

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

**VARIAÇÃO SAZONAL DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE  
CAPRINOS (*Capra hircus*) DA RAÇA MOXOTÓ**

**ROBERTA VIANNA DO VALLE**

**SOBRAL – CE  
SETEMBRO – 2012**

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

**VARIAÇÃO SAZONAL DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE  
CAPRINOS (*Capra hircus*) DA RAÇA MOXOTÓ**

**ROBERTA VIANNA DO VALLE**

**SOBRAL – CE  
SETEMBRO – 2012**

ROBERTA VIANNA DO VALLE

**VARIAÇÃO SAZONAL DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE  
CAPRINOS (*Capra hircus*) DA RAÇA MOXOTÓ**

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

Área de concentração: Reprodução Animal

ORIENTADORA:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY

SOBRAL - CE

SETEMBRO – 2012  
ROBERTA VIANNA DO VALLE

**VARIAÇÃO SAZONAL DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE  
CAPRINOS (*Capra hircus*) DA RAÇA MOXOTÓ**

Dissertação defendida e aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ pela Comissão Examinadora:

---

**PROF. DR. JOÃO BATISTA CAJAZEIRAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

---

**PROF. DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO  
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ-UVA/  
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS**

---

**PROF. DR. RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ  
COORDENAÇÃO DE BIOLOGIA**

---

**PROF. DR. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY  
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS  
PRESIDENTE**

SOBRAL – CE  
SETEMBRO - 2012

Aos meus amados pais, Gilberto e Rosangela, por me ensinarem o valor da educação.  
À meu maninho querido, Silvan, pelo apoio e incentivo sempre.

**Dedico**

**“No fim tudo dá certo,  
e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”**

***Fernando Sabino***

## AGRADECIMENTOS

### **A Deus, único.**

A todos de minha família que diretamente ou indiretamente ajudaram e ajudam nesta longa caminhada.

A minha orientadora, professora Ângela Maria Xavier Eloy, pelo convite de mestrado realizado no período de estágio supervisionado, pela confiança depositada, apoio, orientação e, principalmente amizade no final desse trabalho.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA e Embrapa Caprinos e Ovinos, através do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos conhecimentos que me foram proporcionados ao longo deste período.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado. E ao FINEP pelo apoio financeiro do projeto.

À todos pesquisadores, funcionários e estagiários da Embrapa Caprino e Ovinos que me ajudaram na realização da pesquisa e me distraíram nos momentos de dificuldades.

Aos meus colegas e amigos de turma ingressante do mestrado: Rafael Teixeira, Phâmela Marjoire, Natália, José Guedes, Dani Timbó, Dani Pernambuco, Juliana Rodrigues, Alan Martins, Juliana Osterno, Helana Batista, João Paulo, Hélio Costa, Jocélia Fernandes e Luiza Elvira.

Ao Nóbrega, Seu Zé Leão, Eugênio e Seu Evaristo pela ajuda semanal com os caprinos no momento do transporte e manejo dos animais, das coletas e avaliações andrológicas.

Ao João Ricardo (John Rick) e João Garcia, meu eterno agradecimento, pela grande paciência comigo e disposição para a execução do experimento, principalmente das eletroforeses.

Ao professor Rodrigo Maranguape e toda sua equipe, por conceder o NUBIS, para realização e análise dos géis de eletroforeses bidimensionais. Em especial, a Cleane, por ficar ao meu lado em algumas madrugadas, a Vitória pela paciência em ensinar a metodologia da eletroforese bidimensional, a Tatiana, na excisão dos *spots* e também dos vários momentos de “espetinhos”.

Ao professor e pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Dr. Raymundo Rizaldo pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao estatístico da Embrapa Caprinos e Ovinos, Adriano Lima, por sempre estar disposto a ajudar.

À funcionária e amiga Joice, “o anjo da coordenação do mestrado”, pela alegria e simpatia sempre presente com todos, mesmo envolvendo assuntos burocráticos.

À professora Ana Sancha pela força, torcida e contribuições dadas.

À todas as meninas que moraram comigo em Sobral: Nadiana Mendes, Ismênia França, Juliana Rodrigues, Claudiane, Renatinha, Suelane, Karol, Michelle, Joana, Elizangêla e Viviane. No entanto, não posso deixar de agradecer em especial, Nadiana e Ismênia (Loira), pela ajuda incondicional, alegrias constantes, “brigas” engraçadas, amizade verdadeira. Obrigada por tudo, jamais esquecerei vocês.

Às gatonas Dani Farias, Raquel Carvalho, Lauana Borges, Rosalba Memória, Roberta Lomonte, Kelma Costa, Samilly Alves, Dalva Azevedo, Jamille Bezerra, Simone Costa, Claudete Rodrigues, Ana Milena, Tania Lopes, Solange Souza e, aos gatinhos Pedinho Alberto, Van dos Santos, Fagner Cavalcante pelos vários momentos de conversas, risadas, apoio, AMIZADE.

Pelo aprendizado adquirido nos curtos quatro meses passados na ESALQ/USP com equipe do professor Roberto Sartori na área de reprodução animal. E por ter a oportunidade de conhecer pessoas que deixaram lembranças inesquecíveis para minha vida tanto profissional como pessoal.

Às minhas amigas, Adriana Ísis, Vânia dos Santos, Alê Soares, Ciu Araújo e Lua Emily (minha cunha), que mesmo na distância, me ajudaram na dissertação conferindo as referências e correções ortográficas.

Ao estado do Ceará pela recepção e acolhimento.

E a todos aqueles que mesmo sem seus nomes mencionados, mas contribuíram na minha formação pessoal e acadêmica.

**A todos vocês meu muito obrigada.**

## SUMÁRIO

	PÁGINAS
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO GERAL.....	XVI
GENERAL ABSTRACT.....	XVII
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
ASPECTOS GERAIS DA RAÇA MOXOTÓ.....	6
SAZONALIDADE REPRODUTIVA DE PEQUENOS RUMINANTES....	7
SÊMEN CAPRINO.....	10
Avaliação da qualidade seminal.....	11
ESPERMATOZOIDE.....	11
PLASMA SEMINAL E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	13
Composição.....	13
Proteínas do plasma seminal ligadas a funções espermáticas e fertilidade.....	14
MÉTODOS DE ESTUDOS DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL.	18
Eletroforese bidimensional	18
Espectrometria de massa.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO 2 – ABORDAGEM PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS MOXOTÓ.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38

<b>Localização e dados climatológicos.....</b>	<b>38</b>
<b>Animais experimentais e manejo nutricional.....</b>	<b>39</b>
<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>40</b>
<b>Coleta e avaliação de sêmen.....</b>	<b>40</b>
<b>Obtenção do plasma seminal.....</b>	<b>40</b>
<b>Fluxograma de pesquisa proteômica.....</b>	<b>41</b>
<b>Determinação da concentração de proteínas totais do plasma     seminal.....</b>	<b>42</b>
<b>Eletroforese bidimensional do plasma seminal.....</b>	<b>42</b>
<b>Análise dos mapas de eletroforese bidimensional.....</b>	<b>43</b>
<b>Preparação das amostras para a espectrometria de massa.....</b>	<b>45</b>
<b>Identificação das proteínas por espectrometria de massa.....</b>	<b>45</b>
<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>46</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>Parâmetros seminais.....</b>	<b>47</b>
<b>Proteínas do plasma seminal.....</b>	<b>49</b>
<b>Proteínas identificadas na espectrometria de massa.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>76</b>



**LISTAS DE TABELAS****CAPÍTULO 2**

1. Médias da temperatura, umidade e precipitação acumulada no município de Sobral, Ceará, no período de abril de 2010 a março de 2011.....	39
2 Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros seminais dos caprinos da raça Moxotó criados na região do Nordeste do Brasil, nos períodos seco e chuvoso.....	48
3. Valores de média e desvios-padrão de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) obtida dos cinco animais nos períodos seco e chuvoso.....	50
4. Proteínas similares no período chuvoso e seco presentes nos caprinos Moxotó adultos identificadas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida através do banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent disponível <i>online</i> no portal ExPASy com seus respectivos pesos moleculares (MW), ponto isoelétrico (pI) e funções.....	63
5. Proteínas do plasma seminal de caprinos Moxotó adultos identificados por eletroforese bidimensional SDS-PAGE e espectrometria de massa (MALDI-ToF), nas ferramentas ProFound e MASCOT.....	64

## LISTAS DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

1. Efetivo do rebanho caprino em 2009 no estado do Ceará.....	5
2 Caprinos da raça Moxotó.....	7
3. O espermatozoide e suas estruturas internas.....	12
4. Diagrama de funcionamento de um espectrômetro de massa.....	21

### CAPÍTULO 2

1. Fluxograma das etapas da análise proteômica em plasma seminal, usando a eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massa MS/MS.....	41
2 Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal de caprinos Moxotó, cujo gráfico A representa o gel de referência do período chuvoso e o B representa o gel de referência do período seco, ambos gerados pelo <i>software ImageMaster Platinum</i> versão 7.0.....	51
3. Dispersão das duplicatas de géis 2D-PAGE considerando o parâmetro porcentagem do volume (%Vol) dos <i>spots</i> no período chuvoso com um coeficiente de correlação linear de 0,9952 (A); e no período seco com coeficiente de correlação linear de 0.9585 (B).....	52
4. Média e desvio padrão dos números de <i>spots</i> protéicos de plasma seminal de reprodutores caprinos da raça Moxotó, em géis bidimensionais (pH 4-7 de 13 cm) entre os períodos chuvoso e seco, analisados pelo <i>ImageMaster Platinum</i> versão 7.0.....	53
5. Géis de eletroforese bidimensional de poliacrilamida do plasma seminal de caprinos Moxotó no período chuvoso, representando no contorno verde a ausência de <i>spots</i> protéicos no gel do animal A (direita) e gel de referência (esquerda).....	54
6. Porcentagem de frequência dos <i>spots</i> por intervalo de pontos	

isoeletricos (pI) e peso molecular (MW) em géis bidimensionais analisados pelo <i>ImageMaster Platinum</i> versão 7.0 do plasma seminal de caprinos da raça Moxotó entre os períodos chuvoso e seco.....	55
7. Representando mapas bidimensionais dos 75 <i>spots</i> protéicos diferencialmente expressos nos períodos chuvoso e seco, analisados pelo <i>software ImageMaster Platinum</i> versão 7.0. (A) Gel referência do período chuvoso com seus 65 <i>spots</i> similares no período. (B) Gel referência do período seco com oito <i>spots</i> similares no período.....	57
8. Gel de referência representando os <i>spots</i> similares nos períodos chuvoso e seco (quadrado verde) e os <i>spots</i> 5 e 6 (quadrado vermelho) presentes apenas no período chuvoso, de acordo com as análises do <i>software ImageMaster Platinum</i> versão 7.0.....	58
9. Imagens do <i>software ImageMaster Platinum</i> versão 7.0 dos <i>spots</i> protéicos, em géis bidimensionais, presentes exclusivamente no período chuvoso. (A) <i>spot</i> protéico 5 e (B) <i>spot</i> protéico 6.....	62

**LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>%Vol</b>	Porcentagem de Volume relativo
<b>2D-PAGE</b>	Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ANUALPEC</b>	Anuário da Pecuária Brasileira
<b>aSFP</b>	Protéina Ácida do Fluido Seminal
<b>Bdh</b>	Bodesina
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>BSPs</b>	Proteínas Seminais de Bovinos
<b>CBRA</b>	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
<b>CHAPS</b>	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
<b>CID</b>	Decomposição Induzida por Colisão
<b>CONAB</b>	Companhia Nacional de Abastecimento
<b>DDA</b>	Análise Direta de Dados
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECP</b>	Cipionato de Estradiol
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>FLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo Estimulante
<b>GnRH</b>	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
<b>GSPs</b>	Proteínas Seminais de Caprinos
<b>H</b>	Hora
<b>HAP</b>	Proteínas com Afinidade à Heparina
<b>IAA</b>	Iodoacetamida
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>INMET</b>	Instituto Nacional de Meteorologia
<b>IPECE</b>	Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará
<b>IPG</b>	Gradiente de pH Imobilizado

<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>LMW</b>	Marcador de Baixo Peso Molecular
<b>m/z</b>	Massa-carga
<b>mA</b>	Miliamper
<b>MALDI</b>	Ionização/Dessorção a Laser Auxiliado por Matriz
<b>MALDI-ToF</b>	Ionização/Dessorção a Laser Auxiliado por Matriz – Tempo de Vôo
<b>mg</b>	Miligramas
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro Cúbico
<b>MS</b>	Espectrometria de Massa
<b>MW</b>	Peso Molecular
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>NUBIS</b>	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
<b>°C</b>	Grau centígrados
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>pI</b>	Ponto Isoelétrico
<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>RSVP</b>	<i>Ram Seminal Vesicles Protein</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de Dodecil Sulfato de Sódio
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>V</b>	Voltagem

## RESUMO GERAL

Fatores climáticos, como as altas temperaturas ambientais no semiárido do Nordeste, podem influenciar a atividade reprodutiva do macho caprino. Sabe-se que nessa espécie, a sazonalidade reprodutiva é uma característica importante na limitação da produtividade. Dentre as raças caprinas, a Moxotó representa valioso material genético, pois se caracteriza como animais altamente adaptados ao clima tropical. O estudo de componentes do plasma seminal representa uma alternativa para avaliar o desempenho reprodutivo, através do conhecimento de fatores que interferem diretamente no processo de fertilização, podendo vir a ser considerados como biomarcadores. Estudos têm demonstrado que as proteínas do plasma seminal participam da regulação de diversos processos associados à fisiologia reprodutiva. Este trabalho teve como objetivo identificar as variações do perfil protéico em diferentes períodos do ano, e sua relação com as características espermáticas em caprinos da raça Moxotó, criados no semiárido Nordestino, através da eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Verificou-se que a variação sazonal do clima nesta região mostrou não interferir nos parâmetros espermáticos dos caprinos, apresentando prevalência de proteínas ácidas e de baixo peso molecular em ambos os períodos. No entanto, o período seco apresentou menor diversidade de proteínas diferencialmente expressas em relação ao período chuvoso. Foram detectados dois *spots* protéicos, exclusivamente no período chuvoso, sugerindo pertencerem à família das GSPs. Na espectrometria de massa foram identificadas oito proteínas, sendo as de função conhecida e presentes no período seco, a *histone H100-like*, que protege a cromatina, e a RNA polymerase, envolvida na transcrição durante a espermatogênese. Já no período chuvoso identificou-se a *immunoglobulin heavy chain*, que protege os espermatozoides de efeitos danosos do ambiente. Os resultados obtidos mostram pela primeira vez o *fingerprinting* do plasma seminal de caprinos nativos Moxotó ao longo do ano na região Nordeste. Esta pesquisa poderá subsidiar futuros estudos de caracterização protéica do plasma seminal visando identificar biomarcadores para a raça Moxotó.

**Palavras - chave:** clima, eletroforese, espectrometria de massa, sêmen

## GENERAL ABSTRACT

Climatic factors such as the high ambient temperatures in the semiarid Northeast, can influence the reproductive activity of the male goat. It is known that in this species, the seasonality is an important feature reproductive limiting productivity. Among the goat breeds, the Moxotó presents a valuable genetic material once the animals are known as highly adapted to the tropical climate. The study of seminal plasma components represents an alternative to evaluate the reproductive performance through knowledge of factors that directly interfere with the fertilization process and may come to be regarded as biomarkers. Studies have shown that the seminal plasma proteins are involved in the regulation of various processes associated with reproductive physiology. This work aimed to identify changes in protein profiles in different periods of the year, and its relationship with sperm characteristics in Moxotó goats, by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. It was found that the seasonal variation in this region showed not interfere with sperm parameters goats, showing prevalence of acidic proteins and low molecular weight in both periods. However, the dry period showed lower diversity of proteins differentially expressed in relation to rainy season. Two protein spots were detected exclusively in the rainy season, suggesting they belong to the GSP family. In mass spectrometry have been identified eight proteins, from which two of them, the histone-like H100 and the RNA polymerase are present in the dry season and protects the chromatin and it is involved in the transcription during the spermatogenesis, respectively. The other one, the immunoglobulin heavy chain, present in the rainy season, protects the spermatozoids to deleterious environment. This results showed for the first time the fingerprinting of Moxotó goat seminal plasma throughout the year in the Northeast. This research can facilitate future studies of seminal plasma protein characterization in order to identify biomarkers for Moxotó.

**Keywords:** climate, electrophoresis, mass spectrometry, semen

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie caprina, primeira a ser domesticada com fins produtivos, tem-se difundido amplamente no mundo. Está entre os ruminantes domésticos que desempenham relevante papel no suprimento de alimento de origem animal destinado ao consumo humano, despertando assim, interesse dos produtores e dos órgãos governamentais para incremento da atividade pecuária sustentável do país.

Os rebanhos de caprinos do Nordeste brasileiro são constituídos por pequenas populações de raças e tipos nativos, sem padrão racial definido. Os genótipos nativos correspondem a populações descendentes das raças trazidas durante a colonização do Brasil. Dentre os grupos genéticos nativos destaca-se a raça caprina Moxotó, considerada a mais antiga das raças nativas da região, caracterizada por apresentar pequeno porte e aptidão mista para carne, leite e pele.

Nas últimas décadas, porém, está ocorrendo uma introdução de raças exóticas para composição do rebanho caprino no Nordeste, causando a extinção de tipos étnicos e perda dos genes adaptados ao longo do tempo às condições edafoclimáticas, pondo em risco os rebanhos existentes que são importantes no cenário da sustentabilidade local.

O clima, na região do Nordeste do Brasil, é caracterizado por apresentar variações temporais e espaciais da precipitação pluviométrica, e elevadas temperaturas ao longo do ano. Nesta região, ocorrem também alterações no desempenho reprodutivo de caprinos às mudanças climáticas, apesar do fotoperíodo não ser fator limitante.

A eficiência reprodutiva é o principal fator para o aumento do rebanho, sendo a taxa de fertilidade, em grande parte, influenciada pelo macho. Desse modo, é importante que dentre os parâmetros utilizados para sua seleção, estejam as características reprodutivas.

A avaliação clínico-andrológica é a técnica mais utilizada para prever a fertilidade em caprinos. Contudo, apesar das características físicas, químicas e microscópicas do sêmen definirem critérios mínimos para a seleção e utilização de reprodutores, as mesmas apresentam capacidade limitante, devido à baixa correlação com o potencial de fertilidade dos animais. Isso leva os pesquisadores a desenvolverem metodologias adequadas e confiáveis para a previsão da fertilidade do sêmen caprino, visto que a eficiência reprodutiva é a característica mais importante em qualquer sistema de criação, o que sugere que outros fatores, possivelmente bioquímicos, estejam envolvidos no processo de interação do espermatozoide com o ovócito.

Portanto, teve início, o estudo das moléculas de proteínas presentes no plasma seminal sobre as funções espermáticas e, conseqüentemente, sobre a fertilidade dos reprodutores. O uso das biotecnologias avançadas como a técnica de eletroforese bidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e espectrometria de massa, têm proporcionado a identificação e caracterização das proteínas, com resultados interessantes e promissores para a reprodução.

A relação entre estas proteínas e outras características ligadas à eficiência reprodutiva, podem levar ao desenvolvimento de métodos que propiciem uma melhor predição da capacidade fertilizante de animais mantidos a campo ou confinados, evitando a utilização de caprinos de baixa fertilidade, diminuindo assim, os prejuízos decorrentes desses fatores sobre a produção. Entretanto, os mecanismos moleculares de ação destes polipeptídeos em caprinos ainda não foram elucidados, uma vez que poucas proteínas foram identificadas e caracterizadas.

No presente trabalho, procurou-se identificar, caracterizar e comparar o perfil de proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco e chuvoso, bem como correlacionar as proteínas com as características espermáticas e a fertilidade.

