diversos autores como sendo a osteopontina (Cancel et al. 1997; Killian et al., 1993; Frazer e Bucci, 1996). Em búfalos uma proteína com esse peso molecular foi relacionada à viabilidade do sêmen fresco (Asadpour et al., 2007) e em touros a alta fertilidade (Killian et al., 1993). De acordo com Moura (2005), esta proteína participa também na interação entre espermatozóides e oócito durante a fertilização.

Oberst et al., (2002) identificou uma banda protéica de massa molecular de 66 kDa, como sendo a albumina, envolvida com a extração do colesterol da membrana plasmática que irá ocorrer em áreas restritas da membrana, promovendo um deslocamento dos fosfolipídeos causando um re-arranjo de sua arquitetura (Flesch e Gadella, 2000). Neste experimento 85,7% dos animais apresentaram uma banda de massa molecular de 66 kDa. Em ovinos e suínos onde o nível de colesterol é baixo esse evento ocorre de forma mais acelerada que em humanos e bovinos, onde a membrana plasmática é rica em colesterol. Devido a isso, ocorre uma variação no tempo de capacitação espermática, verificando-se a necessidade de um maior tempo nas espécies com altos níveis de colesterol na membrana (Flesch e Gadella, 2000).

A proteína de massa molecular de 26 kDa foi encontrada em 42,8% dos animais avaliados nesse experimento. Uma proteína de mesmo peso molecular (26 kD) foi relacionada a alta fertilidade de touros por Killian et al. (1993), já Bianchi et al. (2008) a relacionou a baixa integridade da membrana plasmática em suínos após a descongelação do sêmen e Jobim (2003) encontrou essa proteína em bovinos portadores de baixa congelabilidade. Essa proteína também foi identificada por Roncoletta (1999), a qual apresentou quantidade significativamente superior no plasma seminal de bovinos com melhor congelabilidade do sêmen (Roncoletta et al., 2000).

As bandas que apresentaram menor frequência foram as de 33, 50, 52 e 115 kDa (Figura 1), sendo estas identificadas cada uma em animais distintos, devendo ser

estudadas futuramente. Uma banda de massa molecular de 52 kDa já foi identificada no plasma seminal humano como sendo a seminogelina 1, principal componente da coagulação do plasma seminal, expressa exclusivamente nas vesículas seminais, sendo sugerida por Robert e Gagnon (1999), como um inibidor fisiológico da motilidade espermática, pois em seus trabalhos ela se mostrou idêntica ao fator de inibição da motilidade.

A banda de 33 kDa foi encontrada no animal que obteve o menor valor de motilidade (50%), sendo essa abaixo dos valores preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), que tem como média uma motilidade de 75%. Provavelmente, essa proteína esteja associada à diminuição da motilidade espermática devendo ser estudada posteriormente.

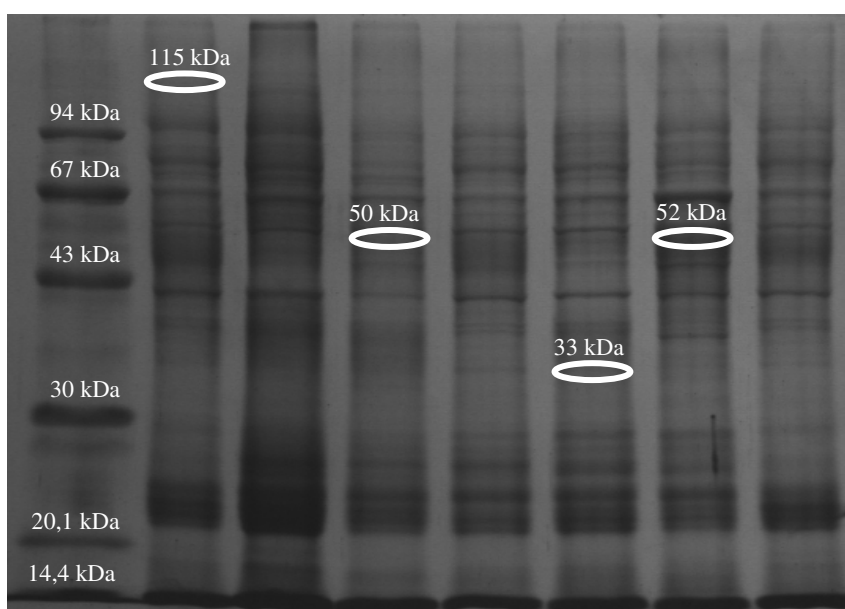


Foto: Nadiana Mendes

Figura 1. Gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova, onde as bandas circuladas são as que se expressaram individualmente nos animais estudados.

CONCLUSÕES

Os ovinos da raça Morada Nova apresentam uma variação na distribuição e frequência das bandas protéicas entre os animais. Essas bandas provavelmente sofrem interferência do fator animal em sua expressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p.14 191-200, 1991.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑOBLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. **Biology of Reproduction**, Augusta, v.63, p. 1531- 1537. 2000.

BELLIN, M. E., OYAORSO, J. N., HAWNKINS, H.E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science**, v. 76, p.2023 -9, 1998.

BIANCHI, I; CALDERAM, K.; MASCHIO, E. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; CORCINI, C. D.; BONGALHARDO, D. C.; CORREA, E. K.; LUCIA Jr. T.; DESCHAMPS, J. C.; CORREA, M. N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 632-638, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDON, C. I., HEUSNER, G. L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p. 863-873, 1999.

CANCEL, A.M., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction.**, v. 57, n.6, p. 1292-301, 1997.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 49p, 1998.

FACÓ, O; LÔBO, R. N. B.; SILVA, J. R. F.; SOUSA, W. H. de; BOMFIM, M. A. D.; VILLELA, L. C. V. **Teste de desempenho individual de reprodutores da raça Morada Nova:** resultados da prova em Morada Nova, CE-2008. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 27 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 91), 2009.

FERNANDES, A. A. O.; BUCHANAN, D.; SELAIVE-VILLAROEL, A. B. Avaliação dos fatores ambientais no desenvolvimento corporal de cordeiros desmamados da raça Morada Nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1460-1465, 2001.

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

FRAZER, G.S., BUCCI, D.M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v.46, p.1389– 1402, 1996.

FUNCEME. **Monitoramento**. Disponível em: <www.funceme.br> Acesso em: 27 nov 2009

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

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.61, p.255-266, 2004

JONAKOVA, V.; MANASKOVA P.; TICHA, M. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, p. 307-314, 2007

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

KOWALSKI, R.; GLOGOWSKI, J.; KUCHARCZYK, D.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; CIERESZKO A. Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts. **Journal Fish Biology**, 63, 1008-1019. 2003.

LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N., BERGER, B., Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p. 801-808. 2004.

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

OBERST E. R.; Jobim, M. I. M.; Cimarosti, H. I. Souza, D. O.; Salbego, C. G.; Wald, V. B; Mattos, R. C. ET AL..Imunoidentificação de albumina e osteopontina no plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, n.1, p. 21-28, jan/jun. 2002

PEREZ, B.; MATEOS, E. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguena breeds. **Small Ruminant Research**, v. 22, p. 163-168, 1996.

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

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

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Características reprodutivas, concentrações de proteínas seminais e testosteronemia de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida. **Anais...VI Reunião Regional da SBBq – Nordeste**. 2002

SOUZA, W.H. de; LÔBO, R.N.B.; MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: Estado de Arte e Perspectivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., **Anais...** João Pessoa. p. 501 - 522. CD-ROM. 2003.

VILLEMURE M, LAZURE C, MANJUNATH P. Isolation and characterization of gelatinbinding proteins from goat seminal plasma. **Reproduction Biology Endocrinology** v. 1; p39. 2003

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.