## **CAPÍTULO 1**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

## INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, estando presente em áreas sob as mais diversas características climáticas, edáficas e botânicas (Correia, 2007).

Segundo a FAO (2009), o Brasil possui o 9º maior rebanho mundial de caprino, sendo que o Nordeste centraliza a maior parcela do efetivo caprino, com 93,0% dos animais, e ocupa uma área de 166,3 milhões de hectares, dos quais 95,2 milhões (57%) estão inseridos na zona semiárida (ANUALPEC, 2005; CONAB, 2006). A Bahia, Pernambuco, Piauí e o Ceará são os estados brasileiros com maior participação na caprinocultura. O Ceará (Figura 1) possui 11,1% do efetivo total de caprino no Brasil, com cerca de 1,024 milhões de cabeças, sendo Tauá, o município de destaque no estado (IBGE, 2010).

A avaliação da fertilidade de caprinos está associada a uma série de variáveis, que vão desde os aspectos comportamentais, passando pelos exames clínicos, físicos e morfológicos do sêmen e das medidas testiculares. Entretanto, constata-se que há variação na fertilidade desses animais aprovados por meio dos exames andrológicos, o que sugere que outros fatores, possivelmente bioquímicos presentes no plasma seminal, estão envolvidos na expressão do potencial reprodutivo do macho (Jobim et al., 2005; Töpfer-Petersen et al., 2005; Villemure et al., 2003).

O plasma seminal é um fluido com função essencial para as atividades espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação até a fecundação (Kraus et al., 2005). Durante o transporte, através do epidídimo, e na ejaculação, os espermatozoides adquirem várias proteínas oriundas do fluido epididimário e das secreções das glândulas acessórias.

As proteínas do plasma seminal estão envolvidas em vários processos, visando preservar a viabilidade do espermatozoide, as interações do trato reprodutor feminino com o processo de fertilização (Töpfer-Petersen et al., 2005) e são bons candidatos para os marcadores de fertilidade.

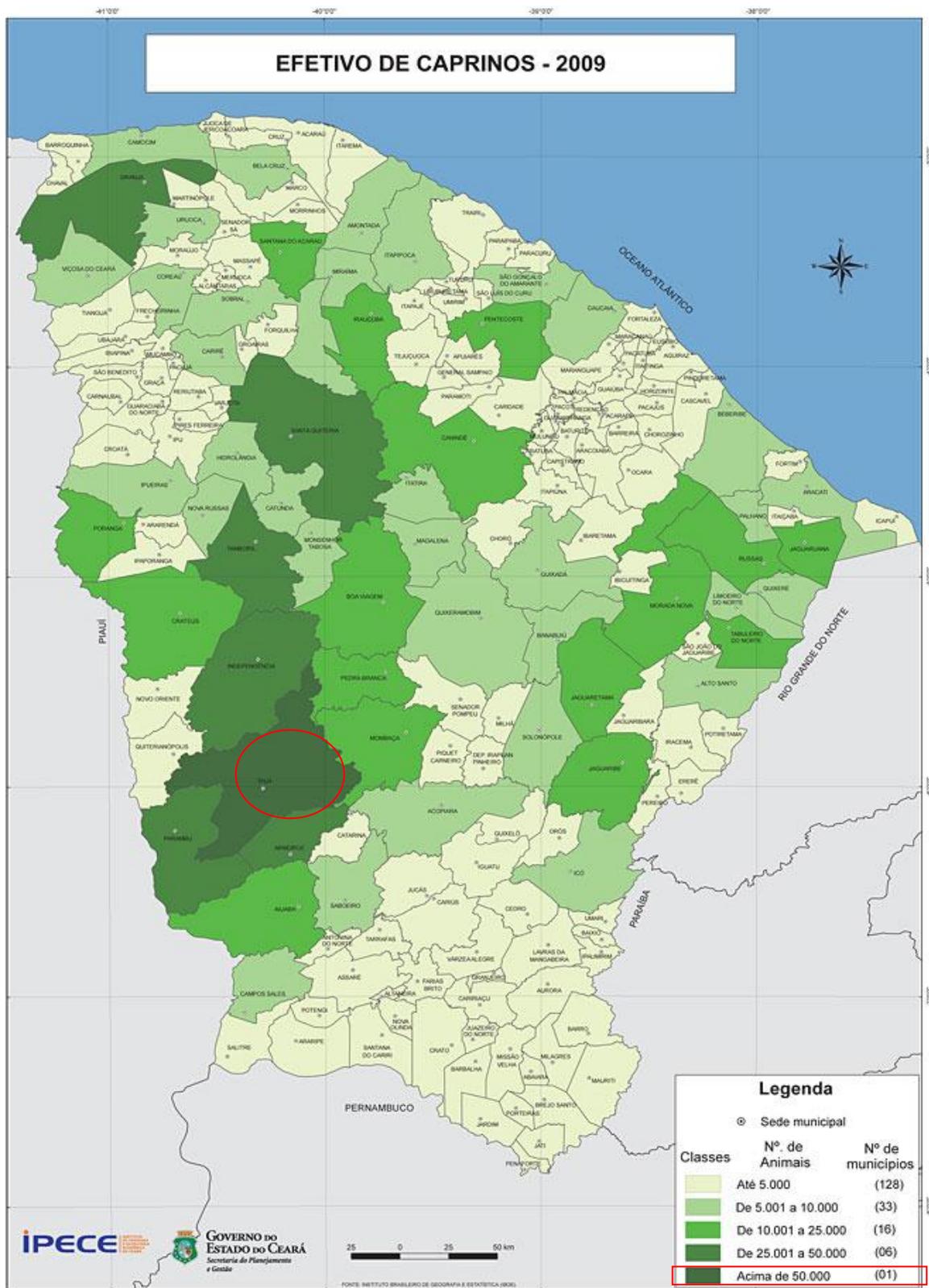


Figura 1. Efetivo do rebanho caprino em 2009 no estado do Ceará. Destaque de vermelho na cidade de Tauá (IPECE, 2009).

## ASPECTOS GERAIS DA RAÇA MOXOTÓ

O primeiro registro de que se tem notícia acerca da presença dos caprinos no Nordeste data de 1535, início do período colonial do Brasil. Oliveira et al. (2004) e Ribeiro et al. (2004), reportam que na época da colonização do Brasil, os caprinos, juntamente com outros animais domésticos, foram trazidos da Península Ibérica, e introduzidos através dos três principais pólos de colonização do país: São Vicente (1534); Recife (1535) e Salvador (1550). A partir dessas áreas, os caprinos foram difundidos para outras regiões do Brasil.

No Nordeste, as raças nativas representam valioso material genético, pois se caracterizam como animais altamente adaptados devido ao processo de seleção natural a que foram submetidos ao longo dos cinco séculos. Contudo, o processo de adaptação desses animais às condições adversas da região, implicou em redução do seu desempenho produtivo e reprodutivo, passando estes a apresentar níveis de produção proporcional ao ambiente que lhes foi oferecido. Por esse motivo, já existia há algumas décadas a preocupação com a melhoria da qualidade dos animais nativos (Silva et al., 2001; Rocha et al., 2007).

Dentre as raças nativas, a Moxotó (Figura 2), também chamada por “Lombo Preto”, possui a maior população comparada com as outras raças (Rocha et al., 2007). Desde 1955, Domingues recomendou que a cabra Moxotó fosse explorada para a produção de pele, considerando, também, a possibilidade da produção de carne, e que, a seleção deveria respeitar um mínimo de 34 kg de peso vivo ao abate, a fim de melhorar o porte e torná-la mais produtiva. Moxotó foi a primeira raça caprina nativa brasileira a ser reconhecida e homologada em 1993, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Caprinos (ABCC, 2000).

A origem do nome Moxotó provém do vale do Rio Moxotó, em Ibimirim – Inaiá, no estado de Pernambuco, onde se formou a raça. Na atualidade é criada, principalmente, na Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí (Machado et al., 2000). Os animais pertencentes a essas raças são de pequeno porte, medindo em torno de 62 cm de altura, alcançando peso à maturidade de 50 Kg e são

classificados como raça de aptidão múltipla para pele, leite e carne (Rocha et al., 2007). Tais animais apresentam pelagem branca ou baia, com uma lista negra que se estende de bordo superior do pescoço à base da cauda. Possuem uma auréola negra em torno dos olhos e duas listras negras que descem até à ponta do focinho. As orelhas são pequenas e as mucosas, as unhas e o úbere são pigmentados. São animais destinados à produção de pele, mas que estão sendo melhorados para produção de leite e carne (Ribeiro et al., 2004).



Roberta Vianna do Valle (01/07/10)

Figura 2. Caprinos da raça Moxotó

## SAZONALIDADE REPRODUTIVA DE PEQUENOS RUMINANTES

A sazonalidade reprodutiva é uma propriedade importante na limitação da produtividade dos pequenos ruminantes (Arrebola et al., 2010). Os caprinos, do ponto de vista reprodutivo, são conhecidos como animais estacionais de dias

curtos, ou seja, tornam-se sexualmente ativos em resposta à diminuição da duração dos dias.

Em regiões de clima temperado, cujas latitudes são superiores a 35°, o fotoperíodo é o principal fator ambiental que regula a sazonalidade reprodutiva em caprinos, ou seja, são condicionados pelo número diário de hora de luz ao longo do ano (Chemineau et al., 1992; Chemineau et al., 1999). O fotoperíodo modula o comportamento sexual e a atividade testicular, via alterações no padrão de secreção de melatonina pela glândula pineal durante a fase escura do ciclo claro e escuro (Nagy et al., 2000). Todavia, o completo mecanismo de ação deste hormônio ainda não está totalmente esclarecido (Azevêdo et al., 2008).

Reprodutores caprinos originados das regiões temperadas geralmente exibem variação sazonal da atividade reprodutiva. Assim, Delgadillo e Chemineau (1992) demonstraram que as raças Alpina e Saanen mantidas a 46° latitude N, com a diminuição da duração do dia no outono é acompanhado por um aumento na produção de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) e dos níveis de testosterona, com a secreção máxima e uma diminuição dos níveis de prolactina em setembro. Corroborando com esta afirmação, Lincoln et al. (1998) relatou que a prolactina atua diretamente nos testículos de carneiros junto com o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), possivelmente regulando o ciclo testicular nesta espécie.

Já em latitudes inferiores a 25°, como no clima tropical característico do Nordeste brasileiro, os caprinos são considerados poliéstricos contínuos por se reproduzirem ao longo do ano (Nunes, 1988). Nestas regiões, as variações da temperatura, da umidade relativa do ar e a distribuição de chuvas provavelmente exerçam mais efeito sobre os aspectos reprodutivos dos caprinos (Pacheco e Quirino, 2010). Estas variações ambientais também afetam a qualidade das pastagens, interferindo indiretamente nas características ligadas à reprodução e provavelmente exerçam mais efeitos sobre as características reprodutivas dos pequenos ruminantes (Rosa e Bryant, 2003). Nessa região, os caprinos apresentam uma atividade espermatogênica aceitável durante todo o ano. No entanto, os efeitos da época do ano em que o clima se apresenta chuvoso e seco,

sobre a qualidade do sêmen de pequenos ruminantes, tem sido tema de diversas pesquisas conduzidas no Nordeste brasileiro. Freitas e Nunes (1992) observaram que os carneiros da raça Santa Inês, criados no Ceará, não apresentaram diferenças significativas na motilidade e morfologia espermática nos períodos seco e chuvoso, evidenciando a adaptabilidade dessas raças às condições climáticas da região. Em condições de altas temperaturas, a capacidade aumentada do comportamento sexual de reprodutores caprinos é uma característica que pode ser selecionada, de forma indireta, para o aperfeiçoamento de raças nas regiões de clima tropical, como no Nordeste brasileiro (Pacheco e Quirino, 2010).

Na espécie caprina no semiárido paraibano, Silva et al. (2005) estudando reprodutores mestiços (Anglo Nubiano x SRD) verificaram que para os parâmetros seminais como, vigor, motilidade e percentagem de espermatozoides vivos não obtiveram diferença significativa, devido encontrar-se bem adaptados a essa região. As observações de Souza et al. (2009) corroboraram parcialmente com esses autores, ao relatarem que não houve alteração na concentração, motilidade progressiva e vigor espermático em caprinos da raça Alpino Americana no agreste pernambucano.

Contudo, estudos mostraram uma diminuição na qualidade das características seminais dessas espécies, tais como volume do ejaculado (Teixeira et al., 2009; Souza et al., 2009), aspecto (Teixeira et al., 2009), turbilhonamento (Vieira et al., 2008), motilidade progressiva (Campos et al., 2004; Vieira et al., 2008), concentração (Silva et al., 2005; Teixeira et al., 2009), vigor (Vieira et al., 2008) e morfologia espermática (Vieira et al., 2008; Maia et al., 2011) durante o período seco, sugerindo que seja decorrente do estresse térmico (Silva et al., 2005; Aguiar, 2008) e/ou da baixa disponibilidade de forragens de boa qualidade nutritiva (Campos et al., 2003; Vieira et al., 2008). De acordo com Fatet et al. (2011), o efeito da estacionalidade pode ser confundido com o estresse nutricional que, aliado ao estresse térmico, estabelece efeito deletério sobre a reprodução.

O efeito nocivo das altas temperaturas na produção espermática ocorre devido a um aumento na temperatura testicular, que ocasiona degenerações específicas, com surgimento de alterações espermáticas em momentos críticos e precisos do

ciclo espermatogênico (Nunes, 2001). A temperatura ambiental a qual os espermatozoides caprinos são afetados situa-se em torno de 29 a 30 °C, mas a sensibilidade dos bodes à temperatura ambiental varia de acordo com a raça e local de criação (Nunes, 2001).

Esses fenômenos, acima descritos, estão relacionados com a redução da fertilidade do macho na região tropical, causada pelas alterações na expressão protéica das células de Sertoli (Ikeda et al., 1999). No entanto, há escassez de estudos que esclareçam com detalhes sobre as relações das variações espermáticas com as condições climáticas em animais que habitam na região tropical.

## **SÊMEN CAPRINO**

O sêmen consiste de uma suspensão celular líquida de espermatozoides no plasma seminal (Hafez e Hafez, 2004). O sêmen do bode possui características físicas e bioquímicas específicas, que podem variar mesmo dentro da espécie caprina, dependendo da raça e do indivíduo, da idade do mesmo, da época do ano, do método de coleta (vagina artificial ou eletro-ejaculador), da alimentação do animal (Corteel, 1977) e do número de coletas a que o animal é submetido (Mies Filho, 1987). Durante a ejaculação, os espermatozoides previamente estocados na porção caudal do epidídimo, são misturados com secreções produzidas nas glândulas sexuais acessórias (Way et al., 2000).

O espermograma, segundo Hafez e Hafez (2004), é o método ideal para avaliar a fertilidade do reprodutor, além de sua habilidade de produzir a gestação. Contudo, a busca por marcadores seminais que possam identificar precocemente animais de maior fertilidade trará grande ganho aos sistemas de criação, pois propiciará cada vez mais o avanço genético em um menor intervalo de tempo.

## **Avaliação da qualidade seminal**

O volume, a cor, o aspecto e o odor compreendem as características físicas do ejaculado (Mies Filho, 1987). Já os caracteres microscópicos são a motilidade, o vigor, a concentração e a patologia espermática, com o intuito de se obter informações a respeito do estado da espermatogênese e do potencial de fertilização do espermatozoide. Estes testes são, frequentemente insuficientes e não podem avaliar a real habilidade de fertilização (Mello et al., 2005).

A avaliação macroscópica e microscópica do material seminal permite determinar a qualidade, a viabilidade, o número estrutural e funcionalmente normais relacionado com a capacidade fecundante do sêmen (Aisen e Venturino, 2008). Entretanto, não se dispõe de uma prova única para detectar com exatidão a fertilidade dos ejaculados, mas a combinação cuidadosa de vários testes (Hafez e Hafez, 2004; Aisen e Venturino, 2008).

Deste modo, têm-se buscado identificar animais capazes de produzir ejaculados com um maior número de espermatozoides morfologicamente normais, dotados de alta motilidade progressiva e aptos a executar a fertilização (Garcia, 2006). As características físicas, químicas e caracteres microscópicos devem ser levados em consideração, além de exames sanitários, para a predição da fertilidade do sêmen.

## **ESPERMATOZOIDES**

O espermatozoide ou gameta masculino é a célula reprodutiva masculina produzida pelos testículos (França et al., 2005), torna-se maduro no epidídimo (Dacheux et al., 2005) e é capaz de fertilizar o ovócito, a célula reprodutiva feminina, e formar o zigoto, dando origem a um novo organismo (Hafez e Hafez, 2004). É composto de estruturas que (Figura 3), se afetadas, comprometem a

capacidade de fecundação, em especial, as membranas plasmáticas e acrossomal que são fundamentais durante a capacitação espermática. (Salviano et al., 2011).

Nos caprinos, o volume e a concentração de espermatozoides no ejaculado variam com o tamanho do testículo; atividade reprodutiva, frequência de coletas (Maia et al., 2011) e período do ano (Teixeira et al., 2009).

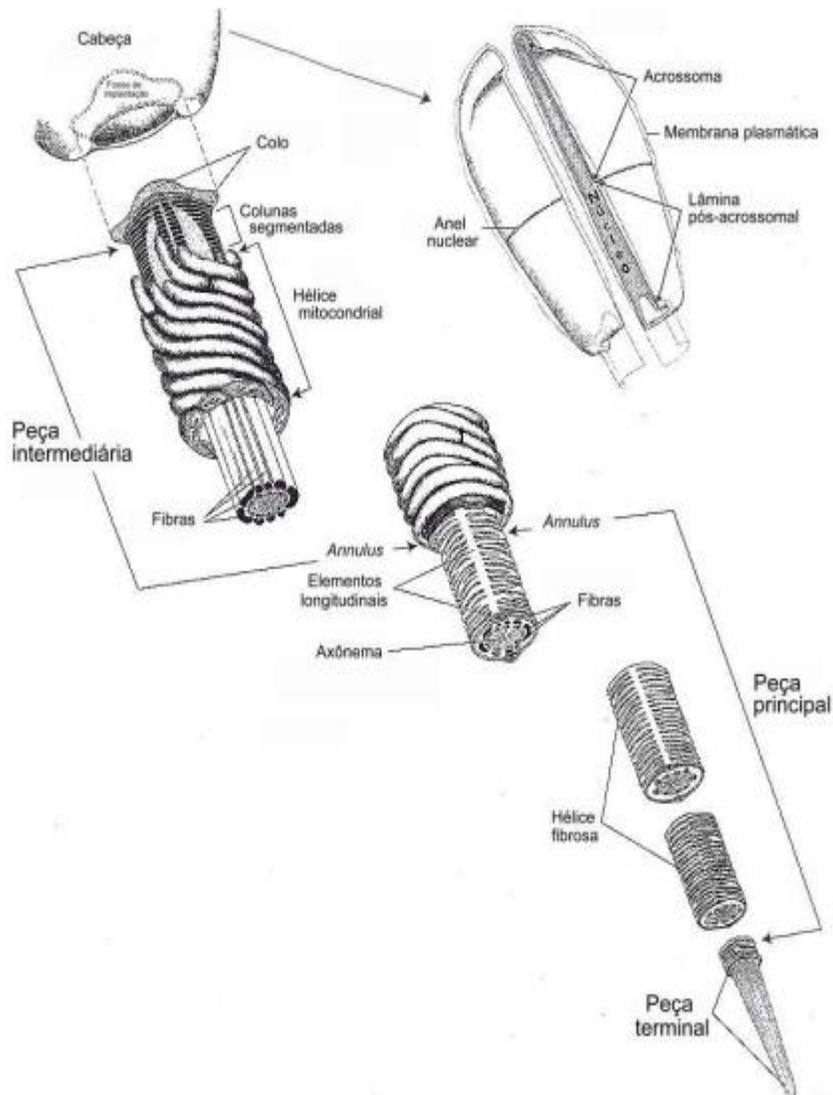


Figura 3. O espermatozoide e suas estruturas internas (Fonte: adaptado de Senger, 2003)

## PLASMA SEMINAL E SUAS CARACTERÍSTICAS

### Composição

Em caprinos, como em outros mamíferos, o plasma seminal é um fluido bioquimicamente complexo, formado pelas secreções dos testículos (*rede testis*), das glândulas sexuais acessórias (próstata, vesículas seminais e bulbouretrais), bem como, dos epidídimos, ductos deferentes e ampolas dos ductos deferentes (Nunes, 2001; Thomas et al., 2003; Hafez e Hafez, 2004; Pesh et al. 2006). De acordo com Miller et al. (1990), a maior parte do plasma seminal se integra aos espermatozoides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas. O mesmo contém vários componentes bioquímicos, alguns com efeito benéfico (Barrios et al., 2005) e outros deletério (Leboeuf, 2000) de extrema importância para o funcionamento e sobrevivência dos espermatozoides (Strezezek et al., 1992).

Estudando sêmen de caprinos, Roy (1957) relatou que o plasma apresenta um fator de diferenciação relevante sintetizado e secretado pelas glândulas bulbouretrais que provoca coagulação e toxicidade para o esperma com utilização de diluentes com gema de ovo na criopreservação.

A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada espécie. Constituído, em geral, por compostos orgânicos e inorgânicos, entre estes, íons, como sódio, potássio, cloreto e magnésio (Hafez e Hafez, 2004), açúcares, aminoácidos, lipídeos, carboidratos e as proteínas especiais, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, inibidores, imunossuppressores, substâncias ligadas aos andrógenos, inibina, imunoglobulinas IGA (antimicrobianos); sendo os constituintes orgânicos mais abundantes (Frazer e Bucci, 1996). Possui, além desses, substâncias que agem como antioxidantes, entre eles, a vitamina E, a vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (Almeida e Ball, 2005). De acordo com Frazer e Bucci (1996), o plasma seminal

pode estar envolvido com a fertilidade dependendo da presença ou ausência dessas substâncias.

### **Proteínas do plasma seminal ligadas a funções espermáticas e fertilidade**

Para avaliar aspectos da reprodução dos machos, o exame andrológico apresenta limitada relação com os índices de fertilidade *in vivo* (Killian et al., 1993). Assim, de acordo com Rodrigues (1997), estudos bioquímicos do sêmen, de várias espécies, podem detectar problemas com as glândulas acessórias, variações na atividade plasmática e no sistema enzimático dos espermatozoides, fatores que contribuem na escolha de um reprodutor.

Considerando-se que a função espermática após a espermatogênese é modulada de forma significativa por alterações pós-traducionais de proteínas celulares, a análise proteômica dos fluidos reprodutivos fornece informações importantes para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos e, conseqüentemente, dos reprodutores (Calvete et al., 1994; Leeb et al., 2005; Moura et al., 2011).

Ocorrendo em diferentes tipos, desde peptídeos relativamente pequenos até enormes polímeros com alto peso molecular, as proteínas são moléculas orgânicas formadas pelo encadeamento de aminoácidos, através de ligações peptídicas (Nelson e Cox, 2004).

As proteínas do plasma seminal são substâncias originadas do plasma sanguíneo, epidídimo e, principalmente das glândulas sexuais acessórias (Töpfer-Petersen et al., 2005; Jobim et al., 2011).

Existe evidência direta de que algumas dessas proteínas possam afetar a morfologia espermática, a motilidade, a reação acrossômica, a capacitação espermática, e o transporte dos espermatozoides, melhorando a ovulação, o aumento do fluxo sanguíneo para o útero e tubas uterinas e, em conseqüência, a fertilidade (Töpfer-Petersen et al., 2005). No entanto, certas proteínas do plasma

seminal têm sido descritas como fatores da infertilidade (Brandon et al., 1999), enquanto outras proteínas ligadas a heparina têm sido associadas com a fertilidade (Miller et al., 1990).

Além disso, algumas destas proteínas não apenas são importantes para adquirir a capacidade de fertilização, mas também para manter a viabilidade dos espermatozoides já foram relatadas por Brandon et al. (1999) e, Asadpour e Tayefi-Nasrabadi (2012).

Há pesquisas sobre a contribuição das proteínas do plasma seminal na criopreservação em machos de várias espécies, incluindo touro (Roncoletta et al., 2000; Jobim et al., 2004; Manjunath et al., 2007), carneiro (Rebolledo et al., 2007), búfalo (Hiron et al., 2006; Asadpour et al., 2007) e suíno (Casas et al., 2009). Estudando o efeito da sazonalidade das proteínas do plasma seminal de carneiro, Pérez-Pé et al. (2001) verificaram que esse composto na criopreservação pode causar danos a integridade da membrana dos espermatozoides.

Segundo Smith et al. (1999) variações sazonais observadas na quantidade e qualidade das proteínas do plasma seminal são provavelmente devido ao efeito diferencial do plasma seminal na proteção das células, sendo este efeito protetor relacionado com a atividade da enzima antioxidante (Marti et al., 2007). O plasma seminal possui um sistema antioxidante que pode ser relevante para a proteção dos espermatozoides, como o caso das enzimas oxidativas de defesa que incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (Asadpour e Tayefi-Nasrabadi, 2012). A proteína ácida do fluido seminal (aSFP) também está relacionada com a inibição do estresse oxidativo do espermatozoide, além da prevenção do ataque imunológico (Moura et al., 2006)

As proteínas do plasma seminal possuem propriedades inerentes a cada espécie, podendo diferir entre estrutura e função das proteínas espermáticas. As principais proteínas ácidas contidas no plasma seminal dos bovinos representam uma família denominada proteínas BSP (Bovine Seminal Plasma). Designadas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 (15-17 kDa), BSP-30 (28-30 kDa) e BSP-1, conhecida também como PDC-109, secretadas pela vesícula seminal (Frazer et al., 1996;

Müller et al., 1998). Estudos observaram que o sítio de ligação dessas cinco proteínas, na superfície dos espermatozoides, parecem ser lipídios, principalmente fosfolipídios que contém o grupo fosforicolina (Desnoyers e Manjunath, 1992). Segundo Müller et al. (1998), as proteínas PDC-109 têm consequências para a propriedade física da membrana do espermatozoide. Além disso, de acordo com trabalhos recentes, as proteínas BSP diminuem após a criopreservação, o que pode indicar uma nova função das proteínas (Jobim et al., 2004).

Em estudo realizado com bovinos da raça Holandesa, pesquisadores encontraram quatro proteínas relacionadas à fertilidade, sendo duas proteínas (26 kDa, pI 6,2; 55kDa, pI 4,5) predominantes em touros de alta fertilidade e, duas proteínas (16 kDa, pI 6,7; 16 kDa, pI 4.1) em touros de baixa fertilidade (Killian et al., 1993). Cancel et al. (1997) relataram pela primeira vez a presença da família osteopontina no plasma seminal de bovinos, corroborando com Killian et al. (1993), relatando que a proteína 55 kDa é uma osteopontina associada a fertilidade.

As proteínas seminais dos equinos foram caracterizadas nas últimas décadas. Calvete et al. (1994) isolaram a maioria das proteínas do plasma seminal dos eqüinos, como as HSP-1 a HSP-8, com baixa massa molecular (14-30 kDa). Com exceção da HSP-4, todas têm ligação às funções espermáticas.

As proteínas HSP-1 ou SP1 (22-25 kDa), HSP-2 ou SP2 (25 kDa, pI 6,5-6,9), HSP-7 (14 kDa) e HSP-12 kDa pertencem à família das espermadesinas (Töpfer-Petersen et al., 2004; Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005). As HSP-1, HSP-2, HSP-5 e HSP-8, segundo Töpfer-Petersen et al. (2005), possuem capacidade de ligação à heparina, e foram associadas com a superfície da célula espermática, indicando uma função potencial de fertilização. Em recente estudo com plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade, Jobim et al. (2011) identificaram as proteínas CRISP-3 (80-85 kDa; pI 7,54) e HSP-2 (18,2 kDa e pI 5,0 -5,2).

Nos pequenos ruminantes, em comparação com as outras espécies domésticas, há poucos trabalhos com proteínas seminais, não se conhecendo muito sobre os eventos moleculares de capacitação dos espermatozoides e dos fatores do plasma seminal que afetam o armazenamento de esperma de caprinos

e ovinos. A identificação e caracterização de proteínas envolvidas nestes processos ajudaria uma maior compreensão dos mecanismos reprodutivos (Villemure et al., 2003).

Ao estudar carneiro (*Ovis aries*), Barrios et al. (2005) isolaram as proteínas RSVP14 e RSVP20, com aproximadamente 14 e 20 kDa, respectivamente, e observaram que são exclusivamente sintetizadas nas vesículas seminais (Fernández-Juan et al., 2006), são responsáveis por este efeito protetor das células espermáticas. Estudando as principais proteínas do plasma seminal de carneiros da raça Sullfok, Bergeron et al. (2005), identificaram e caracterizaram a proteína 15,5 kDa como espermadesina. Também a proteína da família BSP e denominadas RSP, designadas como RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa, and RSP-24 kDa.

Já, La Falci et al. (2002), investigando as mudanças sazonais em proteínas do plasma seminal de caprinos Saanen, em condições naturais no sul do Brasil, observaram diferenças importantes no padrão de proteínas com afinidade a heparina (HBPs), tais como uma banda de 178 kDa, únicas para a estação monta; uma diminuição em 119 kDa e um aumento das proteínas variando de 73 a 104 kDa. Essas proteínas, as HBPs, representam as principais proteínas ácidas encontradas no plasma seminal, e são secretadas pela vesícula seminal e ligadas ao espermatozoide depois da ejaculação (Desnoyers e Manjunath, 1992).

Relatado por La Falci et al. (2002) a presença de HAPs no plasma seminal de caprinos, trabalhos seguintes, como o de Villemure et al. (2003) isolaram quatro bandas protéicas no plasma seminal de caprinos homologas a família das proteínas BSP, denominadas GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa e GSP-22 kDa, de acordo com seu peso molecular. A proteína BSFP foi a primeira espermadesina caracterizada em plasma seminal de caprinos (Texeira et al., 2002). Depois, também em estudos com caprino, Melo et al. (2008), identificaram quatro genes descritos por espermadesina, Bdh-1 a Bdh-4, e a BSPF foi renomeada de Bdh-2.

Em um recente estudo na região Nordeste do Brasil, Souza et al. (2009) identificaram no plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana, nos

períodos de baixo e alto índice pluviométrico, proteínas com massa molecular relativa de 4 a 106kDa e de 15 a 97kDa e ponto isoelétrico de 3,00 a 8,96 e de 4,48 a 9,83, respectivamente. Entretanto, apenas no período de alto índice pluviométrico, em que o sêmen apresentou melhor qualidade, foram observadas as proteínas de 13 kDa e 45kDa.

Assim, diversos estudos, com proteínas do plasma seminal, estão sendo desenvolvidos em busca de possíveis indicadores de fertilidade com objetivo de elucidar as interações entre esses compostos e os espermatozoides desde a ejaculação até a fertilização. Contudo, poucos estudos tratam do perfil protéico do plasma seminal de caprinos no decorrer do ano.

## **MÉTODOS DE ESTUDOS DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL**

### **Eletroforese bidimensional**

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) é um dos métodos mais utilizados para caracterização do proteoma (Klose, 1975; O'Farrell, 1975) e que, com o decorrer do tempo tem passado por ajustes constantes proporcionando resultados cada vez melhores. Tem sido utilizado para a separação e caracterização de várias proteínas de plasma seminal de touro (Jobim et al., 2004; Moura et al., 2006), carneiro (Souza et al., 2004.; Jobim et al., 2005), caprinos (La Falci et al., 2002; Villemure et al., 2003; Souza et al., 2009), equino (Heise et al., 2010), suíno (Novak et al., 2010) e humano (Kumar et al., 2009). As proteínas, nessa técnica, são separadas com base em duas etapas: numa primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e, numa segunda dimensão, em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com sua massa molecular (MM) (O'Farrell, 1975). Contudo, ainda é um processo caro, trabalhoso e demorado, limitando análises em larga escala da

expressão protéica (Park, 2004). Quando bem sucedida obtêm-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos *spots*, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína (Santos et al., 2004).

As proteínas apresentam grupos carregados de ambas as polaridades e, portanto, possuem um ponto isoelétrico, que é o pH no qual a proteína é imóvel em campo elétrico. Quando o *pool* de proteínas é submetida à eletroforese por meio de uma solução que possua um gradiente de pH estável, na qual aos poucos o pH aumenta, do ânodo para o cátodo, cada proteína migrará para uma posição de gradiente de pH, que condiz ao seu *pI*. Se uma molécula protéica difundir para fora dessa posição, sua carga mudará à medida que ela for para uma região diferente de pH, e as forças eletroforéticas resultantes propagaram as proteína de volta para a sua posição isoelétrica, que pode ser de até 0,01 unidade de pH. Por isso, essa técnica foi denominada focalização isoelétrica (Voet e Voet, 2006).

Após a etapa de focalização isoelétrica, seguiu-se a eletroforese de proteínas que é geralmente executada em géis de um polímero que exibem ligações cruzadas, a poliacrilamida, e o comumente usado é o detergente de duodecil sulfato de sódio (SDS). O gel de poliacrilamida funciona como uma malha molecular, em que as moléculas de menor peso migram verticalmente mais facilmente pelo gel e as moléculas de maior peso molecular ficando retidas na porção superior do gel (Rocha et al., 2005).

O gel é corado com o *Commassie Blue* para permitir a visualização dos *spots*, cada um representando uma modificação distinta do estado da proteína (Patton et al., 2002). Para análise da imagem utiliza-se *software* específico, que permite a contagem do número de *spots* por gel, verifica a intensidade do volume de cada *spot*, comparando-as com os *spots* de diferentes géis, entre outros recursos.

## Espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica altamente sensível e versátil, criada há mais de 100 anos, pelo ganhador do prêmio Nobel Sir J. J. Thompson, que identificou íons de pequena massa molecular em um espectrógrafo de massa. Desde então, a MS está sendo uma importante ferramenta na proteômica por tornar possível identificar rapidamente um grande número de proteínas. O objetivo da técnica é identificar as proteínas, codificadas por genes e determinar suas funções no organismo do hospedeiro (Bergquist et al., 2007).

As vantagens da MS incluem sensibilidade, rapidez e aplicação de misturas complexas. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, a MS têm sido destacada não apenas para estudos de estruturas primárias de proteínas, mas também como a tecnologia central para o campo de proteômica (Steen e Mann, 2004)

Medidas por MS são efetuadas a partir de analitos ionizados e ejetados para dentro de um espectrômetro de massa. Por definição, um espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes sólidos ou líquidos em íons de fase gasosa e mede a sua massa molecular. Os íons moleculares são separados de acordo com sua relação massa-carga ( $m/z$ ) (Mann et al., 2001).

No esquema da Figura 4 é apresentado um diagrama da funcionalidade básica de um espectrômetro de massas. De acordo com esse esquema a análise de um composto em um espectrômetro de massas segue alguns passos: Introdução da amostra, ionização das moléculas, passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão  $m/z$ , detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica, onde a magnitude do sinal elétrico em função da  $m/z$  é convertida por um processador de dados proporcionando um espectro de massas correspondente (Marvin et al., 2003; Gross, 2004).

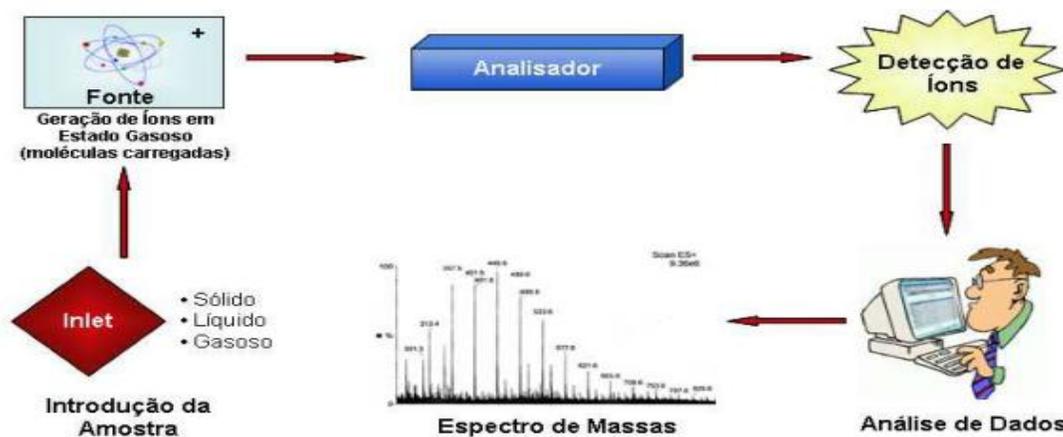


Figura 4. Diagrama de funcionamento de um espectrômetro de massa (Applied Biosystems, 2005)

Em 2002, John B. Feen e Koichi Tanaka receberam o prêmio Nobel em química pelo aprimoramento das técnicas de ionização por eletronspray (ESI) e ionização por remoção a *laser* assistida por matriz (MALDI), respectivamente. Essas técnicas são consideradas brandas pela sua capacidade de gerar íons a partir de macromoléculas não voláteis sem ou com pouca fragmentação das moléculas analisadas e, atualmente utilizadas para ionização de proteínas e sua subsequente identificação (Köpke, 2003). Segundo Aebersold e Goodlet (2001), o equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo (ToF), é aplicado normalmente para execução da impressão digital de peptídeos de proteínas e outras moléculas.

As análises proteômicas são hoje uma ferramenta valiosa na determinação da presença de biomarcadores ou no mapeamento de perfil dos mesmo dentro de grupo de amostras diferentes, por exemplo, em indivíduos deonte e sadios, de alta e baixa fertilidade ou congelabilidade, assim como o efeito da sazonalidade na reprodução. As proteínas são provavelmente as moléculas mais afetadas quando as doenças são diagnosticadas e, além de refletirem a fisiologia celular (Aebersold et al., 2005), também podem refletir a fertilidade, variação sazonal ao longo do ano, congelabilidade espermática. Dessa forma, há uma grande expectativa na descoberta de muitos biomarcadores protéicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERSOLD, R.; ANDERSON, L.; CAPRIOLI, R. DRUKER, B.; HARTWELL, L.; SMITH, R. Perspective: a program to improve protein biomarker discovery for cancer. **Journal of Proteome Research**, v.4, p.1108-1109, 2005.
- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, v.101, n.2, p.269-296, 2001.
- AGUIAR, G.V. **Efeito individual e da época do ano sobre a composição do plasma seminal e a qualidade do sêmen caprino resfriado a 4°C por 48 horas do estado do Ceará**. 2008. 114f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- AISEN, E.G.; VENTURINO, A. coleta e avaliação do sêmen. IN: AISEN, E.G. **Reprodução Ovina e Caprina**, 1ª Ed. Editora MedVet Livros, São Paulo –SP, p. 57-72, 2008.
- ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321-337, 2005.
- ANUALPEC: **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP, 2005.
- APPLIED BIOSYSTEMS (Org). **Espectrometria de massas e suas aplicações**. São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005. 40 p.
- ARREBOLA, F.; PÉREZ-MARÍN, C.C.; SANTIAGO-MORENO, J. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. **Small Ruminant Research**, v.89, p.31-35, 2010.
- ASADPOUR, R., ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; ASRI REZAILI, S.; ANSARI, M.H.K. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.308-312, 2007.
- ASADPOUR, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Seasonal variation in antioxidant enzyme activity in seminal plasma in Holstein bulls. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, p.173-176, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAPRINOS – ABCC. **Histórico**.2000. Disponível em: <<http://www.abccaprins.com.br/site/home.php>> Acesso em: 10/01/2011.