CAPÍTULO 3

RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E BANDAS PROTÉICAS DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS MORADA NOVA COM AS VARIÁVEIS METEOROLÓGICAS

RESUMO

As mudanças de estação do ano afetam tanto a qualidade quanto a quantidade de sêmen, como também a presença das proteínas seminais, em especial nas regiões temperadas, tendo em vista a influência da variação do dia/luz que afeta os hormônios da reprodução. No entanto, não existem relatos sobre a influência das variáveis meteorológicas como temperatura ambiente, umidade do ar e precipitação sobre a expressão das proteínas seminais na espécie naturalizada Morada Nova na região semiárida do Brasil. Portanto, investigar a interação destes parâmetros com as características espermáticas e a expressão das proteínas do plasma seminal ao longo do ano foi objeto deste trabalho. O sêmen foi coletado, semanalmente, de quatro machos adultos da raça Morada Nova, no período de outubro/2008 a setembro/2009, perfazendo um total de 192 amostras, as quais foram submetidas à avaliação espermática. A concentração espermática foi a variável influenciada ($P < 0,05$) pela época do ano, pelo indivíduo, pela interação estação vs reprodutor e pela data da coleta. Verificou-se correlação significativa ($P < 0,05$) entre os parâmetros seminais e meteorológicos durante o dia e o mês. Ao se analisar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal pode-se observar um total de 44 proteínas diferenciadas, sendo 29 proteínas menores que 50 kDa e 15 proteínas maiores que 50 kDa, variando seus pesos moleculares de 12 a 135 kDa. Houve uma variação de 7 a 28 bandas em cada animal ao longo do ano. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os períodos seco e chuvoso quanto a manifestação de determinadas bandas protéicas. Comparando-se os animais, a banda de massa molecular de 75-80 kDa apresentou maior frequência ($P < 0,05$) em um deles. Concluiu-se que, mesmo tratando-se de uma raça naturalizada, as características espermáticas e a expressão das bandas protéicas da raça Morada Nova sofreram influência dos parâmetros meteorológicos na região semiárida do Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: características seminais, eletroforese unidimensional, peso molecular, proteína seminal

ABSTRACT

The changes of season affect both the quality and quantity of semen, as well as the presence of seminal proteins, especially in temperate regions, in view of the influence of variation of day-light that affects the reproductive hormones. However, there are no reports on the influence of meteorological variables as temperature, humidity and rainfall on the expression of proteins in the seminal New Address naturalized species in the semiarid region of Brazil. Therefore, to investigate the interaction of these parameters and sperm characteristics and expression of seminal plasma proteins over the years has been the subject of this work. Semen was collected weekly, four adult males Morada Nova, from October/2008 to September/2009 a total of 192 samples, which were evaluated for sperm. The sperm concentration was the variable influence ($P < 0.05$) by season, by individual, by season vs player interaction and the collection date. There was a significant correlation ($P < 0.05$) between semen parameters and weather during the day and month. When analyzing the electrophoretic profile of seminal plasma proteins can be observed a total of 44 different proteins, 29 proteins smaller than 50 kDa and 15 kDa proteins larger than 50, their molecular weights ranging from 12 to 135 kDa. There was a variation from 7 to 28 bands in each animal throughout the year. Significant difference ($P < 0.05$) between dry and rainy seasons as the manifestation of certain protein bands. Comparing the animals, the band of molecular mass of 75-80 kDa showed a higher frequency ($P < 0.05$) in one. It was concluded that, even in the case of a naturalized race, the sperm characteristics and the expression of protein bands Morada Nova influenced meteorological parameters in the semiarid region of northeastern Brazil.

Keywords: seminal characteristics, one-dimensional electrophoresis, molecular weight, seminal protein

INTRODUÇÃO

Ao se trabalhar com animais na região semiárida é importante escolher raças adaptadas às características da região, devendo ser fundamental levar em consideração o fator climático, pela sua vulnerabilidade às alterações do clima, com períodos irregulares de chuva e secas prolongadas, que são intensificados pelas elevadas temperaturas do ar, altos níveis de insolação e evaporação e, durante o período seco, pela baixa umidade relativa do ar (Santos et al., 2005). Nesse contexto, a raça Morada Nova é uma das principais raças nativas de ovinos deslanados do Nordeste do Brasil, dotada de alto grau de adaptabilidade ao ambiente quente, sendo animais resistentes, de fácil manejo e que podem viver com facilidade em regiões do semiárido (Cunha et al, 2008).

A qualidade do sêmen determina a eficiência reprodutiva masculina durante o ano, podendo variar de acordo com a raça, localização geográfica e época do ano (Karagiannidis et al., 2000). Este último fator já foi relatado por Barkawi et al. (2006) por exercer forte influência na qualidade do sêmen de caprinos, aumentando a concentração dos compostos bioquímicos do plasma seminal entre as épocas seca e chuvosa (Pinheiro et al., 1996)

Vários autores identificaram alguns problemas reprodutivos relacionados à época seca em pequenos ruminantes como Texel, Suffolk, Ile de France (Mandiki et al., 1998), e Zaraibi (Barkawi et al., 2006). Pesquisas têm demonstrado que elevadas temperaturas ambientais podem interferir negativamente na qualidade espermática de ruminantes, sendo a motilidade individual progressiva e o percentual de células morfollogicamente anormais as características seminais mais afetadas (Kraemer, 2000; Valle et al., 2005).

Aliado às características espermáticas, o estudo das proteínas seminais vem sendo objeto de estudo, tendo em vista sua maior concentração no plasma seminal em relação aos outros componentes e, por participarem ativamente do processo de fecundação (Bellin et al., 1998). Estudos têm mostrado que em clima temperado essas proteínas sofrem influência em sua expressão ao longo do ano, podendo interferir assim nos processos de fertilização (Souza, 2007).

O aumento da temperatura ambiente acima daquela considerada crítica máxima para o animal pode desencadear reações ou respostas fisiológicas, tais como: aumento

da temperatura retal, temperatura da superfície da pele e frequência respiratória, ocorrendo diminuição do nível de produção e ingestão de alimentos (Lu 1989).

O estresse calórico é um importante fator que limita o desenvolvimento dos ovinos na expressão do potencial genético de produção. As limitações à produção em áreas tropicais podem ser ocasionadas pelos quatro principais elementos ambientais estressantes: temperatura do ar, umidade do ar, radiação do sol e velocidade do vento (Barbosa e Silva, 1995). Portanto, a interação entre animal e ambiente deve ser levada em consideração quando se busca maior eficiência na exploração pecuária, pois o conhecimento das variáveis climáticas, sua ação sobre as respostas comportamentais e fisiológicas dos animais, são essenciais na adequação do sistema de produção aos objetivos da atividade pecuária (Neiva et al., 2004).

Objetivou-se neste trabalho estudar a influência dos parâmetros meteorológicos nas características espermáticas e na expressão das bandas protéicas em ovinos Morada Nova na região Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização dados climatológicos

O experimento foi realizado na fazenda sede do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, Ceará, na região semiárida do Nordeste, à 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros, caracterizado por uma estação seca que vai de julho a dezembro e uma chuvosa de janeiro a junho, com uma precipitação média de 758,8 mm, temperatura média anual é de 30°C com médias mínima e máxima de 22°C e 35°C, respectivamente, e umidade relativa do ar de 69% (Funceme, 2009).

Os períodos do ano foram divididos entre seco e chuvoso de acordo com os dados climatológicos médios de temperatura, umidade e precipitação, obtidos pelo INMET (2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados referentes à temperatura (°C), Umidade (%) e Precipitação pluviométrica (mm) de outubro de 2008 a setembro de 2009 na região semiárida do Nordeste.