- AZEVEDO, D.M.M.R., MARTINS FILHO R., ALVES A.A., ARAÚJO A.A.; LÔBO R.N.B. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n.6, 2008.
- BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, v.26, p.539-549, 2005.
- BERGERON, A., VILLEMURE, M., LAZURE, C., MANJUNATH, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p.461-470, 2005.
- BERGQUIST, J.; HAKANSSON, P.; SUNDQUIST, B.; ZUBAREV, R. Mass spectrometry of proteins – Uppsala perspectives on past and present. **Internacional Journal of Mass Spectrometry**, v.268, p.73-82, 2007.
- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-873, 1999.
- CALVETE, J.J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H.; KLUG, E., et al. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.29, p.411-426, 1994.
- CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; MONTEIRO, A.W.U.; FIGUEIRÊDO, E.L.; PINHEIRO, J.H.T.P.; FERREIRA, M.A.L.; ARAÚJO, A.A. Viabilidade do sêmen caprino lavado e não lavado diluído em água de coco, resfriado e armazenado a 4° C. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p.178-182, 2004.
- CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; SILVA FILHO, A.H.S.; MONTEIRO, A.W.U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semiárido nordestino durante o período seco e chuvoso. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.3, p.185-189, 2003.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin Is the 55-Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1293-1301, 1997.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M. et al. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, v.72, p.930-948, 2009.
- CHEMINEAU, P. ; BARIL, G. ;LEBOEUF, B.; MAUREL, M. C.; ROY, F.; PELLICER-RUBIO, M.; MALPAUX, B.; COGNIE, Y. Implications of recent

- advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.54, p.129-142, 1999.
- CHEMINEAU, P.; DAVEAU, A.; MAURICE, F. et al. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. **Small Ruminant Research**, v.8, n.4, p.299-312. 1992.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Indicadores do rebanho ovino e caprino no Nordeste 2006**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/rebanho/ovino/caprino/index.php?PAG=5>> Acesso em: 16/2/2012.
- CORREIA, F.W.S. **Perfil Setorial da Caprinovinocultura no Mundo, Brasil, Nordeste e Sergipe**. 2007. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>> Acesso em: 20/5/ 2012.
- CORTEEL, J.M. Production, storage and insemination of goat semen. Symposium of reproduction in sheep and goats, 1977, Madison – University of Wisconsin. **Anais...**p.41-57, 1977.
- DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v.63, p.319-341, 2005.
- DELGADILLO, J.A.; CHEMINEAU, P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. **Journal Reproduction Fertility**, v.94, p.45-55, 1992.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.10149-10155, 1992.
- DOMINGUES, O. **A cabra na paisagem do Nordeste**. Fortaleza: Seção de Fomento & Agricultura do Ceará, 1955. 72p. (Publicação, 5).
- EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A.; TSOLOVA, M.; PETRUNKINA, A.; TÖPFER-PETERSEN, E. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig. **Biology of Reproduction**, v.73, p.536-545, 2005.
- FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.T; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.211-219, 2011.

- FERNÁNDEZ-JUAN, M.; GALLEGO, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Reproduction**, v.132, p.721-732, 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **FAOSTAT statistical databases**. [2009]. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=573&lang=es#ancor>>. Acesso em: 10/1/2012.
- FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v.63, p.300-318, 2005.
- FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M.; BROOKS, C.L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half- milliliter straws. **Theriogenology**, v.46, p.103-115, 1996.
- FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, p.95-104, 1992.
- GARCIA, A.R. O uso das sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. IN: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Belém. **Anais...Pará: CBRA**, 2006. CR-ROM.
- GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.
- HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução masculina. IN: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Editora Manole Ltda, Barueri – SP, p. 3-12, 2004.
- HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.48-53, 2010.
- HIRON, M.; HARSHAN, L.P.; SINGH, A.; ARANGASAMY, M.R.; ANSARI KUMAR, S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.93, n. 124-133, 2006.
- IKEDA, M.; KODAMA, H.; FUKUDA, J.; SHIMIZU, Y.; MURATA, M.; KUMAGAI, J.; TANAKA, T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biology of Reproduction**, v.61, p.393–399, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho.** 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=22&i=P>>. Acesso em: 10/01/2011.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ – IEPECE. **Efetivo do rebanho caprino no estado do Ceará.** 2009. Disponível em: <<http://www2.ipece.ce.gov.br/atlas/capitulo5/51/514/542x.htm>> Acesso em: 19/07/2012.

JOBIM, M.I.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B.; HORN, A.P.; MATTOS, R.C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.63, p.2053-2062, 2005.

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

JOBIM, M.I.M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R.M.; SIEME, H.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.76, p.765-771, 2011.

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

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v.26, p.231-243, 1975.

KÖPKE, A. [2003]. **Proteomics: a new drug Discovery tool.** Disponível: <<http://www.wita-proteomics.com>> Acesso em: 21/10/2011.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNICOVÁ, J.; JONÁKOVÁ, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, n.1, p.33-46, 2005.

KUMAR, V.; HASSAN, M.I.; TOMAR, A.K.; KASHAV, T.; NAUTIYAL, J.; SINGH, S.; SINGH, T.P.; YADAV, S. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. **Journal of Biosciences**. v.34, n.6, p.899–908, 2009.

- LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v.57, p.1035-1048, 2002.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- LEEB, T., SIEME, H., TÖPFER-PETERSEN, E. Genetic markers for stallion fertility – lessons from humans and mice. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.21-29, 2005.
- LINCOLN, G.A. Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in the mouflon ram (*Ovis musimon*). **Animal Reproduction Science**, v.53, n.1-4, p.87-105, 1998.
- MACHADO, T.M.M.; CHAKIR, M.; LOUVERGNE, J.J. Genetic distances and taxonomic trees between goat of Ceará States (Brazil) and goats of the Mediterranean region (Europe and Africa). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.121-125, 2000.
- MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.175-179, 2011.
- MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Spermatology**, v.65, p.217-228, 2007.
- MANN, M.; HENDRICKSON, R.C., et al. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.437-473, 2001.
- MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J.I.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.67, p.1446-1454, 2007.
- MARVIN, L.F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v.337, p.11-21, 2003.
- MELLO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.757-63, 2005.
- MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.; HAVT, A.; DA CUNHA, R.M.; MARTINS, D.B.; CASTELLETTI, C.H.; DE SOUZA, P.R.; FILHO, J.L.; FREITAS, V.J.; CAVADA, B.S, RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode

- new members of the spermadhesin family. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, n.1, p.8-16, 2008.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. Porto Alegre, Sulina. 6ª ed. V. 1, 314p., 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 of Reproduction**, v.42, p.899-915, 1990.
- MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A., RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.A.M.; OLIVEIRA, R.V.; MENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.139-144, 2011.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v.27, p.201-211, 2006.
- MÜLLER, P.; ERLEMANN, K.; MÜLLER, K.; JUAN, J.; CALVETE, E.D.D.A.; TÖPFER-PETERSEN, K.M.; HERRMANN, A. Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. **European Biophysics Journal**, v.27, p.33-41, 1998.
- NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.245-262, 2000.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 4º Ed. W.H. FREEMAN, 2004, p.92.
- NOVAK, S.; NCHEZ, A.R.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. **Journal of Andrology**, v.31, n.2, 2010.
- NUNES, J.F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.12, p.77-83, 1988.
- NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. IN: GOLSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela. p.111-126, 2001.
- O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v.250, p.4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, J.C.V.; ROCHA, L.L; MENEZES, M.P.C. Recursos genéticos existentes e suas características. IN: MENEZES, M.N.; GOMES FILHO, M.A.;

- DELGADO BERMEJO, J.V. **Conservação de raças caprinas nativas do Brasil: histórico, situação atual e perspectivas.** Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2004, 62 p.
- PACHECO, A., QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.87-97, 2010.
- PARK, K.O. Proteomic studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.300, p.133-138, 2004.
- PATTON, W.F.; SCHULENBERG, B.; STEINBERG, T.H. Two-dimensional gel electrophoresis: better than a poke in the ICAT? **Current Opinion in Biotechnology**, v.13; p.321-328, 2002.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.425-434, 2001.
- PESH, S.; BERGMAN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v.66, p.307-313, 2006.
- REBOLLEDO, A.D.; SIERRA, L.N.; TAMAYO, A.C.; LORIA, A.A.; DENIS, S.E., OSES, R.B., et al. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. **Revista Científica de Veterinária – Faculdade de Ciência Veterinária**, v.17, p.73-76, 2007.
- RIBEIRO, M.N.; GOMES FILHO, M.A.; BERMEJO, J.V.D. **Conservação de Raças Caprinas Nativas do Brasil: Histórico, Situação Atual e Perspectivas.** Editora: Maria Norma- Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2004. 62p.
- ROCHA, L.L. da; BENICIO, R.C., OLIVEIRA, J.C.V.; RIBEIRO, M.N; DELGADO, J.V. Avaliação morfoestrutural de caprinos da raça Moxotó. **Archivos de Zootecnia**, v.56, p.483-488, 2007.
- ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas. **Embrapa, Comunicado Técnico 136**, 2005.
- RODRIGUES, L.F. DE S. **Efeitos do método de colheita sobre os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de caprinos mestiços e ovinos deslanados da raça Santa Inês criados no estado do Ceará.** 1997, 67f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1997.

- RONCOLETTA, M.; MORANI E.S.C.; FRANCESCHINI P.H.; RAMOS P.R.R. Characterization of the plasma seminal protein 26 kDa and their relationship with bull semen freezability [in Portuguese]. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, p.321, 2000.
- ROSA, H.J.D., BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, p.155-171, 2003.
- ROY, A. Egg-yolk coagulation in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v.179, p.318-319, 1957.
- SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T.; VIDIGAL, K.F. Efeitos da fixação do sêmen pós-teste hiposmótico para avaliação da membrana espermática de caprinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.9, n.16, 2011.
- SANTOS, P.M.; TEIXEIRA, M.C.; CORREIA, I.S.A. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microorganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v.77, p.7-17, 2004.
- SENGER, P.L. **Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation & fertilization**. IN: Pathways to pregnancy e parturition. 2 ed. Moscow: Current conceptions, Inc, 2003. Cap.12, p.266-283.
- SILVA, F.L.R.; ARAÚJO, A.M.; OLIVEIRA, A.L. Características produtivas e parâmetros genéticos em caprinos da raça Moxotó do Nordeste do Brasil. **Revista Científica de Produção Animal**, v.3, n.1, 2001.
- SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P.; AZEVEDO. S.A.; AZEVEDO NETO, J.; SILVA, E.M.N.; SILVA, A.K.B. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.1, p.7-14. 2005.
- SIUZDAK, G. **Mass Analyzers and ion detectors**. IN: Mass spectrometry for biotechnology. Academic press em San Diego-Califórnia, 1996. Cap. 12, p.121.
- SMITH, J.; PARR, J.; MURRAY, G.; MCDONALD, R.; LEE, R. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.223-225, 1999.
- SOUZA, A.F; LEITÃO, M.C.G.; BATISTA, A.M.; PORTO, A.L.F.; FILHO, J.L.L.; GUERRA. M.M.P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural** [online]. 2009, v.39, n.4, p.1155-1161, 2009.
- SOUZA, C.E.; MOURA, A.; OLIVEIRA, J.T.; RADIS-BAPTISTA, G.; ARAUJO, A.; LIMA, A. Seminal plasma proteins, testis development and sêmen criteria in the

- ram. In: Annual Meeting of the American Society of Andrology, 29., 2004, Baltimore, Maryland. **Proceedings...** Baltimore: American Society of Andrology, 2004. p.91.
- STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Review. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.5, n.9, p.699-711, 2004.
- STREZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIAK, A. Purification and partial characterization of a 5,700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, v. 29, p. 5-52, 1992.
- TEIXEIRA, A.V.C.; ELOY, A.M.X.; FURTADO, J.R.; PINHEIRO, R.R.; PONTES, M.S. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Animal Reproduction**, v.6, n.4, p.516-525, 2009.
- TEIXEIRA, D.I.A.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; HAVT, A.; BLOCH, C.J.; PRATES, M.V.; MORENO, F.B.; SANTOS, E.A.; GADELHA, C.A.; GADELHA, T.S.; CRISÓSTOMO, F.S.; FREITAS, V.J. Isolation and partial characterisation of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. **Protein and Peptide Letters**, v.9, n.4, p.331-335, 2002.
- THOMAS, C.J.; ANBAZHAGAN, V.; RAMAKRISHNAN, M.; SULTAN, N.; SUROLIA, I.; SWAMY, M.J. Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface Plasmon resonance study. **Biophysical Journal**, v.84, p.3037-3044, 2003.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.159-170, 2004.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-70, 2005.
- VIEIRA, R.J.; CARDOSO, F.T.S.; AZEVEDO, L.M.; CUNHA, L.A.L.; SALVIANO, M.B. Influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, n.4, p.376-380, 2008.
- VILLEMURE, M. et al. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.39, 2003.
- VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**- 3ªed. Artmed, p.149-150, 2006.
- WAY, A.L., GRIEL JÚNIOR, L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.21, p.213-219, 2000.



## **CAPÍTULO 2**

### **ABORDAGEM PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS MOXOTÓ**

## RESUMO

O plasma seminal é o mediador essencial para as funções espermáticas desde a ejaculação até a fertilização, possuindo proteínas importantes que participam da regulação de diversos processos associados à fisiologia reprodutiva. Essa pesquisa teve por objetivo identificar proteínas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco (setembro, outubro e novembro/2010) e chuvoso (janeiro, fevereiro e março/2011) no semiárido do Nordeste brasileiro, através do uso da eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa. Foram utilizados os ejaculados de cinco reprodutores, nos quais foram realizadas avaliações espermáticas e dos quais o plasma seminal obtido, por centrifugação, foi submetido a 2D-PAGE em gel a 12,5% de poliacrilamida e corados com *Coomassie G-250 (Blue Silver)*. Em seguida, os géis foram digitalizados e analisados no *software ImageMaster Platinum* versão 7.0. Os *spots* foram excisados dos géis, digeridos com tripsina, e submetidos à identificação por espectrometria de massa (MALDI-ToF), dos quais foram identificados, em média, 123 *spots*. Destes, 75 *spots* apresentaram-se diferencialmente expressos em relação à porcentagem de volume relativo (%Vol) ( $p < 0,05$ ), sendo 65 deles presentes nos animais no período chuvoso e oito no período seco. Além disso, dois *spots*, S5 (MW 15,0 kDa e pI 4,5) e S6 (MW 15,1 e pI 6,0) foram encontrados, exclusivamente, no período chuvoso, sendo provavelmente pertencentes à família GSP, homóloga a BSPs, responsável pela capacitação espermática. Na espectrometria de massa foram identificadas sete proteínas através das ferramentas ProFound e uma utilizando MASCOT, disponíveis *online* em banco de dados. Contudo, a maioria dessas proteínas não possui função ainda definida na fisiologia reprodutiva do caprino. Com isso, o estudo mais aprofundado da proteômica na espécie caprina nos trópicos precisa ser realizado visando uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação do plasma seminal na função espermática.

**Palavras chave:** *Capra hircus*, características espermáticas, proteômica

## ABSTRACT

The seminal plasma is the essential mediator for sperm functions from ejaculation to fertilization, with important proteins that participate of the many process regulation associated to reproductive physiology. This research aimed to identify proteins present in the Moxotó goats seminal plasma in dry (September, October and November) and rainy (January, February and March) periods, in the semi arid of the Brazilian Northeast, through the use of two dimension electrophoresis associated to mass spectrophotometer. It were used sperm from five animals from which spermatic evaluations were made and seminal plasma obtained through centrifugation and subjected to 2D-PAGE gel 12.5% polyacrylamide and stained with Coomassie G-250 (Blue Silver). Then, the gels were digitized and analyzed on Platinum ImageMaster software version 7.0. The spots were excised from the gels, digested with trypsin, and submitted for identification by mass spectrometry (MALDI-ToF), in which were identified on average 123 spots. Of these, 75 spots showed up differentially expressed in percentage relative volume (% Vol) ( $p < 0.05$ ), and 65 of them present in the animals during the rainy season while only eight were present in the dry season. In addition, two spots, S5 (MW 15.0 kDa and pI 4.5) and S6 (15.1 MW and pI 6.0) were found exclusively in the rainy season, probably belonging to the family GSP, the homologous BSPs, responsible for sperm capacitation. In mass spectrometry it was identified seven proteins through the ProFound and MASCOT tools, available online in the database. However, most of these proteins has not yet defined function in reproductive physiology of goats. Thus, further study of proteomics in goats in the tropics needs to be done to better understand the mechanisms of regulation of seminal plasma in sperm function.

**Keywords:** *Capra hircus*, sperm characteristics, proteomics

## INTRODUÇÃO

A maioria das raças nativas descende de animais introduzidos no Brasil por colonizadores portugueses. O rebanho caprino brasileiro está concentrado na região Nordeste, onde já estão adaptados ao clima semiárido e à vegetação nativa da caatinga (Ribeiro et al., 2004 ).

A raça Moxotó, bem como outras raças caprinas nativas brasileiras, está perdendo as suas características genéticas devido ao deficiente controle reprodutivo e à miscigenação indiscriminada com outras raças exóticas introduzidas no Brasil (Oliveira et al., 2005). Esses cruzamentos indiscriminados estão causando a extinção de tipos étnicos e até de raças de pequenos ruminantes que são importantes para o cenário de sustentabilidade dos sistemas produtivos locais (Rocha et al., 2007; Alves et al., 2010). Esta raça representa recurso genético importante que deve ser preservado, por caracterizar uma raça rústica, prolífica e adaptada ao semiárido nordestino (Oliveira et al., 2005).

As raças nativas têm grande importância dentro da Biologia Avançada, posto que o conhecimento de uma espécie ou raça é essencial para os estudos de conservação, melhoramento genético e reprodutivo. Este último, nos pequenos ruminantes, é alterado pelas mudanças climáticas nas regiões tropicais e subtropicais e, pelo fotoperíodo nas regiões temperada (Nunes, 1988; Leboeuf et al., 2000; Martins Júnior et al., 2007).

Nas regiões tropicais e subtropicais, como exemplo, no Nordeste brasileiro, os caprinos se reproduzem durante todo o período do ano, sendo o desempenho reprodutivo nessas regiões afetado, principalmente, pela nutrição e pelo sistema de criação (Maia et al., 2011). O estudo de componentes do plasma seminal representa uma alternativa para avaliar o desempenho reprodutivo através do estudo da função e qualidade do sêmen em caprinos.

O plasma seminal dos mamíferos domésticos é uma complexa mistura de substâncias originária, principalmente, a partir do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias. Diversos estudos têm observado que algumas proteínas

presentes no plasma seminal exercem vários efeitos benéficos ou nocivos sobre a função espermática e no sistema genital feminino (Töpfer-Petersen et al., 2005).

Muitos componentes protéicos presentes no plasma seminal foram relacionados à fertilidade em bovinos (Killian et al., 1993; Asadpour e Tayefi-Nasrabadi et al., 2012), suínos (Novak et al., 2010), equinos (Heise et al., 2010) e bubalinos (Harshan et al., 2009); com a congelabilidade em touros (Roncoletta et al., 2000; Jobim et al., 2004; Asadpour et al., 2007), bufálo (Hiron et al., 2006), suínos (Casas et al., 2009); viabilidade das células espermáticas em touros e carneiros (Barrios et al., 2000; Yue et al., 2009).

Contudo, segundo Asadpour et al. (2007), pesquisas sobre as proteínas do plasma seminal e da membrana espermática ainda precisam ser definidos de modo a se conhecer os mecanismos de ação das proteínas que afetam a viabilidade dos espermatozoides.

Em reprodutores caprinos, pesquisadores investigaram a variação sazonal do plasma seminal (La Falci et al., 2002; Souza et al., 2009), identificado e caracterizado a espermedesina (Teixeira et al., 2006) e proteínas com afinidade à heparina (HAPs; La Falci et al., 2002). Também em caprinos, Villemure et al. (2003) encontraram proteínas denominadas GSP-14kDa, GSP-15kDa, GSP-20 kDa, e GSP-22kDa, homóloga às proteínas seminais de bovinos (BSP).