Período	Mês	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
Seco	out/08	29,09	55,7	0
	nov/08	30,89	49,9	1,8
	dez/08	31,27	49,4	0,2
	jan/09	29,37	61,6	1,4
	set/09	28,1	62,0	0,2
	Ago/09	26,5	69,7	15,2
Chuvoso	Fev/09	26,4,	79,9	137
	mar/09	25,3	87,6	237
	abr/09	25,5	87,5	273,2
	mai/09	25,4	87,8	227
	jun/09	25,2	85,2	54,2
	Jul/09	25,2	80,2	34,2
Média		27,4	71,4	981,4
INMET, 2010				

Animais, colheita de sêmen, avaliação clínica e seminal

Foram selecionados quatro reprodutores da raça Morada Nova com idade variando de 18 a 21 meses, dentre os animais aprovados pelo teste de desempenho, provenientes de diversas propriedades da região. Estes animais encontravam-se nas mesmas condições ambientais visando identificar indivíduos superiores através das diferenças genéticas. No início da prova os animais foram inspecionados quanto ao aspecto sanitário, zootécnico, peso e idade, sendo vermifugados e recebendo suplemento vitamínico injetável (ADE). O peso corporal, o perímetro escrotal, a altura de cernelha, a largura de peito, a largura de garupa, o comprimento de garupa, o comprimento corporal, a profundidade corporal, o perímetro torácico e o escore corporal (ECC), avaliado com notas subjetivas de 1 a 5, foram tomados no início e no final da prova. Para a classificação final dos animais, foi utilizado um índice que considerava o ganho de peso médio diário durante a prova (GPMD), a área de olho de lombo ($AOLp = AOL / \text{Peso Final}^{0,75}$) e o perímetro escrotal final ($PEp = PE / \text{Peso Final}^{0,75}$), ponderados pelo peso metabólico, a espessura de gordura (EG) e o somatório dos escores visuais (EV) (Facó et al., 2009).

A idade dos animais selecionados variou de 18 a 21 meses, os quais foram submetidos a regime de criação intensivo, recebendo volumoso (*Pennisetum purpureum Schum*) cortado, 200g de concentrado e sal mineral no cocho duas vezes ao dia.

O sêmen foi colhido, semanalmente, em vagina artificial, utilizando-se uma fêmea estrogonada (Cipionato de estradiol) como manequim, no período de outubro/2008 a setembro/2009.

Na avaliação clínica, verificou-se a frequência cardíaca por minuto através de estetoscópio flexível diretamente na região torácica esquerda. A frequência respiratória foi avaliada por meio de auscultação com o auxílio de estetoscópio flexível ao nível da região laringo - traqueal, contando-se o número de movimentos em um minuto. Já a temperatura retal foi realizada através da introdução de termômetro clínico no reto do animal. Todas as avaliações clínicas foram realizadas no período da manhã (8-9h), nos meses de outubro/2008 a junho/2009.

Quanto às características espermáticas, foram avaliadas as seguintes variáveis: aspecto, volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva individual (MPI) (%), vigor (V) (0-5), concentração espermática (CE) ($\times 10^6 \text{ mm}^3$), ao longo do ano, sendo a análise morfológica para detecção de patologias espermáticas (%) e a contagem de espermatozoides vivos/mortos (%) realizadas nos períodos seco e chuvoso do ano.

A patologia espermática foi avaliada através da coloração de Giemsa, contando-se 200 células, enquanto que a contagem de vivos/mortos foi realizada usando-se o corante vital eosina-nigrosina (Hafez, 1995), também se avaliando 200 células.

Proteína total

Para análise das proteínas totais, o sêmen colhido foi centrifugado por 30 minutos a 1.500g em temperatura de 4°C para obtenção do plasma seminal, sendo o sobrenadante recentrifugado por 60 minutos a 10.000g à temperatura de 4°C para retirada de fragmentos de células. O plasma foi aliquoteado, sendo uma parte destinada a mensuração da proteína total, através de espectrofotômetro, e a outra acondicionada em tubos de eppendorff, mantidos congelados a -18°C para realização da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) a 12,5% de separação e 12% de compactação.

A quantificação da proteína total seguiu à técnica descrita por Bradford (1976), que se baseia na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G250 às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro FP-901 (Chemistry Analyser Labsystems) pelo método de absorvância que representa a quantidade de luz que é absorvida, sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e usando-se como padrão a Albumina Sérica Bovina (BSA) em diferentes concentrações servindo como base para a curva de concentração x absorvância.

Eletroforese unidimensional

Para preparação das amostras de plasma utilizou-se 200 µg de proteína total do plasma seminal que foi diluída ao tampão de amostra, ficando uma concentração final de 2 µg/µL. O gel utilizado tinha dimensão de 10 x 8 cm onde colocou-se 15 µL da amostra do plasma em cada “poço” da placa de gel, sendo utilizado como padrão o kit LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION da Pharmacia Biotech., que apresenta as seguintes bandas de massas moleculares: 94 (Fosforilase B); 67 (Albumina Sérica Bovina); 43 (Ovalbumina); 30 (Anidrase Carbônica); 20,1 (Inibidor de Tripsina) e 14,4

kDa (Alpha-lactoalbumina). A eletroforese foi conduzida por uma corrente elétrica de 1A, 170 volts e 10 wats, por aproximadamente 2 horas.

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 por aproximadamente duas horas e descorados com etanol (30%) e ácido acético (7,5%), por aproximadamente duas horas, sob agitação constante. Para captura da imagem esses géis foram escaneados e analisados usando-se o software Bio Doc-IT-LS[®] 6.0 and VisiDoc-It, Gel Documentation System da UVP, o qual determina a densidade óptica das bandas protéicas expressa em pixels e quantifica em percentagem relativa ao total da amostra.

Para a secagem dos géis, os mesmos foram colocados entre duas folhas de papel celofane, hidratadas com solução de secagem contendo etanol (10%) e glicerol (2,5%) sobre uma placa de vidro, em temperatura ambiente por 24 horas.

Análise estatística

Na comparação das médias da avaliação clínica entre os períodos seco e chuvoso, utilizou-se o teste t de Tukey. Os dados das características espermáticas foram submetidos à análise de variância utilizando o pacote estatístico SAS (1999), sob o modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + R_j + E_i * R_j + C_k(E_i) + e_{ijkl}$$

Em que:

Y_{ijkl} representa a resposta estudada (concentração, motilidade, vigor, volume ou proteína total);

μ é uma constante associada a cada observação;

E_i é a i-ésima estação (chuvosa ou seca);

R_j representa o j-ésimo reprodutor;

$E_i * R_j$ representa a interação entre a i-ésima estação com o j-ésimo reprodutor;

$C_k(E_i)$ representa o efeito da k-ésima coleta dentro da i-ésima estação do ano;

e_{ijkl} representa o erro associado a cada observação.

Para testar a significância de cada efeito foi utilizado o teste F e para comparação de médias, quando necessário, utilizou-se o teste de Tukey. Antes da análise de variância para cada característica foram realizados teste de normalidade e

homogeneidade de variância, quando se observou a necessidade de fazer uma transformação quadrática para a variável vigor e logarítmica para a variável proteína total.

Foram calculadas correlações de Pearson entre os parâmetros meteorológicos e as características espermáticas.

A frequência de ocorrência das várias bandas protéicas ao longo do ano entre os período seco e chuvoso foi comparada pelo teste qui-quadrado (Snedecor e Cochran, 1967), utilizando-se tabelas 2×2 , sendo dois períodos (seco e chuvoso) por duas respostas (presença ou ausência). Esta mesma metodologia foi utilizada para testar diferenças na dispersão da frequência das bandas protéicas entre os quatro reprodutores, utilizando tabelas 4×2 , sendo quatro reprodutores por duas respostas (presença ou ausência).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de concentração espermática, motilidade progressiva e vigor (Tabela 2), encontram-se dentro dos limites preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), cujos valores são de $2,0$ a $6,0 \times 10^6$ spz/mL para a concentração espermática, 75% para a motilidade progressiva individual e 3,0 para o vigor. O volume médio do ejaculado encontrado (0,9 mL) foi inferior ao do CBRA (1998) (1,0 mL) e esteve dentro do limite observado por Mies Filho (1987).

Tabela 2. Valores individuais médios para volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva (%), vigor (1-5) e proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos animais da raça Morada Nova no semiárido do Nordeste.

Parâmetros	Volume	Concentração	MPI	Vigor	PT
Animal	(mL)	($\times 10^6$ pz/mL)	(%)	(1-5)	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Macho 1	1,04	5,37	88,46	3,89	13,08
Macho 2	0,91	5,57	85,00	3,80	16,49
Macho 3	1,06	6,20	84,35	3,82	14,50
Macho 4	0,83	5,19	83,84	3,61	10,31
Média ano	0,94	5,57	85,27	3,78	13,57

Os dados apresentados na tabela 3 diferiram ($P < 0,05$) para o volume entre os reprodutores e entre os dias da coleta. Já a concentração diferiu em todos os parâmetros analisados: época do ano, entre reprodutores, interação estação vs reprodutor e dia da coleta dentro de época do ano. Para os valores de motilidade progressiva individual e proteína total observou-se que não houve interação ($P > 0,05$) entre a época do ano vs reprodutor, enquanto que o vigor se mostrou diferente ($P < 0,05$) entre reprodutores e entre as coletas durante o ano.

Souza et al (2009), trabalhando com caprinos da raça Alpina Americana em Pernambuco, Teixeira (2008), com caprinos da raça Anglo-Nubiana, e Silva et al. (2005), com caprinos mestiços F1 (Anglo-Nubiana x SRD), também não encontraram diferença entre os períodos do ano para motilidade.

Dufour et al. (1984), trabalhando com carneiros no Canadá encontraram uma motilidade máxima nos meses de outubro e novembro (72%) e mínima em abril e maio (50%), indicando que nos climas temperados, onde as estações do ano são bem definidas, ocorre diferença significativa entre a motilidade e o vigor nestas épocas, o

mesmo não acontecendo no clima tropical, como no caso deste trabalho, que apenas apresentou diferença ($P < 0,05$) entre as épocas para a motilidade.

Tabela 3. Análises de variância com os respectivos valores do teste F para as fontes de variação, segundo as características estudadas em ovinos Morada Nova na região semiárida do Nordeste.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Característica				
		Volume	Concentração	Motilidade	Vigor	Proteína Total
Estação	1	0,01 ^{ns}	45,84 ^{**}	6,63 [*]	1,26 ^{ns}	13,58 ^{**}
Reprodutor	3	10,57 ^{**}	17,64 ^{**}	4,58 ^{**}	3,11 [*]	30,35 ^{**}
Estação*Reprodutor	3	0,14 ^{ns}	3,36 [*]	0,48 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,86 ^{ns}
Coleta (estação)	37	2,30 ^{**}	1,69 [*]	2,14 ^{**}	2,19 ^{**}	3,33 ^{**}

ns: Não significativo a 5%

* Não significativo a 5%

Segundo Corteel (1983), o aumento do volume do ejaculado ocorre devido a um acréscimo de fluídos do epidídimo e as glândulas anexas, não indicando, necessariamente, um aumento na concentração de espermatozóides. Freitas e Nunes (1992), estudando carneiros deslanados, criados na região litorânea nordestina não observou diferença significativa ($P > 0,05$) com relação ao volume do ejaculado, nas épocas seca e chuvosa, no entanto, os primeiros autores citados anteriormente encontraram diferença significativa ($P < 0,05$) entre as épocas para os parâmetros motilidade e concentração espermática, corroborando com os dados deste experimento.

Nunes (1988) e Teixeira (2008) trabalhando com caprinos na região Nordeste encontraram um volume significativamente maior de sêmen na época chuvosa do que na época seca, indicando que a sazonalidade foi responsável por esta diferença.

A média da concentração de proteínas totais do plasma seminal foi de 13,58 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, variando de 5,23 a 28,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, apresentando maior concentração no período chuvoso (14,65), diferindo significativamente ($P < 0,05$) do período seco (12,23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Tabela 5), corroborando com os resultados de outros estudos onde evidenciam a influência da estação do ano na composição do plasma seminal e na quantidade de proteínas seminais de ovinos (Smith et al., 1999), caprinos (La Falci et al., 2002) e bovinos (Roncolleta et al., 1999). De acordo com Souza et al. (2002) o aumento da proteína total melhorou o quadro espermático de ovinos no Nordeste

Pinheiro et al. (1996), observaram que a concentração dos compostos bioquímicos do plasma seminal em caprinos aumenta entre as épocas seca e chuvosa, ocorrência essa provavelmente relacionada à qualidade e disponibilidade da

alimentação. Huang et al., (2000) observou diferença significativa na qualidade do sêmen suíno em relação às estações do ano, verificando que nas estações quentes a qualidade do sêmen declinou significativamente.

Nas avaliações da concentração espermática pode-se observar a interação do período do ano com o animal (Tabela 4), já que os resultados das diferenças entre as estações dependem do reprodutor. Foi observado que o reprodutor 1 não apresentou diferença da concentração espermática entre os períodos seco e chuvoso, fato este não observado nos demais. Ao se comparar os animais dentro do mesmo período, pode-se observar que no período chuvoso houve diferença ($P<0,05$) entre os animais 3 e 4 e no período seco o animal 1 e 4 diferiram ($P<0,05$) dos animais 2 e do 3 (Tabela 5).

Tabela 4. Médias da concentração espermática, segundo a estação do ano e o reprodutor ovino Morada Nova na região semiárida do Nordeste.

Estação do ano	Característica			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
Chuvosa	5,21 ^{Aab}	5,39 ^{Bab}	5,57 ^{Ba}	4,82 ^{Bb}
Seca	5,44 ^{Ab}	6,29 ^{Aa}	6,74 ^{Aa}	5,51 ^{Ab}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Analizando as correlações entre os parâmetros seminais e as variáveis climáticas, verificou-se alta correlação ($P<0,05$) para o volume do ejaculado com a temperatura ambiente ($r=-92\%$), com a umidade ($r=0,71\%$) e com a precipitação ($r=-0,72$) durante o dia. Quanto a motilidade e o vigor, ambos apresentaram correlação moderada ($P<0,05$) ($r=0,43$ e $r=0,56$) com a precipitação do dia e alta correlação ($P<0,05$) ($r=-0,71$ e $r=-0,72$) com a precipitação mensal, respectivamente. A proteína total mostrou uma correlação moderada ($P<0,05$) ($r=-0,39$) com a precipitação durante o ano.

Esses resultados podem ser explicados porque a mudança de estação afeta tanto a qualidade quanto a quantidade de sêmen em toda a extensão do ano, mas em regiões tropicais não ocorre diferença estacional na produção espermática dos machos de raças nativas (Hibbert et al., 1986). Nessas áreas, as variações quanti-qualitativas do ejaculado parecem estar correlacionadas a outros fatores mais importantes do que o fotoperíodo, tais como a temperatura ambiente (Nunes et al., 1988; Machado et al., 2000), umidade do ar, precipitação e a disponibilidade de pastagens, que durante o período seco é escasso e de baixa qualidade (Clariget et al., 1998).

Em ovinos a temperatura ambiente média de 27°C é suficientemente alta para reduzir a qualidade seminal e ocasionar mudanças metabólicas e ultra-estruturais nos espermatozóides. Quando a temperatura ambiente excede a temperatura crítica superior (25°-27°C), a umidade relativa do ar passa a ter importância fundamental nos mecanismos de dissipação de calor devido ao ar úmido saturado inibir a evaporação da água através da pele e do trato respiratório, tornando o ambiente mais estressante para o animal (Curtis, 1983). Segundo Santos e Simplício (2000) essa redução indica uma menor secreção das glândulas acessórias, determinando ausência ou diminuição de alguns constituintes, como as proteínas do plasma seminal.

Ao se analisar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal pode-se observar um total de 44 proteínas diferenciadas, sendo 29 proteínas menores que 50 kDa e 15 proteínas maiores que 50 kDa, variando seus pesos moleculares de 12 a 135 kDa, havendo uma variação de 7 a 28 bandas em cada animal ao longo do ano.

É provável que este número de bandas observadas tenha sido resultado das análises realizadas pelo programa utilizado, que pode detectar isoformas de bandas que possuem peso molecular aproximado, fato comum de ocorrer quando se trabalha com proteômica. Portanto, há necessidade de mais estudos para que tais proteínas possam ser identificadas.

A distribuição das bandas protéicas teve o seguinte perfil na raça Morada Nova: as bandas B14 (50-58 kDa) e B15 (58-70 kDa) estavam presentes em todos os meses, mas não em todas as amostras, ao longo do ano; já no período seco as bandas presentes em todos os meses foram B10 (30-36 kDa) e B19 (90-100 kDa), enquanto que no período chuvoso foi observada a banda B12 (40-45 kDa) mostrando que no período seco há uma maior expressão de bandas presentes em todos os meses (Tabela 6). Segundo Chacur e Machado Neto (2007), as diferentes estações do ano podem influenciar a presença e ausência da expressão de proteínas do plasma seminal.