Esse estudo teve como objetivo identificar proteínas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco e chuvoso e, sua relação com as características espermáticas no semiárido do Nordeste brasileiro, através da eletroforese bidimensional e da espectrometria de massa.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização e dados climatológicos

O presente estudo foi realizado na fazenda experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa de Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, na região Norte do Ceará, no semiárido, à 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros. De acordo com a Estação Convencional Climatológica de Sobral – EMBRAPA Caprinos e Ovinos/INMET (Tabela 1), a temperatura do ar, a umidade relativa do ar e a precipitação acumulada apresentaram média anual, aproximadamente, de 28°C, 66% e 763 mm, respectivamente, durante o período de abril de 2010 a março de 2011, no qual foi realizado este experimento.

Com os dados meteorológicos foram caracterizados dos períodos: seco, cujos meses apresentaram baixo índice pluviométrico (setembro, outubro e novembro/2010), e chuvoso (janeiro, fevereiro e março/2011) com alto índice. Esses períodos apresentaram média de 28,8°C, 52,9% e 9,9 mm no seco e de 25,8°C, 80,9% e 536,1 mm no chuvoso.

Tabela 1. Médias da temperatura, umidade e precipitação acumulada no município de Sobral, Ceará, no período de abril de 2010 a março de 2011

Mês do Ano	Temperatura média do Ar - °C (Bulbo seco)			Umidade Relativa do ar (%)	Chuva Acumulada - Média no mês (mm)
	Máxima	Mínima	Média		
Abril	32,9	23,4	27,0	75,6	84,4
Maio	34,8	22,8	29,2	65,8	26,9
Junho	34,9	21,6	27,7	57,0	37,5
Julho	36,1	21,8	28,4	63,2	8,8
Agosto	36,8	21,7	28,3	59,5	0,0
Setembro	37,5	21,8	28,7	53,6	0,0
Outubro	37,5	22,7	28,6	55,0	9,9
Novembro	37,7	23,0	29,1	50,0	0,0
Dezembro	35,3	23,0	28,0	70,0	59,2
Janeiro	31,7	22,1	26,0	79,0	197,0
Fevereiro	31,7	22,4	25,9	80,4	135,0
Março	31,2	20,0	25,6	83,3	204,1

Fonte: Instituto nacional de meteorologia – INMET (2011); Os valores aqui apresentados são médias referentes a cada mês observado.

### Animais experimentais e manejo nutricional

Foram selecionados cinco reprodutores caprinos (*Capra hircus*) da raça Moxotó, de um rebanho de 15 machos, pesando  $38,3 \pm 6,0$  kg, sexualmente maduros com idade entre dois e três anos. Os animais, oriundos da fazenda sede da Embrapa Caprinos e Ovinos, foram acompanhados clínica e andrologicamente por um período de 12 meses, de abril de 2010 a março de 2011. Antes do início da coleta dos dados os animais passaram por um período de adaptação que teve duração de um mês. Durante o período experimental os animais foram mantidos em confinamento recebendo capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum*), e suplementados com 300g de concentrado, no cocho, contendo 70% de milho, 28% de farelo soja e 2% de calcário, além de receberem sal mineral e água a vontade.

## Procedimento experimental

### Coleta e avaliação de sêmen

Durante o período experimental os animais foram submetidos, mensalmente, à exame clínico e, semanalmente, à avaliação andrológica, sendo que só foram utilizadas as coletas referentes aos períodos seco e chuvoso. Portanto, as coletas foram realizadas durante um ano para que pudesse ser feito a identificação do período seco e chuvoso.

A avaliação andrológica do sêmen foi realizada utilizando-se o método de vagina artificial, auxiliada de uma fêmea estrogonada com Cipionato de Estradiol (ECP), via intramuscular, como manequim. Os dados referentes ao exame andrológico de cada animal eram registrados e o plasma seminal separado através da centrifugação.

De acordo com recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), foram avaliadas as seguintes variáveis: aspecto (Aquoso; Leitoso; Leitoso espesso; Cremoso; Cremoso espesso), volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva individual (%), vigor (0-5) e concentração espermática ( $\times 10^6 \text{ mm}^3$ ). Todas as avaliações espermáticas foram feitas por uma única pessoa, para minimizar erros de análises.

### Obtenção do plasma seminal

Logo após a coleta de sêmen, a amostra individual foi centrifugada à 1500g durante 30 minutos, à 4°C, para separação do plasma seminal dos espermatozoide. Em seguida, o sobrenadante foi re-centrifugado à 10.000g por 60 minutos, a 4°C, para remoção de restos de espermatozoides e *debris celulares*,

havendo separação completa do plasma, o qual foi transferido para microtubos (*Eppendorf*) e mantido à - 20°C até a realização das análises.

### Fluxograma da pesquisa proteômica

O fluxograma para uma análise proteômica (Figura 1) consiste das seguintes etapas: quantificação das proteínas totais do material de interesse; separação das proteínas através da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE); digitalização e análise dos *spots* presentes nos géis através do *software ImageMaster Platinum versão 7.0 (GE-Healthcare, USA)* e, posteriormente, realização da digestão dos *spots* selecionados através do uso da tripsina, a qual separa os peptídeos e, utilização do espectrômetro de massa para identificar as sequências de peptídeos. Finalmente, cruza-se os resultados com os banco de dados disponíveis (Park, 2004; Cánovas et al., 2004).

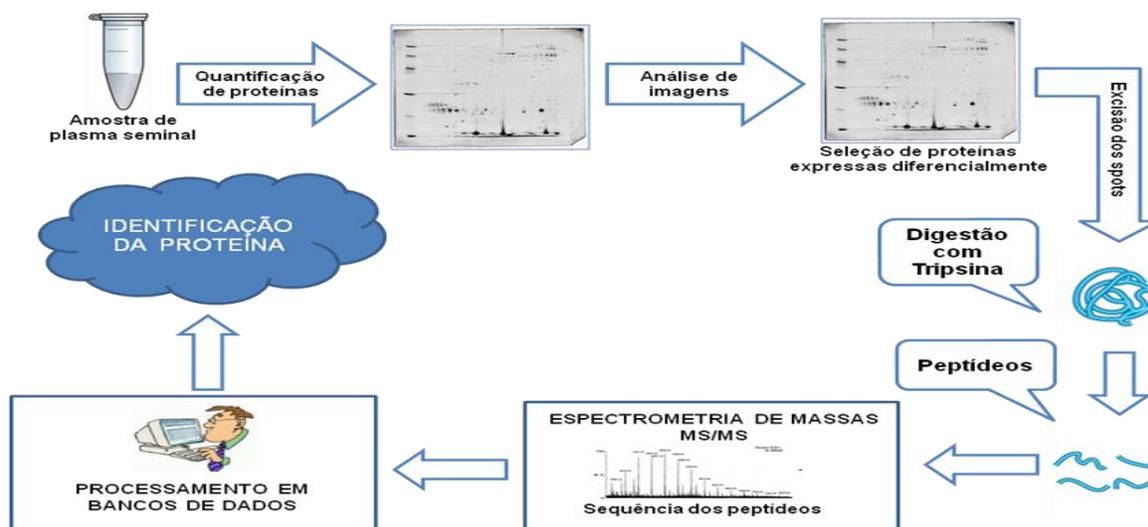


Figura 1. Fluxograma das etapas da análise proteômica em plasma seminal, usando a eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massa MS/MS. Adaptado de Nascimento (2009).

## Determinação da concentração de proteínas totais do plasma seminal

A concentração protéica foi determinada pelo método descrito 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, utilizando-se o comprimento de onda de 595 nanômetros (nm), em duplicata, usando a albumina sérica bovina (BSA) para criar uma curva padrão. Esta curva também chamada de curva analítica de calibração, foi construída a partir de solução padrão, com concentrações conhecidas (0, 5, 10, 15, 20 mg) de BSA. Portanto, a quantificação da concentração de proteínas totais do plasma seminal foi obtida com o cruzamento dos dados obtidos nos espectrofotômetro com os da curva.

## Eletroforese bidimensional do plasma seminal

A técnica de 2D-PAGE foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) da Universidade Federal do Ceará/Universidade Vale do Acaraú, Campus de Sobral, Ceará.

Para determinação dos padrões eletroforéticos bidimensionais das proteínas do plasma seminal, foi empregada a técnica descrita por O'Farrell (1975), com algumas modificações. Primeiramente, foi feito um *pool*, por animal e por período, sendo este caracterizado como seco e chuvoso, totalizando 10 *pools*. Esses foram preparados utilizando 250µg de proteína total determinado pela quantificação através do método descrito por Bradford (1976) de cada amostra, de um total de dez por período, os quais foram submetidos à 2D-PAGE, em duplicata.

Para preparação dos géis, as proteínas do plasma seminal (250µg) foram solubilizadas em tampão de reidratação (7M de uréia; 2M de tiuréia; 2% de

CHAPS; 2% de IPG Buffer - *anfólitos* - na faixa de pH 4 a 7; 25 mM de ditioneitol (DTT) e “traços” de azul de bromofenol). A solução foi adicionada à canaleta da bandeja de hidratação *IPGBox* (*GE-Healthcare, USA*) e incubada com tiras de gradiente imobilizados (*IPG Strip*) de 13 cm com duração de 16h, aproximadamente. A focalização isoelétrica foi realizada no equipamento *Ettan™ IPGPhor III™* (*GE-Healthcare, USA*) com a seguinte programação: 500 V (2h), 4.000 V (2h e 30 min), 10.000 V (18.000 Vh) e 50 V (4h). Após a focalização, as tiras foram equilibradas no tampão de equilíbrio, em duas etapas: na primeira acrescentou-se 57,8 mg de DTT (1% p/v) à solução de equilíbrio. Já na segunda, com o objetivo de alquilar as proteínas, adicionou-se 69,3 mg de iodeacetamida (IAA) (3% p/v), homogeneizando cada tira por 15 min em ambas as etapas.

Após a etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) com base em seu peso molecular (MW) no equipamento Hoefer SE 600 (*GE-Healthcare, USA*) com duas programações (100 V, 30 mA, 100 W por 15 min e 230 V, 50 mA e 100 W por 6h) para os dois géis. Foi utilizado marcador de MW entre 14 e 97 kDa.

Após esta separação, que teve duração de, em média, oito horas, os géis foram fixados em mistura de etanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v/v), por 15 min em agitação, e corados após com o *Coomassie G-250 (Blue Silver)*, durante 24h, e em seguida, armazenados em solução de ácido acético 5%. Por fim, os géis foram digitalizados em um equipamento *ImagerScanner II* (*GE-Healthcare, USA*), e as imagens salvas no formato *tif*.

#### Análise dos mapas de eletroforese bidimensional

As imagens digitalizadas dos géis foram analisadas utilizando o *software ImageMaster Platinum* versão 7.0 (*GE-Healthcare, USA*), que permite a detecção, a quantificação e a congruência entre os múltiplos géis, segundo as recomendações do manual. O primeiro passo foi à identificação automática dos

*spots* com parâmetros definidos pelo programa. Em seguida, foi realizada uma análise manual mais detalhada, com o objetivo de refinar a seleção de *spots*, sendo acrescentados *spots* não identificados pelo programa. Além disso, *spots* duplos identificados automaticamente como únicos também foram corrigidos. Foram eliminados os *spots* não reprodutíveis, para isso, a ferramenta *report 3D* foi utilizada, uma vez que ela identifica o pico de intensidade de cada *spot* e mostra o quanto este pico se sobressai do fundo do gel.

Em relação ao objetivo de identificar *spots* diferencialmente expressos nos períodos chuvoso e seco, foi considerado como parâmetro de comparação o valor do volume relativo (%Vol) dos *spots*. Esse é um valor normalizado do volume que o torna relativamente independente de variações entre géis, geralmente causada por condições experimentais, utilizando a seguinte equação:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100$$

Sendo o %Vol de um *spot* expresso como volume do *spot* multiplicado por 100 e dividido pela soma dos volumes de todos os *spots* do gel.

As proteínas foram supostamente identificadas com base na comparação de pI e MW no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent disponível *online* no portal ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>).

Esta ferramenta gera uma lista de peptídeos e proteínas a partir dos valores informados nos campos de massa molecular aparente e pI fazendo uma seleção dentro de uma busca específica. As palavras chave utilizadas para restringir esta busca foram: *Capra hircus*, *mammalis* e plasma seminal.

## Preparação das amostras para a espectrometria de massa

Os *spots* de interesse foram excisados dos géis de 2D-PAGE com o auxílio de um bisturi e transferidas para microtubos (*Eppendorf*) nos quais foram digeridos em tripsina, de acordo com o método de Hellman et al. (1995) com algumas alterações (Nogueira, 2007). Os *spots* selecionados foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM acetonitrila (1:1) em pelo menos três lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com 100% de acetonitrila por cinco minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel em concentrador de amostra *Speed Vac* (LABCONCO). Os géis foram reidratados a 4°C na proporção de 1:50 (proteínas/tripsina) e a digestão realizada a 37°C por 16 horas.

## Identificação das proteínas por espectrometria de massa

As amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C e enviadas para o Laboratório de Espectrometria de Massa de Proteínas (LEMAP), na Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do PICI, Fortaleza, para serem analisadas pela técnica de espectrometria de massa, visando a identificação de proteínas do plasma seminal diferencialmente expressas nos géis de 2D-PAGE.

Os peptídeos obtidos pela digestão trípica (1 µL) foram aplicados na placa de MALDI e seco à temperatura ambiente. Em seguida, foi coberto por uma solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,1% (1 µL). Após secos à temperatura ambiente, a amostra foi analisada por espectrômetro de massa híbrido quadrupolo com mobilidade de íon Tempo de Vão com aceleração ortogonal de alta definição Synapt HDMS (*Waters*). O espectrômetro foi operado em modo positivo, com fonte de ionização MALDI. Foi calibrado com íon glucofibrinopeptídio-B (M+H) = 1570,68 Da e selecionada a função DDA (análise direta de dados) para a seleção dos íons que

foram fragmentados por decomposição induzida por colisão (CID). Os espectros de MS foram coletados entre 300 m/z a 3000 m/z e os espectros de MS/MS entre 50 m/z a 3000 m/z. A coleta e análise de dados foram feitas utilizando o *software* MassLynx®. A massa molecular dos peptídeos foi submetida ao programa NCBI. Os peptídeos foram colocados em Banco de Dados de Sequência de Proteína NCBI e/ou GenPept, disponível *online*, para identificação das proteínas. As ferramentas usadas foram ProFound e Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

### Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, a fim de verificar o pressuposto da normalidade e ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variância. Foi aplicado o teste F, através da Análise de Variância (ANOVA), para as variáveis volume, concentração, proteínas totais e número de *spots*. Já as variáveis motilidade, vigor, ponto isoelétrico (pI) e MW foram avaliadas por meio do teste não-paramétrico de Wilcoxon, levando-se sempre em conta o nível de 5% de significância. A comparação entre os pares de médias, para os casos em que houve diferença estatística, foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. O *software* estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2. (*Statistical Analysis System Institute, 2009*).

Para analisar as diferenças na expressão da proteína por porcentagem de volume relativo utilizou o pacote estatístico presente no *software ImageMaster Platinum* versão 7.0, os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, sendo utilizado antes o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição de normalidade das amostras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros seminais

Variações sazonais de produção de sêmen e qualidade dos espermatozoides de caprinos de diferentes raças já foram relatadas em clima tropical por Silva et al. (2005), Souza et al. (2009) e Teixeira et al. (2009). A temperatura ambiente e os índices pluviométricos são fatores ambientais que potencialmente exercem uma forte influência sobre a fisiologia e desempenho reprodutivo desses animais (Fatet et al., 2011).

No presente estudo, os parâmetros espermáticos como volume, concentração, vigor, motilidade e vitalidade (porcentagem de espermatozoides vivos) dos caprinos Moxotó no semiárido nordestino não apresentaram diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os períodos seco (0,6 mL;  $3,1 \times 10^6$  espermatozoide/mL; 4,0; 83%, respectivamente) e chuvoso (0,64 mL;  $3,4 \times 10^6$  espermatozoide/mL; 3,8; 83%, respectivamente) (Tabela 2.). Esses resultados podem ser explicados por se tratar de uma raça nativa adaptada às condições climáticas do semiárido e também pelo fato dos animais permanecerem confinados recebendo mesma alimentação durante todo o experimento. No entanto, houve diferença entre os animais quanto ao volume e concentração espermática dentro de cada período ( $p<0,05$ ). Observa-se na tabela 2, que o animal A apresentou diferença significativa dentro do período chuvoso com relação às variáveis mencionadas, evidenciando-se a variabilidade individual presente na raça. No período seco, os animais apresentaram variação entre si quanto ao volume e concentração espermática ( $p<0,05$ ).

Concordando parcialmente com os achados deste trabalho, Souza et al. (2009), evidenciaram diferença significativa ( $p<0,05$ ) apenas no volume entre os períodos de alto (1,7mL) e baixo (1,2mL) índice pluviométrico em caprinos da raça Alpina Americana criadas no Nordeste brasileiro. Em outro estudo na Paraíba, com caprinos mestiços Anglo Nubiano X SRD, Silva et al., 2005 também não

observaram efeito da sazonalidade nos parâmetros espermáticos como motilidade e vigor, sendo que no período mais quente, houve diferença quanto a concentração espermática ( $1,80 \times 10^6$  espermatozoide/mL). Este último parâmetro mostrou-se inferior ao encontrado nesse estudo com a raça Moxotó que apresentou concentração espermática de  $3,1 \times 10^6$  espermatozoides/mL no período seco, sugerindo que esta elevação seja, possivelmente, justificada pela alta rusticidade da raça no semiárido nordestino.

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros seminais dos caprinos da raça Moxotó criados na região do Nordeste do Brasil, nos períodos seco e chuvoso

PERÍODO SECO					
ANIMAL	A	B	C	D	E
VOL (mL)	0,93±0,11 <sup>Aa</sup>	0,79±0,14 <sup>Aa</sup>	0,36±0,05 <sup>Ba</sup>	0,66±0,03 <sup>Aa</sup>	0,34±0,08 <sup>Ba</sup>
CONC (x10 <sup>6</sup> )	2,23±0,37 <sup>Ca</sup>	2,93±0,8 <sup>ACa</sup>	3,8±0,9 <sup>Aba</sup>	3,14±0,5 <sup>Aca</sup>	3,94±0,6 <sup>Ba</sup>
MIP (%)	75,3±4,0 <sup>Aa</sup>	83,9±7,9 <sup>Aa</sup>	90,0±0,0 <sup>Aa</sup>	84,5±0,8 <sup>Aa</sup>	85,7±5,1 <sup>Aa</sup>
VIG (0-5)	3,4±0,1 <sup>Ba</sup>	4,0±0,7 <sup>ABa</sup>	4,6±0,2 <sup>Aba</sup>	3,9±0,2 <sup>Aa</sup>	4,0±0,2 <sup>Aba</sup>
VITALID (%)	89,0±3,6 <sup>Aa</sup>	86,7±1,9 <sup>Aa</sup>	89,5±1,6 <sup>Aa</sup>	90,2±1,3 <sup>Aa</sup>	92,0±3,6 <sup>Aa</sup>
PERÍODO CHUVOSO					
ANIMAL	A	B	C	D	E
VOL (mL)	1,1±0,15 <sup>Ba</sup>	0,59±0,18 <sup>Aa</sup>	0,47±0,08 <sup>Aa</sup>	0,58±0,05 <sup>Aa</sup>	0,34±0,1 <sup>Aa</sup>
CONC (x10 <sup>6</sup> )	1,7±0,9 <sup>Ba</sup>	3,65±0,5 <sup>Aa</sup>	3,5±0,4 <sup>Aa</sup>	3,46±0,3 <sup>Aa</sup>	3,87±0,3 <sup>Aa</sup>
MIP (%)	73,0±15,6 <sup>Aa</sup>	82,0±2,9 <sup>Aa</sup>	86,7±5,8 <sup>Aa</sup>	84,2±3,0 <sup>Aa</sup>	90,0±0,0 <sup>Aa</sup>
VIG (0-5)	3,7±0,7 <sup>Aa</sup>	4,1±0,4 <sup>Aa</sup>	3,9±0,1 <sup>Aa</sup>	4,0±0,3 <sup>Aa</sup>	4,4±0,2 <sup>Aa</sup>
VITALID (%)	91,3±2,8 <sup>Aa</sup>	91,0±6,1 <sup>Aa</sup>	92,9±3,0 <sup>Aa</sup>	92,3±0,0 <sup>Aa</sup>	93,7±0,6 <sup>Aa</sup>

<sup>A,B</sup> Médias com letras maiúsculas distintas, na mesma coluna, diferem estatisticamente a 5% ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os animais para o mesmo período;

<sup>a,b</sup> Médias com letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem estatisticamente a 5% ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os períodos para o mesmo animal.