Dentre as bandas protéicas identificadas neste trabalho foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na frequência para as bandas de massa molecular de 12-14 kDa (27,16% e 55,56%), de 18-20 kDa (29,63% e 44,44%), de 20-22 kDa (58,02% e 79,17%), de 26-28 kDa (51,85% e 72,22%), de 28-30 kDa (19,75% e 33,33%), de 30-36 kDa (53,09% e 72,22%), de 36-40 kDa (62,96% e 79,17%), de 58-70 kDa (71,60% e 84,72%), de 80-90 kDa (35,8% e 54,17%), entre os períodos seco e chuvoso, respectivamente.

Ao se comparar a presença das bandas protéicas entre os animais, observou-se que houve diferença ($P < 0,05$) para a banda de massa molecular de 75-80 kDa.

A frequência da banda 1 (12 - 14 kDa) aumentou do período seco (27,16%) para o chuvoso (55,56%), sendo provavelmente uma espermedesina, já identificada em bovinos, suínos, equinos e caprinos, estando associadas à superfície da membrana do espermatozóide (Freitas e Davide, 2001). Bergson et al. (2005) identificaram essas proteínas como sendo as espermedesinas encontradas em carneiros adultos de raça européia. Cardozo et al. (2006) relacionaram essas proteínas à família das BSPs, ligada à manutenção da motilidade e capacitação espermática em caprinos (Villemure et al., 2003; JOBIM et al., 2003). Em caprinos, Souza et al. (2008), identificaram 81,3% de motilidade progressiva individual relacionada com as proteínas de 14-15 kDa e 79,8% relacionada às de 38-39 kDa. Schönek et al. (1995), identificaram como sendo espermedesinas a proteína de 13 kDa, a qual mostrou exercer função sobre o metabolismo espermático, protegendo contra os danos oxidativos, onde altas quantidades dessa proteína provocam diminuição da mortalidade dos espermatozoides. Isoformas dessa proteína também já foram encontradas com peso molecular de 28 kDa (Moura et al., 2006) e variando de 14 a 70 kDa em bovinos (Cancel et al., 1997, 1999; Erikson et al., 2003), sendo esta possivelmente uma modificação pós-traducional (Patarca et al., 1993; Sorensen et al., 1995; Moura et al., 2005).

Observou-se que a banda 4 (18-20 kDa) apresentaram maior expressão no período chuvoso (44,44%). Identificada por Mortarino et al. (1998) no plasma seminal e relacionada à fertilidade (Nellin et al., 1996).

Com relação à banda B5 (20-22kDa), Fouchécourt et al. (2002) identificaram no plasma seminal ovino uma proteína de massa molecular de 21,1 kDa como sendo a enzima prostaglandina-D-sintetase. Em touros, Killian et al. (1993) observaram que animais com maior abundância dessa proteína no plasma seminal apresentaram maior taxa de fertilidade após inseminação artificial (IA) com sêmen congelado.

A banda B8 (26-28 kDa) provavelmente possa ser isoforma da prostaglandina D sintetase, regulando a motilidade espermática e o transporte de espermatozoides para alcançarem o oviduto, onde a isoforma com peso de 26 kDa foi identificada por Killian et al. (1993), sendo associada a alta fertilidade em bovinos (Genera et al., 2000) e, identificada posteriormente, como prostaglandina D-sintetase tipo-lopocalina presente no plasma seminal com peso molecular de 26 kDa (Cancel et al., 1997). Flowers (2001) relacionou sua presença em suínos com a associação às taxas de parição (86%) e ao

tamanho da leitegada utilizando sêmen resfriado, sendo esta proteína considerada um potencial marcador de fertilidade.

Em ovinos essa proteína (26-28 kDa) aparece no testículo e no epidídimo durante o desenvolvimento fetal, sendo detectada na puberdade uma isoforma com peso de 30 kDa, a qual é convertida em outra isoforma de 27 kDa com o amadurecimento do animal (Fouchécourt et al., 1999; 2000; 2003). em ovinos esta proteína não foi relacionada com a síntese de prostaglandinas, sendo sua fertilidade provavelmente relacionada à capacidade de transportar substâncias hidrofóbicas, incluindo testosterona e retinóides (Fouchécourt et al., 2002).

A banda B10 (30-36 kDa) teve uma maior frequência no período chuvoso (72,22) sendo esta identificada em touros como uma proteína que se liga à heparina (30 kDa), denominada de “fertility-associated antigen” (FAA), encontrada na membrana espermática de machos de alto potencial de fertilidade (Bellin et al., 1996, 1998). Touros com maior fertilidade produzem espermatozóides com alta capacidade de se ligar à heparina (Bellin et al., 1994). Na espécie humana essa proteína (33-34 kDa) tem sido relacionada a problemas ligados à fertilidade (Starita-Geribaldi et al., 2001), como também a marcadores de azoospermia (Yamakawa et al., 2007).

A banda B14 (50-58 kDa) provavelmente venha a ser a osteopontina, uma glicoproteína de massa molecular de 55 kDa secretada pelo plasma seminal (Jobim et al., 2002), além de identificada e isolada da matriz óssea bovina, cartilagens, pele fetal, cérebro, rins, ovários, útero, bem como da urina, bile e leite bovino (Kerr et al., 1991; Sorensen e Petersen, 1993). Souza et al, (2004), detectaram através de western blots as proteínas de 14 e 50 kDa como duas isoformas da osteopontina, não sendo essas relacionadas a parâmetros seminais ou de fertilidade. Killian et al. (1993) identificaram essa proteína como um marcador de alta fertilidade em bovinos e Moura (2005), afirmou que ela também participa na interação entre espermatozóide e oócito durante a fertilidade. Neste trabalho foi observado que essa proteína se expressou em todos os meses do ano, mas não em todas as amostras dos animais avaliados, o que leva a afirmar que possivelmente ela não sofra influência dos fatores climatológicos na região semiárida do Nordeste.

A banda B15 (58-70 kDa) encontrada em todos os meses estudados, possivelmente esteja relacionada a albumina. Em bovinos de alta congelabilidade essa proteína, quando em grandes quantidades, foi relacionada à capacidade deste em

participar das modificações de permeabilidade da membrana espermática (Jobim et al., 2003).

Na análise individual dos machos identificou-se a banda B17 (75-80 kDa) sendo que em garanhões ela foi relacionada a SP-2 (75 kDa, pI 6,0), uma proteína do plasma seminal ligada negativamente à fertilidade (28-30 kDa).

Tabela 6. Frequência amostral das bandas protéicas durante os 12 meses do ano (outubro/2008 a setembro/2009), nos períodos seco e chuvoso.

	Banda	KDa	Seco	Chuvoso
<50 kDa	1	12 – 14*	27,16	55,56
	2	14 a 16	45,68	40,28
	3	16 a 18	20,99	13,89
	4	18 a 20*	29,63	44,44
	5	20 a 22*	58,02	79,17
	6	22 a 24	60,49	69,44
	7	24 a 26	58,02	51,39
	8	26 a 28*	51,85	72,22
	9	28 a 30*	19,75	33,33
	10	30 a 36*	53,09	72,22
	11	36 a 40*	62,96	79,17
	12	40 a 44	53,09	65,28
	13	44 a 50	54,32	48,61
>50 kDa	14	50 – 58	69,14	80,56
	15	58 a 70*	71,60	84,72
	16	70 a 75	35,80	30,56
	17	75 a 80*	44,44	52,78
	18	80 a 90*	35,80	54,17
	19	90 a 100	45,68	58,33
	20	>100	25,93	33,33

*diferem estatisticamente entre os períodos do ano pelo teste t de Student.

CONCLUSÃO

Apesar de ser uma raça naturalizada, adaptada às condições do semiárido, a Morada Nova mostrou-se sensível à umidade do ar e à precipitação pluviométrica da região com relação à qualidade do sêmen e expressão das bandas protéicas. No entanto, provavelmente, devido à baixa magnitude da variação sazonal observada, não exista estacionalidade reprodutiva em ovinos Morada Nova nos trópicos, apesar de que estudos mais aprofundados devam ser realizados para melhor conhecer a função das proteínas nessa raça e sua relação com as épocas do ano no Nordeste;

A banda de massa molecular de 75-80 kDa, provavelmente possa estar relacionada à fertilidade dos animais, devendo ser estudada posteriormente;

Este trabalho dará suporte a futuros estudos de biologia molecular na raça.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, O.R.; SILVA, R.G.; SCOLAR, J. GUEDES, J.M.F. Utilização de um índice de conforto térmico no zoneamento bioclimático da ovinocultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 661-671, 1995.
- BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHELATA, E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. **Small Ruminant Research**, v. 66, n. 1-3, p. 209-213, 2006.
- BELLIN, M. E., HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J., AX, R. Monoclonal antibody detection of heparine-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 173-182, 1996.
- BELLIN, M. E., OYAORSO, J. N., HAWNKINS, H.E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science**, v. 76, p.2023 -9, 1998.
- BERGERON A, VILLEMURE M, LAZURE C, MANJUNATH P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction Development**. 71; 461-470. 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analalytical Biochemistry** 72, 248-254, 1976
- CANCEL, A.M., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**., v. 57, n.6, p. 1292-301, 1997.
- CARDOZO, J.A.; Fernandez-Juan, M. Forcada, F.; Abecia, A.; Muino-Blanco, T.; Cebrian-Perez, 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.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Aniamal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 2. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- CLARIGET, R. P.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variation in live weight, testes size, Testosterone, LH secretion, Melatonin and Thyroxine in Merino and Corriedale rams in Sub-Tropical climate. **Acta Veterinaria Scandinavae**, v. 39, p. 35-47, 1998.
- FACÓ, O; LÔBO, R. N. B.; SILVA, J. R. F.; SOUSA, W. H. de; BOMFIM, M. A. D.; VILLELA, L. C. V. **Teste de desempenho individual de reprodutores da raça**

Morada Nova: resultados da prova em Morada Nova, CE-2008. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 27 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 91)

FLOWERS, W.L. Relation between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**. 10 p. 1-4, 2001

FOUCHÉCOURT, S. DACHEUZ, J. L. Glutathione-independent prostaglandin D2 synthase in the ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 558-566, 1999.

FOUCHÉCOURT, S. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1790-1803, 2000.

Fundação Cearense de Meteorologia - FUNCEME. **Monitoramento**. Disponível em: <www.funceme.br> Acesso em: 27 nov 2009.

HUANG, S.Y.; KUO, Y. H.; LEE, Y.P.; TSOU, H.L.; LIN, E.C.; LEE, W.C. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. **Animal Reproduction Science** v. 63, p. 231 – 240, 2000.

HOPKINS, P. S.; KNIGHTS, G. I.; LEFEURE, A. S. Studies of the environmental physiology of tropical Merinos. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 29, n. 1, p. 61-71, 197

HIBBERT, L.M.; RODRIGUES, H.D.; NOBLE, R.C. Effects of age and season on sperm abnormalities in Nubian goats. **Anatomy Histology Embryology**, v.15, p.173, 1986.

Instituto Nacional de Meteorologia - INMET. **Monitoramento**. Disponível em: WWW.inmet.gov.br Acesso em: 27 nov 2009.

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

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine Saanen and Damasco goat bucks born and raised in Greece. **Small Ruminant Research**, v.37, p.125-130, 2000.

KEER, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D. The cDNA clonig and distribution of bovine osteopontina. **Gene**, v. 108, p. 237-243, 1991.

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

KRAEMER, T. **The influence of high ambient temperature on different parameters of semen, biochemical and endocrine parameters in bulls in a climatic chamber**

and in subtropical climate. Berlin: FU Berlin, 2000. Disponível em: <http://www.diss.fu-berlin.de/2000/83/indexe.html>. Acesso em: 21 set 2009.

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

LU, C.D. Effects of heat stresses on goat production. **Small Ruminants Research**, v.2, p.151,62, 1989.

MACHADO, R.; FREITAS, A.R.; SIMPLÍCIO, A.A. Flutuações sazonais e efeitos de raça no sêmen caprino. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27., Viçosa, 2000. **Anais...**, Viçosa: SBZ, 2000. CDROM.

MANDIKI, S. N. M.; DERYCKE, G.; BISTER, J. L.; PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams 1. testicular size, semen quality and reproductive capacity. **Small Ruminant Research**, v. 28, p. 67-79, 1998.

MORTARINO, M. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of Bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, v.19, p. 797-801, 1998.

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

MOURA, A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.169-188, 2006

NEIVA, J.N.M; TEIXEIRA, M.; TURCO, S.H.N. Efeito do estresse limático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santas Inês mantidos em confinamento na região litorânea do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 668-678, 2004.

NUNES, J.F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.12, n.2, p.77-83, 1988

PINHEIRO, R.R.; MACHADO, R.; PINHEIRO, A.A. Níveis de cálcio, fósforo, magnésio e pH do sêmen de caprinos no nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, **Anais...** 33., 1996, Viçosa, MG. 1996.

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

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos a insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1835-1841, 2000.

SANTOS, F.C.B.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.H.P.; CEZAR, M.F.; PIMENTA FILHO, E.C.; COSTA, A.A.A.; SANTOS, J.R.S. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semiárido do Nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1. p.142-9, 2005.

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

SMITH, J.F. et al. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.59, p.223-225, 1999.

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

SOUZA, A. F.; LEITÃO, M. C. G.; BATISTA, A. M.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L.; GUERRA, M. M. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1166-1172. 2009.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. et al. Características reprodutivas, concentrações de proteínas seminais e testosteronemia de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida. **Anais... VI Reunião Regional da SBBq – Nordeste**. 2002

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. 2001.

TEIXEIRA, A. C., **Mapeamento eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana ao longo do ano no Nordeste do Brasil**. Sobral: Universidade Estadual Vale do Acaraú. Dissertação de mestrado. 2008

VALLE, A.; FUENTES, A.; PUERTA, M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. **Revista da Faculdade de Agronomia**, v.22, p.52-61, 2005.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.39, 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.

CAPÍTULO 4

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA

RESUMO

Os ovinos da raça Morada Nova têm a fertilidade como uma de suas principais características, mesmo assim esses animais vêm passando por um processo de descaracterização devido a cruzamentos indiscriminados o que pode levar a sua extinção. Uma das ferramentas utilizadas para o melhoramento genético de características relacionadas à fertilidade do macho é o estudo da biologia molecular na área da reprodução animal. A identificação de marcadores de fertilidade através das proteínas do plasma seminal torna-se uma importante ferramenta na seleção de reprodutores. Com isso, procurou-se identificar relação entre as características espermáticas e proteínas do plasma seminal com a fertilidade dos ovinos da raça Morada Nova. Foram utilizados quatro machos da raça Morada Nova, provenientes de diversas localidades da região semiárida do Ceará, aprovados em teste de desempenho e submetidos a regime de criação intensiva, em duas estações de monta. Antes de cada estação de cobertura, realizou-se coleta de sêmen para identificação das proteínas presentes e avaliação dos parâmetros seminais. Observou-se entre os animais diferença estatística ($P < 0,05$) quanto ao volume do ejaculado, concentração espermática e proteína total, não havendo, no entanto, diferença estatística ($P > 0,05$) quanto a motilidade progressiva individual e o vigor. Não se observou diferença significativa ($P < 0,05$) para a fertilidade entre os animais avaliados, cuja taxa variou entre 54,54 a 72,72%, mesmo apresentando bandas protéicas diferenciadas. Conclui-se que mesmo havendo diferença entre algumas características espermáticas, o sêmen destes animais apresentaram condições compatíveis à fertilização.