VOL: volume do ejaculado; CONC: concentração espermática; MIP: motilidade individual progressiva; VIG: vigor; VITALID: vitalidade (porcentagem de espermatozoides vivos)

Os dados de motilidade, concentração e vigor espermático estão dentro dos padrões de referência do CBRA (1998) para a espécie *Capra hircus*, demonstrando que esses animais apresentam função reprodutiva normal. O

exame andrológico é um critério importante na avaliação do macho caprino, uma vez que um reprodutor subfértil ou infértil diminui os índices de fertilidade do rebanho, trazendo prejuízos na estação de monta, além de poder transferir estas características para suas crias. No entanto, Rodriguez-Martinez et al. (1997), Zhang et al. (1998) e Gadea et al. (2004) relataram que os parâmetros avaliados rotineiramente têm capacidade limitada na avaliação da fertilidade potencial de reprodutores. Concordando com esta afirmativa, Larson e Miller (2000) afirmaram que reprodutores com características seminais semelhantes podem apresentar diferença de 20 a 25% nos índices de fertilidade.

Desse modo, análises bioquímicas do plasma seminal, associadas aos critérios de avaliação espermática, poderiam auxiliar na identificação de diferenças importantes entre a fertilidade potencial dos animais. Neste sentido, diversos estudos buscando por marcadores bioquímicos da fertilidade de reprodutores, têm mostrado que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliada *in vivo* e *in vitro*. Tais proteínas são candidatas a marcadores moleculares da fertilidade (Killian et al., 1993; Henault e Killian, 1996).

### Proteínas do plasma seminal

A influência da sazonalidade sobre a concentração de proteína total de caprinos tem sido descrita por Teixeira et al. (2009), que observaram diferença significativa entre os períodos chuvoso e seco. Nesse estudo, a concentração média de proteína total no plasma seminal de caprino Moxotó foi de, aproximadamente 40,4 ug/uL variando de 11,42 - 62,95 ug/uL ao longo do ano. Porém, analisando os períodos isoladamente, somente dois animais, A e B, apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na concentração desta variável. Fato não observado entre animais dentre de mesmo período (Tabela 3), como o animal

D que apresentou menor valor na concentração de proteína total no período chuvoso e maior no período seco entre os animais ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Valores de média e desvios-padrão de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) obtida dos cinco animais nos períodos seco e chuvoso

Período	Animal	Proteína Total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
CHUVOSO	A	52,21 $\pm$ 8,06 <sup>Da</sup>
	B	29,98 $\pm$ 8,66 <sup>ABCa</sup>
	C	26,57 $\pm$ 5,72 <sup>CDa</sup>
	D	19,69 $\pm$ 3,64 <sup>CDa</sup>
	E	41,07 $\pm$ 15,49 <sup>Aa</sup>
SECO	A	27,74 $\pm$ 11,50 <sup>Ab</sup>
	B	46,95 $\pm$ 13,59 <sup>BCDa</sup>
	C	20,63 $\pm$ 15,54 <sup>Aba</sup>
	D	54,32 $\pm$ 14,94 <sup>Db</sup>
	E	32,84 $\pm$ 14,76 <sup>CDa</sup>

<sup>A,B</sup> Médias com letras maiúsculas distintas, na mesma coluna, diferem estatisticamente a 5% ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os animais para o mesmo período;

<sup>a,b</sup> Médias com letras minúsculas distintas, na mesma coluna, diferem estatisticamente a 5% ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre os períodos para o mesmo animal.

As médias das proteínas totais obtidas ao longo do ano por Pinheiro et al. (1996), trabalhando com animais da raça Moxotó e mestiça Parda Alpina, variou entre 34,1 e 42,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Segundo estudo de Azerêdo (2003), a média geral de proteínas totais encontrada foi de 33,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  em caprinos da raça Saanen, Anglo-nubiana e Bôer, na região semiárida do Nordeste, dados esses inferiores aos encontrados neste trabalho. Teixeira et al. (2009) também estudando caprino da raça Anglo-nubiana verificaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na concentração das proteínas totais com média de 23,23  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , variando de 8,47 a 34,89  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ao longo do ano. Souza et al. (2002) relacionaram a melhoria do quadro espermático de ovinos Santa Inês ao aumento nos níveis de proteína no plasma seminal, exercendo múltiplos efeitos sobre a função espermática.

Visando comparar o perfil protéico do plasma seminal dos caprinos Moxotó entre os períodos chuvoso e seco e, entre os animais, foram analisados as imagens dos géis 2D-PAGE de referências de cada período usando o *software ImageMaster Platinum* versão 7.0 representados na Figura 2. Nas análises, foi utilizada para a separação das proteínas do plasma seminal uma faixa de pI mais estreita com gradiente de 4-7, para permitir melhor separação e maior resolução dos *spots* protéicos.

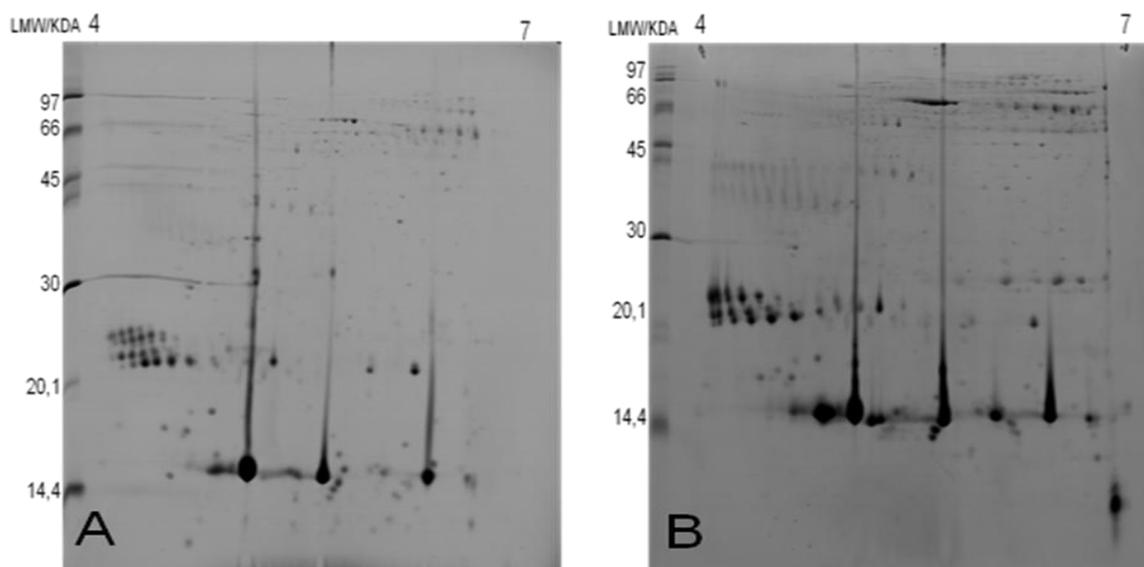


Figura 2. Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal de caprinos Moxotó, cujo gráfico A representa o gel de referência do período chuvoso e o B representa o gel de referência do período seco, ambos gerados pelo *software ImageMaster Platinum* versão 7.0

Mapas similares de proteínas em géis 2D-PAGE foram encontrados a partir de plasma seminal de caprinos entre os períodos chuvoso e seco, com excelente reprodutibilidade, como demonstrado através do gráfico de dispersão ou *Scatter Plots* gerado pelo *software*, considerando a porcentagem do volume relativo dos *spots* protéicos entre as replicatas (%Vol). Observou-se que todas as repetições apresentaram coeficiente de correlação linear acima de 0,90, sendo, portanto, consideradas significativas (Figura 3). Assim, demonstra-se a confiabilidade dos

dados obtidos, pois o valor mínimo aceito para a comparação de replicatas através de gráficos de dispersão é de 0,85 (Vieira, 1980; Eravci et al., 2007).

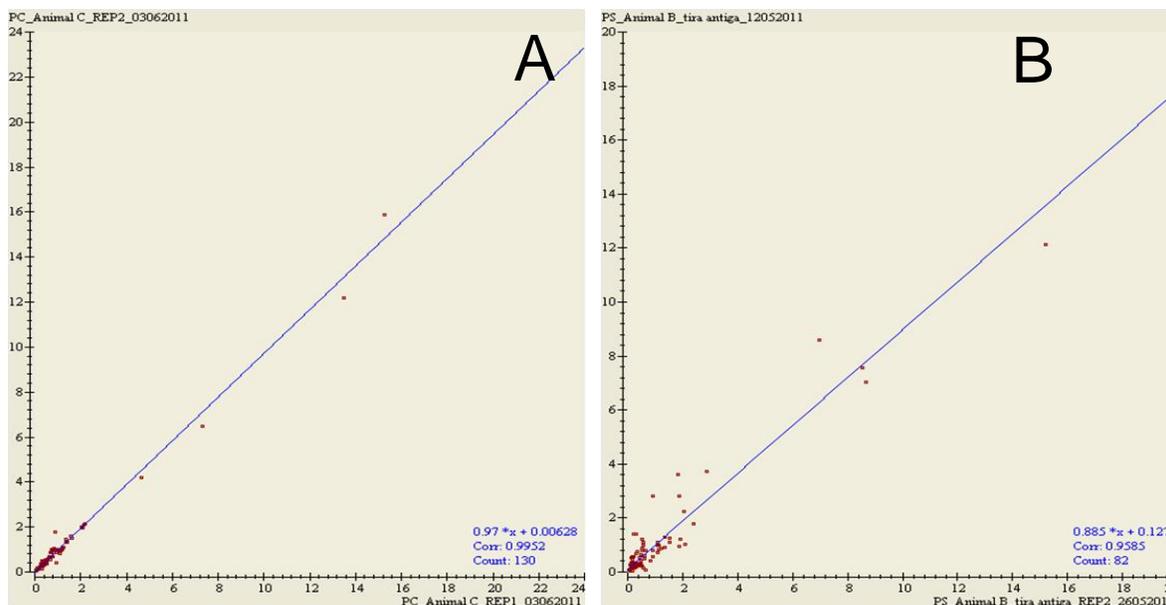


Figura 3. Dispersão das duplicatas de géis 2D-PAGE considerando o parâmetro percentagem do volume (%Vol) dos *spots* no período chuvoso com um coeficiente de correlação linear de 0,9952 (A); e no período seco com coeficiente de correlação linear de 0.9585 (B)

As proteínas seminais são provenientes, principalmente, do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias, as quais interagem com componentes da membrana espermática e participam de diversos processos associados à fertilidade do macho. Tais processos incluem motilidade (Elzanaty et al., 2002), proteção das células contra choque térmico, reações oxidativas, imunológicas e danos a integridade do DNA (Muiño-Blanco et al., 2008), capacitação espermática e reação acrossômica (Manjunath e Thérien, 2002), e interação com o oviduto e fecundação do ovócito (Yuan et al., 2003; Gwathmey et al., 2003).

Na análise dos géis bidimensionais, depois das proteínas editadas e de extensas comparações, foram detectados, em média, 123 *spots* protéicos no plasma seminal de caprinos Moxotó. No entanto, os géis de referência

apresentaram  $159 \pm 10,0$  e  $149 \pm 14,0$  *spots* no período chuvoso e seco, respectivamente (Figura 2).

O número de *spots* protéicos máximos e mínimos detectados por período foram 159 (animal C) e 87 (animal A) no período chuvoso; e 149 (animal B) e 89 (animal A) no período seco. Entretanto, tais diferenças no número total de *spots* por gel não foram estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) nos períodos estudados. Vale salientar que o animal A apresentou o menor números de *spots* protéicos em ambos os períodos (Figura 4), apresentando valores maiores de volume e menores de concentração espermática entre os animais ( $p < 0,05$ ) no período chuvoso (Tabela 2). Isso demonstra a possibilidade de haver uma relação entre o número total de *spots* protéicos e a qualidade do ejaculado, podendo haver, nesse animal, ausência de proteínas benéficas importantes na proteção da célula espermática (Figura 5).

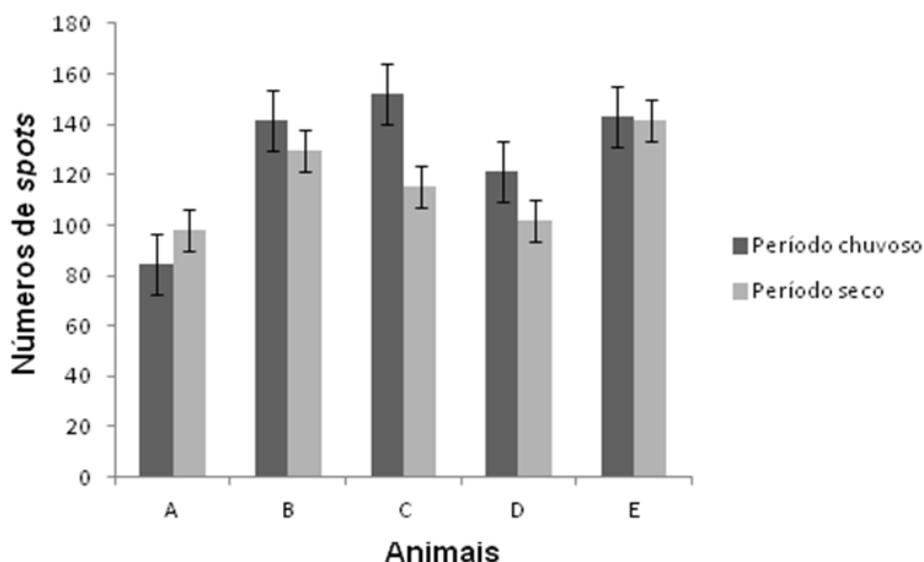


Figura 4. Média e desvio padrão dos números de *spots* protéicos de plasma seminal de reprodutores caprinos da raça Moxotó, em géis bidimensionais (pH 4-7 de 13 cm) entre os períodos chuvoso e seco, analisados pelo *ImageMaster Platinum* versão 7.0

\* Análise estatística não mostrou diferença significativa entre os períodos analisados ( $p < 0,05$ ).

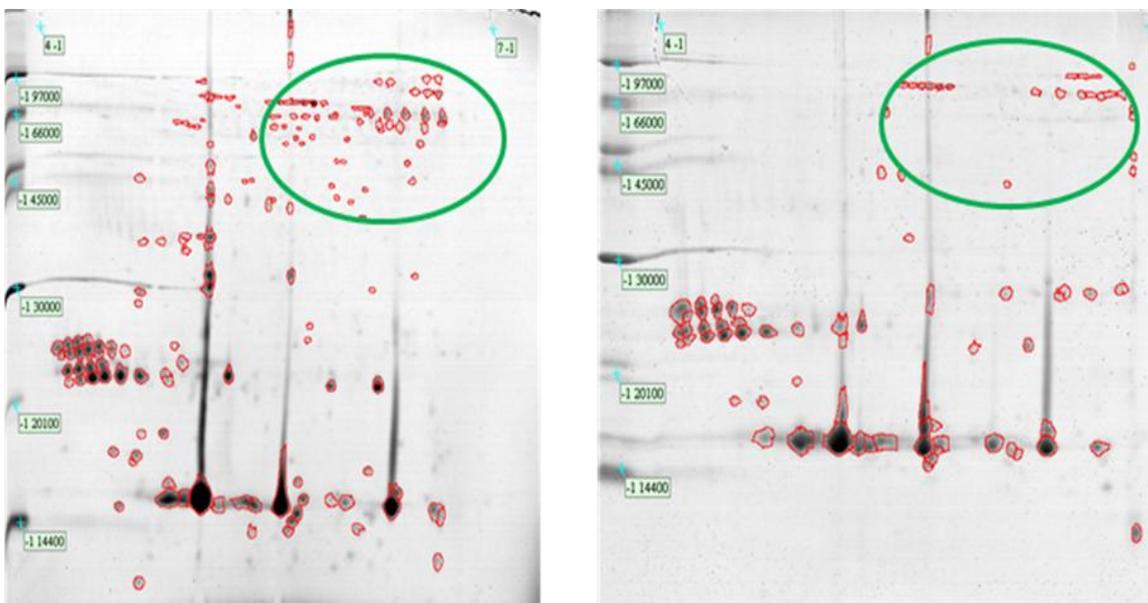


Figura 5. Géis de eletroforese bidimensional de poliacrilamida do plasma seminal de caprinos Moxotó no período chuvoso, representando no contorno verde a ausência de *spots* protéicos no gel do animal A (direita) e gel de referência (esquerda)

Os resultados obtidos nesse trabalho não corroboram com os de Souza et al. (2009) que, ao estudarem as proteínas do plasma seminal de caprinos Alpino Americano, detectou apenas 96 *spots*, sendo 47 deles com MW relativo de 4 a 106 kDa e pl de 3,00 a 8,96 no período de alto índice pluviométrico e, 49 *spots* no período de baixo índice pluviométrico, cujo MW relativo variou de 15 a 97 kDa, com pl de 4,48 a 9,8.

Contudo, dos 123 *spots* protéicos detectados no mapa bidimensional, somente dois *spots* apresentaram pl acima de 7,0 e MW entre 13,5 e 25,9 kDa, no período chuvoso. Esses resultados permitem afirmar que a maioria das proteínas no plasma seminal de caprinos da raça Moxotó no semiárido do Nordeste são ácidas. Resultados similares têm sido relatados em carneiros da raça Santa Inês, uma raça também adaptada à região tropical, em que a maioria dos *spots* encontrados no plasma seminal apresentou baixo MW (75 kDa) e pl ácidos, com poucos pls acima de 8 (Souza et al., 2004). Também Cardozo et al. (2006) concluíram que a maioria das proteínas detectadas em carneiros Rasa Aragonesa da Espanha são ácidas.

Em relação à frequência relativa dos *spots* protéicos, verificou-se que no período chuvoso estão presentes *spots* com *pI* na faixa entre 5,0 a 5,9 (37,0%) e MW entre 20 a 40 kDa (32,0%); seguido da faixa de *pI* de 6,0 a 6,9 (35,8%) e MW 60 a 80 kDa (23,0%). Já no período seco, a maior frequência mostrou *pI* na faixa entre 4,0 a 4,9 (36%) e MW entre 20 a 40 kDa (44,5%), seguido da faixa de *pI* entre 5,0 e 5,9 (34,9%) e MW menor que 20 kDa (24,8%) (Figura 6). Com esses dados podemos considerar que existe variação quantitativa entre os períodos estudados, observando-se no período chuvoso predominância de *spots* protéicos de alto MW e no seco de baixo MW, sugerindo assim, interferência do clima no perfil protéico do plasma seminal. Corroborando, Matos (2012) estudando as proteínas dos espermatozoides desses mesmos animais verificou, em relação ao peso molecular, as proteínas de 20 a 40 kDa são as mais frequentes ao longo do ano, destacando maior distribuição no período chuvoso.