Palavras chave: características seminais; eletroforese; estação de monta; taxa de fertilidade

Abstract

The Morada Nova sheep have fertility as one of its main features, yet these animals are undergoing a process of distortion due to indiscriminate breeding which can lead to their extinction. One of the tools used for genetic improvement of traits related to male fertility is the study of molecular biology in the area of animal reproduction. The identification of markers of fertility by seminal plasma proteins becomes an important tool in selecting breeding animals. Therefore, we sought to identify the relationship between sperm characteristics and seminal plasma proteins with the fertility of the Morada Nova sheep. We used four males Morada Nova, from various localities in the semiarid region of Ceará, approved in performance testing and subjected to a regime of intensive farming on two breeding seasons. Before each breeding season, there was semen collection for identification of proteins present and evaluation of semen parameters. It was observed statistical difference between animals ($P < 0.05$) for ejaculate volume, sperm concentration and total protein, without, however, statistical difference ($P >$ inmotility and individual force). There was no significant difference ($P < 0.05$) for fertility among the animals studied, the rate ranged from 54.54 to 72.72%, even with different protein bands. It is concluded that despite some differences between sperm characteristics, the semen of these animals had conditions consistent fertilization.

Keywords: Semen characteristics; electrophoresis; breeding season fertility rate

INTRODUÇÃO

A raça Morada Nova é uma das principais raças nativas de ovinos deslançados do Nordeste do Brasil (Souza et al, 2003), destacando-se como principais características sua rusticidade, prolificidade, pele de excelente qualidade, fertilidade, precocidade sexual, pequeno porte, habilidade materna e não estacionalidade reprodutiva (Facó et al., 2009).

Esses animais estão passando por um processo de descaracterização, o que pode ocasionar a extinção da raça devido a cruzamentos indiscriminados e uma cultura por parte dos criadores a manterem ovinos de raças exóticas e de maior porte em suas propriedades. Com isso, há uma preocupação por parte de pesquisadores e instituições de pesquisa em estudar esses animais procurando melhorá-los através da identificação molecular de suas características produtivas e reprodutivas, de forma a incentivar os produtores na escolha de animais para exploração.

Uma das ferramentas utilizadas para o melhoramento genético de características relacionadas à fertilidade do macho é o estudo da biologia molecular na área da reprodução animal, por meio de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal, cuja seleção de genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas, possam ser incrementadas (Roncoletta et al, 1999). Através desses estudos o plasma seminal vem sendo avaliado tendo em vista seu papel essencial nas funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fertilização (Kraus et al., 2005), proporcionando boas condições para a manutenção da motilidade, da sobrevivência e do transporte espermático, tanto no sistema reprodutor do macho, quanto da fêmea (Topfer-Petersen et al., 2005).

O plasma seminal deixou de ser visto apenas como um meio de transporte para os espermatozoides e está sendo mais estudado em relação a seus compostos, principalmente suas proteínas, já que estas se encontram em grande quantidade e influenciam várias funções como a capacitação espermática e a reação acrossômica (Manjunath e Therien, 2002).

A caracterização de proteínas do plasma seminal tem recebido, nos últimos anos, atenção especial por parte dos pesquisadores com vista a entender ou determinar possíveis efeitos ou interações destas com a fertilidade do animal. Segundo Brandon et al. (1999), a habilidade para avaliar a fertilidade de um reprodutor usando-se ensaios

para determinação das mudanças quantitativas das proteínas do plasma seminal seria extremamente vantajosa para um programa de melhoramento genético. Por isso, a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies, através da identificação de polipeptídios, poderá fornecer elementos para a certificação da fertilidade e da congelabilidade do sêmen (Killian et al., 1993; Roncoletta et al 1999; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo identificar a associação da fertilidade com a identificação das bandas protéicas presentes em ovinos Morada Nova criados na região semiárida do Nordeste.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento

O experimento foi realizado na fazenda sede do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, Ceará, na região semiárida do Nordeste, à 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros. Os solos são do tipo Bruno não-cálcico e lotólico, cobertos por uma vegetação de caatinga sucessional, hiperxerófila, com árvores de porte pequeno a médio. Segundo a classificação climática de Köppen, a região possui um clima do tipo AW de savana caracterizado por uma estação seca que vai de julho a dezembro e uma chuvosa de janeiro a junho, com uma precipitação média de 758,8 mm, temperatura média anual é de 30°C, com médias, mínima e máxima, de 22°C e 35°C, respectivamente, e umidade relativa do ar de 69% (Funceme, 2009).

1.1. Animais, Colheita de sêmen, avaliação clínica e seminal

Foram selecionados quatro reprodutores da raça Morada Nova dentre os animais aprovados pelo teste de desempenho, provenientes de diversas propriedades da região. Estes animais encontravam-se nas mesmas condições ambientais visando identificar indivíduos superiores através das diferenças genéticas. No início da prova os animais foram inspecionados quanto ao aspecto sanitário, zootécnico, peso e idade, sendo vermifugados e recebendo suplemento vitamínico injetável (ADE). O peso corporal, o perímetro escrotal, a altura de cernelha, a largura de peito, a largura de garupa, o comprimento de garupa, o comprimento corporal, a profundidade corporal, o perímetro torácico e o escore corporal (ECC), avaliado com notas subjetivas de 1 a 5, foram tomados no início e no final da prova. Para a classificação final dos animais, foi utilizado um índice que considerava o ganho de peso médio diário durante a prova (GPMD), a área de olho de lombo ($AOL_p = AOL / \text{Peso Final}^{0,75}$) e o perímetro escrotal final ($PE_p = PE / \text{Peso Final}^{0,75}$), ponderados pelo peso metabólico, a espessura de gordura (EG) e o somatório dos escores visuais (EV) (FACÓ et al., 2009).

A idade dos animais selecionados variou de 18 a 21 meses, onde os reprodutores foram submetidos a regime de criação intensivo, recebendo volumoso (*Pennisetum*

purpureum Schum) cortado, 200g de concentrado e sal mineral no cocho duas vezes ao dia e as 100 fêmeas utilizadas nas estações de monta receberam suplementação antes da estação de monta tendo acesso a pastagem nativa.

O sêmen foi colhido, semanalmente, em vagina artificial, utilizando-se uma fêmea estrogonada (Cipionato de estradiol) como manequim, no período de outubro/2008 a setembro/2009.

Quanto à avaliação clínica, verificou-se a frequência cardíaca por minuto através de estetoscópio flexível diretamente na região torácica esquerda. A frequência respiratória foi avaliada por meio de auscultação com o auxílio de estetoscópio flexível ao nível da região laringo - traqueal, contando-se o número de movimentos em um minuto. Já a temperatura retal foi realizada através da introdução de termômetro clínico no reto do animal. Todas as avaliações clínicas foram realizadas no período da manhã (8-9h), nos meses de outubro/2008 a junho/2009.

Quanto às características espermáticas, foram avaliadas as seguintes variáveis: aspecto, volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva individual (MPI) (%), vigor (V) (0-5), concentração espermática (CE) ($\times 10^6 \text{ mm}^3$), ao longo do ano, sendo a análise morfológica para detecção de patologias espermáticas (%) e a contagem de espermatozoides vivos/mortos (%) realizadas nos períodos seco e chuvoso do ano.

Quantificação de proteínas totais

Para análise das proteínas totais o sêmen colhido foi centrifugado por 30 minutos a 5°C e 1.500 g para obtenção do plasma seminal e o sobrenadante recentrifugado por 60 minutos a 4°C e 10.000 g para retirada de fragmentos de células.

Depois de centrifugado o plasma foi aliquoteado em tubos *ependorff*, sendo uma parte deste destinada a mensuração da proteína total, através de espectrofotômetro FP-901 (Chemistry Analyser Labsystems), e a outra mantida sob refrigeração a -18°C para realização da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) a 12,5%.

O plasma destinado à quantificação de proteínas totais foi submetido à técnica descrita por Bradford (1976), que se baseia na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G250 às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro FP-901 (Chemistry Analyser Labsystems) pelo método de absorvância que representa a quantidade de luz que é absorvida, sendo a

leitura realizada no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e tendo como padrão a Albumina Sérica Bovina (BSA).