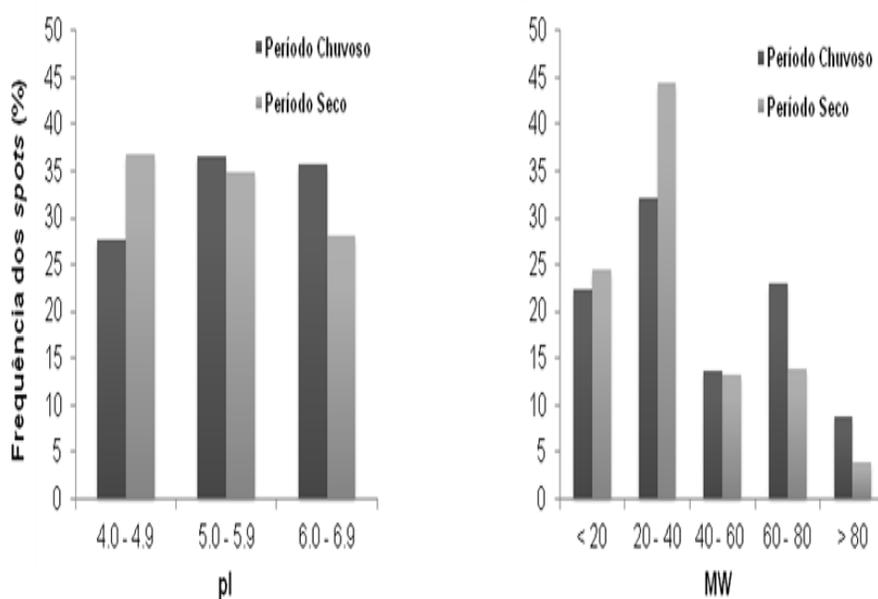


Figura 6. Porcentagem de frequência dos *spots* por intervalo de pontos isoelétricos (*pI*) e peso molecular (MW) em géis bidimensionais analisados pelo *ImageMaster Platinum* versão 7.0 do plasma seminal de caprinos da raça Moxotó entre os períodos chuvoso e seco

Houve variação na distribuição da expressão dos *spots* protéicos entre os animais, apesar de pertencerem à mesma raça, serem criados no mesmo sistema de manejo e não apresentarem diferença nos parâmetros seminais, demonstrando haver uma variação protéica individual entre os caprinos, mesmo apresentando bons parâmetros andrológicos. Segundo Nunes et al. (1988), o potencial reprodutivo do rebanho caprino está diretamente relacionado com a carga genética, meio ambiente e sistema de manejo, sendo que a relação entre essas variáveis interfere nas características fenotípicas proporcionando melhor adaptação e produtividade. Assim, a fertilidade dos animais pode ser dependente dessas variáveis que podem interferir e modificar o comportamento produtivo e reprodutivo.

Analisando cada período estudado, verificou-se um total de 75 *spots* protéicos nos mapas bidimensionais com diferença significativa em relação à %Vol na distribuição da expressão protéica (Figura 7). Destes, 65 *spots* protéicos foram maior diferentemente expressos entre os animais no período chuvoso, apresentando MW entre 13,9 e 115,9 kDa e pI de 4,1 a 6,6. Já nos animais durante o período seco encontrou-se somente oito *spots* foram mais diferencialmente expressos com MW de 14,65 a 37,7 kDa e pI de 4,1 a 6,6 entre os plasma seminal dos caprinos Moxotó.

Observa-se que o período seco apresentou menor diversidade de proteínas diferencialmente expressas obtidas por meio da técnica de 2D-PAGE. Além disso, também foi observado nesse período a presença de proteínas de baixo peso molecular (<40 kDa), que supõe-se que sejam as mesmas encontradas por Jobim et al. (2003) cuja função tinha relação com a manutenção da motilidade espermática. Assim, sugere-se que nesse experimento, com caprinos Moxotó no semiárido, as proteínas de baixo MW no período seco podem ser as responsáveis pela não observação de diferença significativa entre os parâmetros espermáticos. Entretanto, Souza et al. (2009) estudando proteínas no período de baixo índice pluviométrico em plasma seminal de caprinos Alpina Americana, em clima tropical, verificaram ausência de proteínas de baixo MW, e com isso observaram também

diferença significativa entre a motilidade espermática entre os períodos de baixo e alto índices pluviométricos.

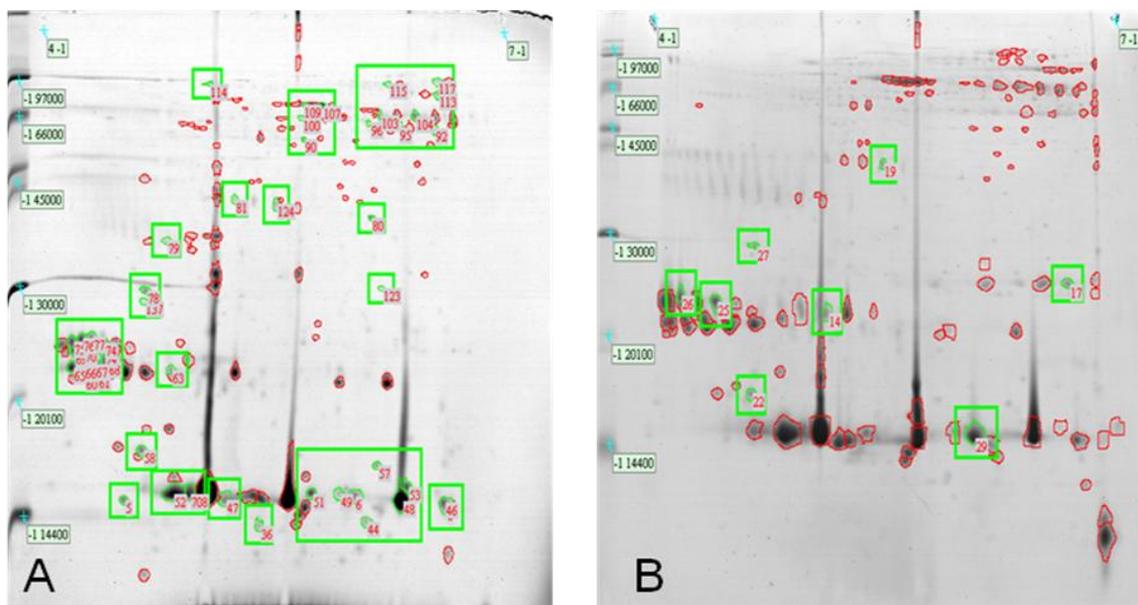


Figura 7. Representando mapas bidimensionais dos 75 *spots* protéicos diferencialmente expressos nos períodos chuvoso e seco, analisados pelo software *ImageMaster Platinum* versão 7.0. (A) Gel referência do período chuvoso com seus 65 *spots* similares no período. (B) Gel referência do período seco com oito *spots* similares no período

Ao serem comparados todos os géis dos períodos seco e chuvoso pelo software *ImageMaster Platinum* versão 7.0, foi detectado de forma consistente a presença de 12 *spots* protéicos (S0, S1, S2, S3, S4, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13) comum a todos os animais, sendo 10 *spots* (S0, S1, S2, S3, S4, S7, S8, S9, S10, S11) com MW menores que 30 kDa, correspondendo a 83,3% dos *spots* de proteínas similares e dois *spots* (S12 e S13) de proteínas com MW em torno de 50,1 e 72,6 kDa, respectivamente (Figura 8).

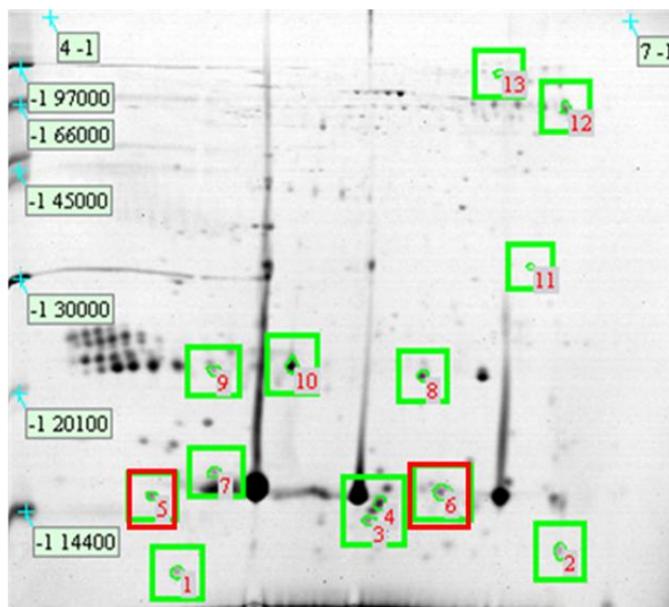


Figura 8. Gel de referência representando os *spots* similares nos períodos chuvoso e seco (quadrado verde) e os *spots* 5 e 6 (quadrado vermelho) presentes apenas no período chuvoso, de acordo com as análises do *software ImageMaster Platinum* versão 7.0

Os 12 *spots* protéicos foram identificados no banco de dados Uniprot, Expsy, pela ferramenta TagIdent através da comparação por pl e MW, sendo as proteínas a seguir discriminadas (Tabela 4):

- a) A proteína S1 (12,1 – 14,4 kDa, pl 6,2 – 6,6) pode ser a *thioredoxins* (Trxa), que são proteínas de baixo MW (12 kDa), essenciais para a vida de mamíferos, participando em diferentes processos celulares nos quais funciona como antioxidante, facilitando assim a redução de outras proteínas como as espécie reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelas células espermáticas, principalmente, no estresse oxidativo. Este pode ser ocasionado pelo estresse térmico escrotal que resulta da redução de oxigênio abaixo do requerido para a função normal deste tecido (Paul et al., 2009). Esse grupo pertencente às proteínas ROS, mais comumente produzidas pelo espermatozoide, são constituídas de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila (De Lamirande e Gagnon,

1999). No entanto, o mecanismo bioquímico responsável pela produção de ROS pelo espermatozoide ainda não está elucidado.

As proteínas Trxa, com sua função antioxidante, exercem influência direta ou indireta nos mecanismos que previnem danos causados pelo estresse oxidativo e pelo ataque imunológico aos espermatozoides, também tendo essas proteínas associação com a proteção das células espermáticas. Além da Trxa, as proteínas lactoferrina, albumina e aSFP (*acidic seminal fluid protein*) participam da função de proteção dos espermatozoides contra os danos oxidativos (Schoneck et al., 1996). Apesar de serem identificadas em ambos os períodos estudados, as Trxa podem ser importantes para a região semiárida do Nordeste, cujas temperaturas são elevadas ao longo do ano. Provavelmente, estas proteínas desempenhem função de proteção das células espermáticas evitando o estresse oxidativo.

b) A proteína S2 (MW 13,0 – 14,0 kDa; pI 6,2 - 6,6) corresponde a ribonuclease (RNase), uma proteína de 14,0 kDa que cobre a superfície da célula espermática na ejaculação, classificadas como uma das principais proteínas no plasma seminal de bovinos (Shivaj et al., 1989). Apesar desse estudo não ter realizado criopreservação do sêmen, Roncoletta et al. (2002) identificaram essa proteína em altas concentrações no plasma seminal de touros com baixa qualidade de sêmen após a descongelação. Embora não se tenha encontrado trabalhos ligados à fertilidade com a presença dessa proteína, sugere-se que a mesma não interfira significativamente na qualidade do sêmen, uma vez que os animais deste experimento apresentaram quadro espermático dentro do previsto pelo CBRA (1998). Outrossim, trabalhos envolvendo esta proteína no processo de congelação/descongelação do sêmen caprino precisam ser realizados.

c) A proteína S3 (14,0 kDa; pI 5,6) provavelmente corresponde a fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), encontrada nos dois períodos estudados. É uma importante enzima secretada pelas glândulas bulbouretrais de caprinos, de baixo MW (13,2 kDa) e pI de 7,7, fazendo parte da família das fosfolipases que catalisam a liberação de ácidos graxos e de lisofosfolipídios (Lee, 2003). La Falci et al. (2002) verificaram que o excesso de atividade da FLA<sub>2</sub> pode ser observada no plasma seminal de caprinos durante a estação não sexual, podendo produzir lisolipídeos em excesso, os quais causam danos à membrana espermática. Nunes (1982) observou durante a estação não reprodutiva, que as glândulas bulbouretrais hipertrofiaram e aumentam a sua atividade sob influência das altas concentrações plasmáticas de prolactina, produzindo mais FLA<sub>2</sub>. Embora este estudo tenha sido feito no semiárido do Nordeste, onde não há estacionalidade reprodutiva, observou-se a presença da FLA<sub>2</sub> em ambos os períodos, indicativo de hipertrofia das glândulas bulbouretrais, possivelmente, devido às características climáticas da região. Portanto, mesmo presentes, essas FLA<sub>2</sub> não têm mostrado interferir de modo significativo nos parâmetros espermáticos dos animais da região.

d) A proteína S4 (MW 14,7-15,8 kDa; pI 5,7) corresponde a lisozima C-1 identificada no plasma seminal humano (Edström et al., 2008) e bovino (Schollum et al., 1977; Lahnsteiner e Radner, 2010) como uma proteína que proporciona proteção antimicrobiana para os espermatozoides no sistema reprodutivo feminino. Lahnsteiner e Radner (2010), estudando a atividade da lisozima e concentrações de imunoglobulina no sêmen de bovinos, observaram que animais com motilidade elevada apresentaram maior atividade da lisozima e menor concentração de imunoglobulina em comparação aos animais com baixa motilidade. A presença dessa proteína nos caprinos Moxotó, em ambos os períodos estudados, permite afirmar que o plasma seminal tenha componentes capazes de propiciar uma

proteção antimicrobiana à célula espermática, conferindo uma boa qualidade ao sêmen ao longo do ano.

e) A proteína S7, provavelmente, é a *Ubiquitin conjugation factor E4*, com MW variando de 16,1 a 17,5 kDa e pl de 4,8 a 5,0, que representa importante função na reprodução. Estudos relatam que essa proteína tem participação na fertilização e gametogênese em mamíferos (Bebington et al., 2001; Sakai et al., 2004). Sutovsky et al. (2001) estudando essa proteína no epidídimo de bovinos verificaram que esta parece estar envolvida no controle da qualidade do esperma, através da eliminação de células espermáticas patológicas por fagocitose. Neste trabalho, como esta proteína esteve presente nos dois períodos do ano e em todos os animais estudados, provavelmente seja responsável pela boa qualidade do sêmen avaliado.

f) A proteína S8 (MW 21,3 e pl 5.9), possivelmente, pode ser considerada como o *mediador do RNA polymerase II transcription*. No entanto, não foi encontrado na literatura informações com relação à função dessa proteína na reprodução. Porém, estudos relatam tratar-se de um componente do complexo mediador que pode reprimir ou ativar a transcrição. Esses complexos mediadores são essenciais para a expressão basal e regulação de quase todas as RNA polimerases (Siegal et al., 2005).

Observou-se nas análises dos géis, através do *software ImageMaster*, a presença de dois *spots* protéicos S5 e S6, de baixo MW (15,0 e 15,1 kDa) e pl ácido (4,5 e 6,0), respectivamente, que estiveram presentes somente no período chuvoso em todos os animais (Figura 8 e 9). Esses *spots* protéicos, provavelmente, são da família BSP, que segundo afirmação de Desnoyers et al. (1994) e Fraser et al. (1996), é a mais abundante no plasma seminal de bovino e, principal proteína de ligação à heparina, apresentando pl entre 4,6 e 7,2 e MW entre 12 e 17 kDa. Possui importância na fertilização, especificamente, na

capacitação espermática, conferido pela sua ligação ao grupo de colina de fosfolípidios presentes na membrana do espermatozoide (Desnoyers e Manjunath, 1992). Em caprinos, essas proteínas foram observadas nas amostras de sêmen *in natura* e são denominadas de proteína seminal caprina (GSP; 14-15 kDa) (Villemure et al., 2003).

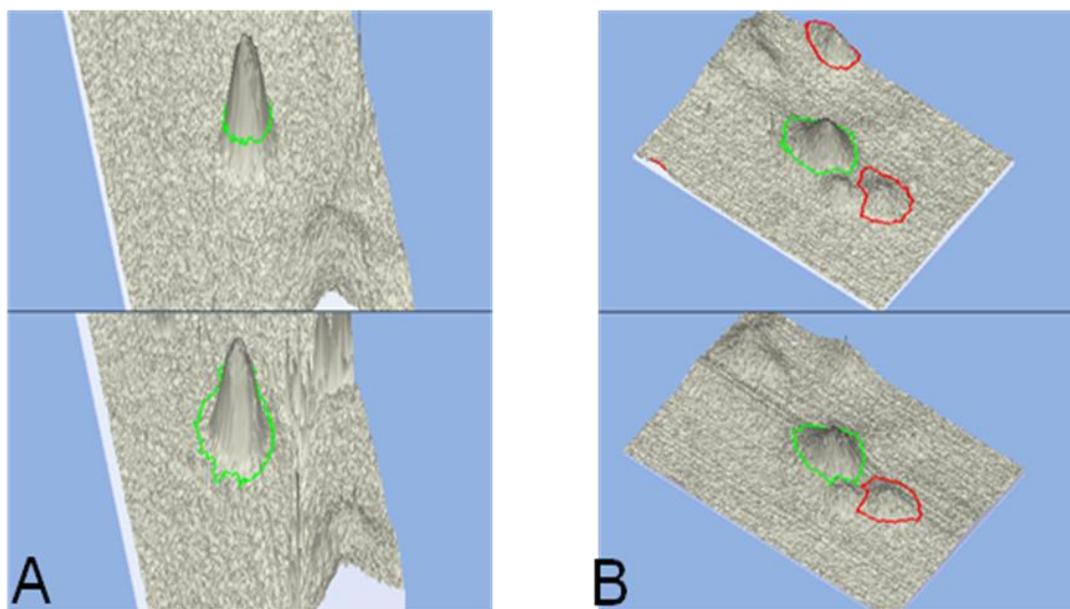


Figura 9. Imagens do software *ImageMaster Platinum* versão 7.0 dos *spots* protéicos, em géis bidimensionais, presentes exclusivamente no período chuvoso. (A) *spot* protéico 5 e (B) *spot* protéico 6

Nesse estudo, a presença dessas proteínas pode ser um indicativo ou um marcador de fertilidade para a espécie caprina. O fato de a mesma estar presente somente no período chuvoso poderá sugerir que este seja o mais adequado para realização de estações de cobertura, inseminações ou também para manipulações do sêmen em caprinos na região semiárida do Nordeste.

Finalmente, o perfil protéico do plasma seminal de caprinos na região Nordeste não mostrou ser influenciado pelas épocas chuvosa e seca, exceção feita às BSPs ou GSPs, proteínas que se ligam à heparina e que têm importante

função na fertilidade. Estas, provavelmente, poderão vir a ser consideradas biomarcadores para fertilidade na espécie caprina.

Tabela 4. Proteínas similares no período chuvoso e seco presentes nos caprinos Moxotó adultos identificadas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida através do banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent disponível *online* no portal ExPASy com seus respectivos pesos moleculares (MW), ponto isoelétrico (pI) e funções

Proteínas	Spots	MW (kDa)	Pi	Função	Referências
<i>Thioredoxin</i>	S1	12,1-14,4	6,2-6,6	Antioxidante espermático	Paul et al. (2009)
Ribonuclease	S2	13,0-14,0	6,2-6,6	Proteção na criopreservação do sêmen	Shivaj et al. (1989) Roncoletta et al. (2002)
Fosfolipase A <sub>2</sub>	S3	14,0	5,6	Catalisa a liberação de ácidos graxos e de lisofosfolípidios no espermatozoide	Lee (2003) La Falci et al. (2002)
Lisozima C-1	S4	14,7-15,8	5,7	Proteção antimicrobiana	Lahnsteiner e Radner (2010)
<i>Ubiquitin conjugation factor E4</i>	S7	16,1-17,5	4,8-5,0	Proteção através da fagocitose/eliminação de células espermáticas defeituosas	Sutovsky et al. (2001)
<i>mediador do RNA polymerase II transcription</i>	S8	21,3	5,9	Regulação da transcrição celular/Sem função definido na reprodução	Siegal et al., 2005

#### Proteínas identificadas na espectrometria de massa

Foram analisados através da espectrometria de massa, 75 *spots* protéicos que apresentaram %Vol diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) nos géis 2D-PAGE entre os períodos chuvoso e seco (Figura 5). Utilizando os valores das massas de peptídeos trípticos, provenientes das análises por MALDI-ToF (*Matrix-assisted*

*laser desorption/ionization – time of flight*), juntamente com os valores de pI e MW, identificou-se oito proteínas através de cruzamento com os bancos de dados (Swiss-Prot e NCBI), cuja ferramenta ProFound identificou sete proteínas, através do MW, e a MASCOT, que utilizou sequências de aminoácidos, detectando apenas uma proteína (Tabela 5).