Eletroforese unidimensional

Para preparação das amostras de plasma utilizou-se 200 µg de proteína total do plasma seminal diluída em tampão de amostra, ficando uma concentração final de 2 µg/µL. O gel utilizado tinha dimensão de 10 x 8 cm onde colocou-se 15 µL da amostra do plasma em cada “poço” da placa de gel, sendo utilizado como padrão o kit LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION da Pharmacia Biotech., que apresenta as seguintes bandas de massas moleculares: 94 (Fosforilase B); 67 (Albumina Sérica Bovina); 43 (Ovalbumina); 30 (Anidrase Carbonica); 20,1 (Inibidor de Tripsina) e 14,4 kDa (Alpha-lactoalbumina). A eletroforese foi conduzida por uma corrente elétrica de 1A, 170 volts e 10 wats, por aproximadamente 2 horas.

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 por aproximadamente duas horas e descorados com etanol (30%) e ácido acético (7,5%), por aproximadamente duas horas, sob agitação constante. Para captura da imagem esses géis foram escaneados e analisados usando-se o software Bio Doc-IT-LS[®] 6.0 and VisiDoc-It, Gel Documentation System da UVP, o qual determina a densidade óptica das bandas protéicas expressa em pixels e quantifica em percentagem relativa ao total da amostra.

Para a secagem dos géis, os mesmos foram colocados entre duas folhas de papel celofane, hidratadas com solução de secagem contendo etanol (10%) e glicerol (2,5%) sobre uma placa de vidro, em temperatura ambiente por 24 horas.

Estação de monta

Cada estação de monta teve duração de 45 dias, onde as fêmeas eram observadas em relação à manifestação do estro e encaminhadas ao macho 12 h depois para que o mesmo realiza-se a cobertura. Caso essas fêmeas manifestassem os sinais de estro novamente realizava-se outra cobertura. A distribuição das fêmeas foi feita de modo que cada macho recebesse uma fêmea de forma aleatória.

Decorridos 30 dias da cobertura realizou-se ultra-sonografia do tipo Doppler para identificação das fêmeas com prenhez positiva, sendo refeita aos 60 dias para confirmação dos resultados.

Analise estatística

Os dados referentes aos parâmetros espermáticos e proteína total foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada através do teste t de Student a 5% de significância, utilizando-se o programa SAS (1999).

A comparação da fertilidade entre os animais foi feita através do teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se analisar os parâmetros seminais dos animais estudados observou-se diferença estatística ($P < 0,05$) quanto ao volume do ejaculado, concentração espermática e proteína total, não havendo diferença estatística ($P > 0,05$) quanto a motilidade progressiva individual e o vigor. O valor médio da proteína total foi de 21,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ variando de 18,71 a 28,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Observou-se que o animal B apresentou valores mais elevados estatisticamente ($P < 0,05$) do que os outros estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação individual dos parâmetros espermáticos dos ovinos da raça Morada Nova

Parâmetros espermáticos	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D
Volume do ejaculado	1,4 ^a	0,9 ^b	0,9 ^b	1,4 ^a
Motilidade	70/3 ^a	90/4 ^a	90/4 ^a	90/4 ^a
Concentração	3,92 ^b	6,34 ^a	3,8 ^b	5,88 ^a
Proteína total	19,36 ^a	28,04 ^b	18,71 ^a	20,31 ^a

^{ab} Letras distintas diferem estatisticamente através do teste t de Student a 5%.

Os géis de eletroforese unidimensional mostraram que houve uma diferença na distribuição das bandas protéicas entre os animais, onde o peso delas variou de 14 a 125 kDa, sendo observada maior frequência nas bandas maiores que 50 kDa. Também foi observado que o número de bandas diferiu entre os animais (11-21 bandas), apesar de serem da mesma raça, ter idade aproximada e serem criados em um mesmo sistema de produção (Tabela 2), mostrando a variação individual existente entre os animais.

Killian et al. (1993) identificou uma banda de peso semelhante a encontrada no animal A (25kDa) relacionando-a a uma isoforma da prostaglandina D sintetase, associada a alta fertilidade de bovinos. Em ovinos a D sintetase aparece nos testículos e epidídimos durante o desenvolvimento fetal, sendo detectada na puberdade uma isoforma com peso de 30 kDa, posteriormente convertida para outra isoforma de 27 kDa com o amadurecimento do animal (Fouchécourt e Dacheux, 1999). Nesta espécie, esta proteína não foi relacionada com a síntese de prostaglandinas, sendo sua influência na fertilidade do animal, provavelmente relacionada à capacidade de transportar substâncias hidrofóbicas, incluindo testosterona e retinóides (Fouchécourt et al., 2000).

Tabela 2. Relação das bandas protéicas no gel de eletroforese que se diferenciaram entre os animais da raça Morada Nova; número total de bandas e taxa de fertilidade de cada animal avaliado (%) na primeira estação de monta.

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D
	-	16	16	-
	-	19	19	19
	25	-	-	-
	-	29	29	-
	-	-	-	33
	-	37	37	-
	-	39	39	-
	-	-	-	41
	-	47	-	47
	72	72	-	-
	90	-	-	-
Total de bandas	11	21	19	14
Fertilidade ao teste de prenhez (%)	72,72	66,6	60	54,54

No animal D foi identificadas duas proteínas de 33 e 41 kDa que não se manifestaram nos demais animais, sugerindo-se que as mesmas devam ser posteriormente estudadas.

Apesar de apresentarem diferença ($P < 0,05$) para o volume, a concentração espermática e as bandas protéicas não foi observado diferença ($P > 0,05$) para a taxa de fertilidade entre os animais estudadas (Tabela 3). Provavelmente, por se tratar de animais selecionados através de teste de desempenho e por apresentarem boas características espermáticas.

Tabela 3. Taxa de fertilidade de ovinos da raça Morada Nova no semiárido do Nordeste Brasileiro.

Reprodutor	Fêmeas parida/ Fêmeas cobertas	Taxa de fertilidade (%)
A	16/22	72,72 ^a
B	16/24	66,67 ^a
C	12/20	60,00 ^a
D	12/22	54,54 ^a

* Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado.

CONCLUSÕES

Não foi observada relação entre as características espermáticas e as proteínas do plasma seminal com a fertilidade dos ovinos Morada Nova no semiárido do Nordeste brasileiro. Estudos posteriores são recomendados para avaliação da relação das bandas protéicas seminais e a fertilidade desses animais.

Referências Bibliográficas

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDON, C. I., HEUSNER, G. L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p. 863-873, 1999.
- FACÓ, O; LÔBO, R. N. B.; SILVA, J. R. F.; SOUSA, W. H. de; BOMFIM, M. A. D.; VILLELA, L. C. V. **Teste de desempenho individual de reprodutores da raça Morada Nova: resultados da prova em Morada Nova, CE-2008**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 27 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 91)
- FOUCHECOURT, S.; DACHEUX, F.; J.L. Glutathion- independent prostaglantin D syntrase in ram allio epididymal fluids; origin and regulation. **Biology of Reproduction**. V. p. 558-556, 1999.
- Fundação Cearense de Meteorologia. FUNCEME. **Monitoramento**. Disponível em: <www.funceme.br> Acesso em: 27 nov 2009
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.61, p.255-266, 2004
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A., ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bulls seminal plasma. **Biology of Reproduction, Champaign**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNA, B.; PEKNIKOVA, J.; JONAKOVA, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**. v.65, p. 33–46, 2005.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal Reprod. Immunology**, v.53, p.109-119, 2002
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 214-22, 2007.
- RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H. 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 Veterinary Res. Animal Science**. V.36, 1999.

SOUZA, W.H. de; LÔBO, R.N.B.; MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: Estado de Arte e Perspectivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., **Anais...** João Pessoa, 2003. p. 501 - 522. CD-ROM. 2003.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A raça Morada Nova mesmo considerada naturalizada sofreu influência dos fatores meteorológicos, sendo a identificação da relação desses fatores com as proteínas do plasma seminal e os parâmetros espermáticos importantes para a identificação de marcadores moleculares tanto de fertilidade como de resistência aos climas inóspitos.