Tabela 5. Proteínas do plasma seminal de caprinos Moxotó adultos identificados por eletroforese bidimensional SDS-PAGE e espectrometria de massa (MALDI-ToF), nas ferramentas ProFound e MASCOT

Spots (Período)*	Proteínas	MW/pI		Proteína ID (gi)	Sequência Coberta
		Teór.	Exper.		
ProFound					
27 (PS)	<i>Histone H100-like Putative palmitoyltransferase</i>	33,2/11,4	28,4/4,7	332231463	18%
29 (PS)	<i>ZHHHC4</i>	40,9/8,6	14,7/6,1	109065941	5%
48 (PC)	<i>rCG55718 Immunoglobulin heavy chain</i>	9,3/5,4	14,9/6,3	149021127	17%
47(PC)	<i>Hypothetical protein</i>	12,2/9,3	15,1/5,7	13364887	14%
52 (PC)	<i>LOC100720506 cAMP response</i>	14,8/8,9	15,3/4,8	348563064	9%
708 (PC)	<i>element binding protein Hypothetical protein</i>	8,4 /3,8	15,7/4,9	4261569	88%
51 (PC)	<i>LOC100720506</i>	14,8/8,9	15,3/5,8	348563064	9%
MASCOT					
25 (PS)	<i>RNA polymerase subunit k</i>	-	27,7/4,3	272569	-

\*PC: Período Chuvoso / PS: Período Seco

Os motivos que causaram a não identificação dos outros *spots* protéicos podem ser vários, como: não ionização das proteínas (a espectrometria de massa só analisa moléculas carregadas, o qual precisa ser ionizado, por exemplo, pela ação do ácido fórmico), baixa quantidade de proteínas (não havendo quantidade suficiente para formação do espectro de massa), alta quantidade de proteínas

(excesso de peptídeos polui o espectro perdendo a resolução) e a falta de banco de dados, que mesmo que tenha ótimos espectros, impossibilita a identificação.

Nenhuma proteína demonstrou homologia direta com a espécie *Capra hircus*, fato este justificado pelo reduzido número de proteínas e genes depositados nos bancos de dados, sendo, portanto, utilizados bancos de outras espécies como de ratos, primatas e bovinos. Dessa forma, essas proteínas identificadas e que não possuem relatos na literatura em relação à fisiologia reprodutiva do macho caprino precisam ser investigadas.

Dentre as proteínas identificadas no período seco, a *histone H100-like* fazem parte de um pequeno grupo formado por quatro proteínas presentes em grande quantidade, sendo ricas em arginina e lisina e associadas ao DNA das células eucarióticas, formando o nucleossomo que é a unidade da cromatina (Thatcher e Gorovsky, 1994). A cromatina exerce função de proteção a eventuais danos aos espermatozoides, causados pelo ambiente ou pela idade do animal (Sousa et al., 2010). De acordo com Sun et al. (1997), numa população de indivíduos com problema de fertilidade, mais de 40% dos indivíduos apresentaram problemas na cromatina. Recentemente, Steilmann et al. (2010) relataram que a *histone H100-like* está envolvida na regulação da expressão gênica após a fertilização em humanos, sendo encontrada baixa concentração desta proteína em indivíduos subfértéis. No trabalho em análise, a proteína *histone H-100 like*, encontrada no plasma de caprinos Moxotó, apresentou maior concentração no período seco, demonstrando que seja uma possível ação na proteção da cromatina das células espermáticas aos danos ambientais de altas temperaturas e de baixa umidade do semiárido do Nordeste.

A *immunoglobulin heavy chain* (IgH) foi diferencialmente expressa no período chuvoso e é caracterizada como uma grande subunidade polipeptídica de um anticorpo (imunoglobulina), sendo considerada, geralmente, altamente polimórfica, com variação entre os animais (Wang et al., 2008). A função da IgH no plasma seminal de caprinos ainda não é conhecida. Porém em humanos, Chiu e Chamley (2003) na Nova Zelândia, relataram a presença desse anticorpo em 20% dos pacientes que procuram tratamento de infertilidade e concluíram que esse tem

função de ligar-se às proteínas do plasma seminal para proteger a célula espermática de efeitos danosos. Portanto, a identificação dessa proteína para os caprinos Moxotó é relevante, principalmente para selecionar reprodutores de alta linhagem que se encontram com problemas temporários de fertilidade.

Somente a proteína *RNA polymerase* foi identificada pela ferramenta MASCOT, sendo essa encontrada diferencialmente expressa no período seco no plasma seminal dos caprinos. Estudos verificaram que a presença de *RNA polymerase* nos espermatozoides maduros de epidídimos de ratos (Wilkerson e Sarge, 2009) e bovinos (Fuster et al., 1977) tem função na maturação da célula espermática. Segundo Svarcova et al. (2008), estudando fêmeas bovinas que tiveram seus embriões pré-implantados, observaram que a *RNA polymerase* tem participação no desenvolvimento do núcleo durante a transcrição nas células embrionárias. Dessa forma, a identificação da *RNA polymerase* no plasma seminal de caprinos em maior quantidade no período seco, sugere uma importante cooperação dessa proteína no processo da espermatogênese, propiciando condições adequadas para a produção de células germinativas mesmo em ambiente hostil.

## CONCLUSÕES

A variação sazonal do clima tropical na região semiárida do Nordeste não mostrou interferir na qualidade do sêmen dos caprinos da raça Moxotó, mesmo havendo diferença entre as variáveis meteorológicas entre os períodos estudados e uma menor diversidade de proteínas diferencialmente expressas no período seco do que no chuvoso. Esses resultados podem ser explicados, provavelmente, pela rusticidade e adaptabilidade da raça Moxotó e à presença de 12 proteínas similares com função de proteção das células espermáticas nos dois períodos.

No período chuvoso foram detectados dois *spots* da família das GSPs, podendo vir a serem potenciais marcadores da fertilidade na raça Moxotó;

E pela primeira vez foram identificadas no plasma seminal de caprinos as proteínas: ***histone H100-like***, *putative palmitoyltransferase*, ***immunoglobulin heavy chain***, *cAMP response element binding protein* (ProFound) e a proteína ***RNA polymerase*** (MASCOT).

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFIA

- ALVES, A. G. C.; PIRES, D. A. F.; RIBEIRO, M. N. Conhecimento local e produção animal: uma perspectiva baseada na etnozootecnia. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.45-56. 2010.
- ASADPOUR, R., ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; ASRI REZAI, S.; ANSARI, M.H.K. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.308-312, 2007.
- ASADPOUR, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Seasonal variation in antioxidant enzyme activity in seminal plasma in Holstein bulls. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, p.173-176, 2012.
- AZERÊDO, G. A. **Avaliação das características seminais, dos níveis séricos de testosterona e do perfil protéico de ejaculados caprinos por eletroforese bidimensional**. 2003. 84p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista Jaboticabal –SP.
- BARRIOS, B.; PEREZ-PE, R.; GALLEGRO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUINO BLANCO, 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.
- BEBINGTON, C; DOHERTY, F.J.; FLEMING, S.D. The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. **Human Reproduction Update**, v.7, n.1, p.102-111, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECOBERT, G.; JORRIM, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteomic analysis. **Proteomics**, v.4, p.258-298, 2004.
- CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M. et al. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, v.72, p.930-948, 2009.

- CHIU, W.W.; CHAMLEY, L.W. Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein. **Journal of Reproductive Immunology**, v.60, p.97-111, 2003.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2 Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.
- DE LAMIRANDE E, GAGNON C. **The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function**. In: Gagnon C. The male gamete: from basic science to clinical application. Vienna, IL: Cache River Press, p.455- 467, 1999.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.10149-10155, 1992.
- DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, n.425-435, 1994.
- EDSTRÖM, A.L.; MALM, J.; FROHM, B.; MARTELLINI, A.J.; GIWERCMAN, A.; MÖRGELIN, M.; COLE, A.M.; SORENSEN, O.E. The Major Bactericidal Activity of Human Seminal Plasma Is Zinc-Dependent and Derived from Fragmentation of the Semenogelins. **The Journal of Immunology**, v.181, n.5, p.3413-3421, 2008.
- ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v.17, p.2904–2911, 2002.
- ERAVCI, M.; FUXIUS, S.; BROEDEL, O.; WEIST, S.E.; MANSMANN, U.; SCHLUTER, H.; TIEMANN, J.; BAUMGARTNER, A., Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v.7, p.513-523, 2007.
- FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.T; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.211-219, 2011.
- FRASER, G.S.; BUCCI, D.M.; BROOKS, C.L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-milliliter straws. **Theriogenology**, v.43, p.1103-1115, 1996.
- FUSTER, C.D.; FARRELL, D.; STERN, F.A.; HECHT, N.B. RNA polymerase activity in bovine spermatozoa. **The Journal of Cell Biology**, v.74, n.3, p.698-706, 1977.

- GADEA, J.; SELLÉS, E., MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction Domestic Animal**, v.39, n.5, p.303-308, 2004.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v.69, n.3, p.809-15, 2003.
- HARSHAN, H.M.; SANKAR, S.; SINGH, L.P.; SINGH, M.K.; SUDHARANI, S.; ANSARI, M.R.; SINGH, S.K.; MAJUMDAR, A.C.; JOSHI, P. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.306-311, 2009.
- HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.48-53, 2010.
- HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GÓÑEZ, J.; HELDIN, C.H. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Analytical Biochemistry**, v.224, p.451-455, 1995.
- HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterogenous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.199-204, 1996.
- HIRON, M.; HARSHAN, L.P.; SINGH, A.; ARANGASAMY, M.R.; ANSARI KUMAR, S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.93, n.124-133, 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Climatologia mapas**. [online]. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/climato/mapclima.html>>. Acesso em: 20/12/2011.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255-266, 2004.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.R.; SOUZA, D.O.G.W.; MATTOS, V.B.; COSTA, 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 Scientiae Veterinariae**, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A., ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- LA FALCI, V.S.N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J.L., BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v.57, p.1035-1048, 2002.
- LAHNSTEINER, F.; RADNER, M. Lysozyme activities and immunoglobulin concentrations in seminal plasma and spermatozoa of different teleost species and indications on its significance for sperm function. **Theriogenology**, v.74, n.2, p.246-254, 2010.
- 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.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- LEE Y.H.; BAHN C.S.; KANG Y.; LEE H.K.; KIM J.H.; NOH K.E.; JIWAN P.; SHIN J.S.; RYU B.S. Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in arabidopsis. **The Plant Cell**, Stanford, v.15, p.1990–2002, 2003.
- MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.175-179, 2011.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109-119, 2002.
- MARTINS JÚNIOR, L.M.; COSTA, A.P.R.; RIBEIRO, D.M.M. et al. Respostas fisiológicas de caprinos Boer e Anglo-Nubiana em condições climáticas de meio-norte do Brasil. **Caatinga**, v.20, n.02, p.01-07, 2007.
- MATOS, M.N.C. **Efeito da sazonalidade no perfil de proteínas de espermatozoides em caprinos da raça Moxotó**. 2012. 68p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará – CE.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, P.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**. v.43, 4 (suppl.), p.18-31, 2008.

- NASCIMENTO, M.C.A. **Proteômica e caracterização bioquímica da embriogênese em pupunha (*Bactris gasipaes*)**. 2009. 88p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina –SC.
- NOGUEIRA, F.C.S. **Análise Proteômica da Deposição de Proteínas em Sementes em Desenvolvimento e Suspensões Celulares Embriogênicas de Feijão-de-Corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 2007, 80p. Fortaleza: UFC - Dissertação de Mestrado, 2007.
- NOVAK, S.; NCHEZ, A.R.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. **Journal of Andrology**, v.31, n.2, 2010.
- NUNES, J.F. **Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc**. 1982, 45p. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) - Université Paris VI, 1982.
- NUNES, J.F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.12, p.77-83, 1988.
- O'FARRELL, P.H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v.250, p.4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, R.R.; EGITO, A.A.; RIBEIRO, M.N.; PAIVA, R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; CASTRO, S.R.; MARIANTE, A.S.; ADRIÃO, M. Genetic characterization of the Moxotó goat breed using RAPD markers. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.3, p.233-239, 2005.
- PARK, K.O. Proteomic studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.133-138, 2004.
- PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P.T.K.A.; SINGLE, M. Transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biology of reproduction**, v.80, p.913–919, 2009.
- PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros bioquímicos do PS de 3 tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In:Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza, p.416-418, 1996.
- RIBEIRO, M.N.; PIMENTA FILHO, E.C.; CRUZ, G.R.B. Situação atual e perspectivas, p. 43-51. **Conservação de raças caprinas nativas do Brasil: histórico, situação atual e perspectivas**/editor Maria Norma Ribeiro; Juan Vicente delgado Bermejo... et al. – Recife: UFPE, imprensa universitária, 2004.

- ROCHA, L. L.; BENÍCIO, R. C.; OLIVEIRA, J. C. V.; RIBEIRO, M. N.; DELGADO, J. V. Avaliação morfoestrutural de caprinos da raça Moxotó. **Archivos de Zootecnia**, v.56, p.483-488, 2007.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSON, B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, n.1-3, p.297-308, 1997.
- RONCOLETTA, M.; MORANDI, E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H.; RAMOS, P.R.R. Caracterização da proteína 26KDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 28(suppl), p.323, 2000.
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; FRANCESCHINI, P.H. 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull semen freezability. **Theriogenology**, v.57, p.479, 2002.
- SAKAI, N.; SAWADA, M.T.; SAWADA, H. Non-traditional roles of ubiquitin-proteasome system in fertilization and ga metogenesis. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.36, n.5, p.776-784, 2004.
- SCHOLLUM, L.M.; JARVIS, B.D.W.; BACON, D.F. Antimicrobial activity of bovine seminal plasma. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.20, n.3, p.283-290, 1977.
- SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipiperoxidation. **Theriogenology**, v.45, p.633-642, 1996.
- SHIVAJ, S.; RUKMINI, V.; GUPTA P.D.; BHARGAVA, P.M. Localization of bovine seminal plasma RNA-A BS1, on the superface of bovine spermatozoa. **Cell and Molecular Biology**, v.3, p.285-291, 1989.
- SIEGAL, M.L.; BAKER, B.S. Functional conservation and divergence of intersex, a gene required for female differentiation in *Drosophila melanogaster*. **Development Genes and Evolution**, v.215, p.1-12, 2005.
- SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P.; AZEVEDO, S.A.; AZEVEDO NETO, J.; SILVA, E.M.N.; SILVA, A.K.B. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibaino. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v.01, p.07-14, 2005.
- SOUZA, A.P.; SANTOS, J.R.; SANTOS, T.A. A Importância da Integridade da Cromatina dos Espermatozóides na Infertilidade Masculina. **Actas Urológicas**, v.27, n.2, p.37-47, 2010.

- SOUZA, A.F.; LEITÃO, M.C.G.; BATISTA, A.M.; PORTO, A.L.F.; FILHO, J.L.L.; GUERRA, M.M.P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**. v.39, n.4, p.1155-1161, 2009.
- SOUZA, C.E.; MOURA, A.; OLIVEIRA, J.T.; RADIS-BAPTISTA G.; ARAUJO, A.; LIMA, A. **Seminal plasma proteins, testis development na sêmen criteria in the ram**. In: 29th Anual Meeting ASA, p.91, 2004.
- SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; ARAÚJO, A.A.; LIMA, A.C.B.; NÉIVA, J.N.M. Características reprodutivas, concentração de proteínas seminais e testosteronemia de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida. In: IV REUNIÃO REGIONAL DA SBBQ – NORDESTE, 6., 2002, Fortaleza, CE. **Anais...Fortaleza**, 2002, CD-ROOM.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's Guide. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869p.
- STEILMANN, C.; CAVALCANTI, M.C.O.; BARTKUHN, M.; PONS-KÜHNEMANN, J.; SCHUPPE, H.C.; WEIDNER, W.; STEGER, K.; PARADOWSKA, K.; PARADOWSKA, A. The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. **Society for Reproduction and Fertility**, p. 1741-7899, 2010.
- SUN, J.G.; JURISICOVA, A.; CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.56, p.602-607, 1997.
- SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; THOMPSON, W.E.; SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis **Journal of Cell Science**, v.114,p.1665–1675, 2001.
- SVARCOVA, O.; STREICEK, F.; PETROVICOVA, I.; AVERY, B.; PEDERSEN, H.G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; LAURINCIK, J. MADDOX-HYTTEL, P. The role of RNA polymerase I transcription and embryonic genome activation in nucleolar development in bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, n.7, p.1095-1103, 2008.
- TEIXEIRA, A.V.C.; ELOY, A.M.X.; FURTADO, J.R.; PINHEIRO, R.R.; PONTES, M.S. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Animal Reproduction**, v.6, n.4, p.516-525, 2009.
- TEIXEIRA, D.I.A.; MELO, L.M.; GADELHA, C.A.A.; CUNHA, R.M.S.; BLOCH, C.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; CAVADA, B.S.;FREITAS, V.J.F. Ion-exchange

chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.79-87, 2006.

THATCHER, T.H.; GOROVSKY, M.A. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3 and H4. **Nucleic acids research**, v.22, p.174-179, 1994.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**. v.89, p.159-170, 2005.

VIEIRA, S. **Introdução a bioestatística**. Ed. Campus, 3º edição, 1980.

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.

WANG, YAN; JACKSON, K.J.L.; SEWELL, W.A.; COLLINS, A.M. Many human immunoglobulin heavy-chain IGHV gene polymorphisms have been reported. **Immunology and Cell Biology**, v.86, p.111-115, 2008.

WILKERSON, D.C.; SARGE, K.D. RNA polymerase II interacts with the *Hspa1b* promoter in mouse epididymal spermatozoa. **Reproduction**, v.137, p.923-929, 2009.

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 of Reproduction**, v.68, p.904–913, 2003.

YUE, W.; SHI, L.; BAI, Z.; REN, Y.; ZHAO, Y. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.386-391, 2009.

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na espécie caprina, embora os trabalhos em proteômica seminal ainda estejam se iniciando, alguns achados importantes já podem ser logrados, esperando-se que mais estudos sejam realizados com a finalidade de identificar marcadores para fertilidade, prolificidade, congelabilidade do sêmen, diagnóstico e prognóstico de doenças, entre outros, de importância fundamental para formação de rebanhos produtivos e também de conservação de espécies em extinção.

Predizer a fertilidade do reprodutor não é o único benefício que o conhecimento das funções do plasma seminal e de seus marcadores moleculares trará para a produção animal. Além disso, servirá para avaliar metodologias de processamento de sêmen, melhoria do sêmen em reprodutores temporariamente inférteis, e na seleção de reprodutores de mamíferos, em especial na espécie caprina.

Sabe-se que ainda há necessidade de mais estudos, porém o importante é que as pesquisas estão avançando com foco na fisiologia reprodutiva e na função das proteínas seminais de caprinos nativos e adaptados que habitam a região semiárida do Nordeste do Brasil.