

**ANDREIA FERNANDES DE SOUZA**

**PERFIL DAS PROTEÍNAS DO SÊMEN DE CAPRINOS DA  
RAÇA ALPINA AMERICANA NAS ESTAÇÕES  
SECA E CHUVOSA**

**RECIFE**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PERFIL DAS PROTEÍNAS DO SÊMEN DE CAPRINOS DA**  
**RAÇA ALPINA AMERICANA NAS ESTAÇÕES**  
**SECA E CHUVOSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra.

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> . Ana Lúcia Figueiredo Porto

**RECIFE-PERNAMBUCO**

**Fevereiro /2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S729p Souza, Andreia Fernandes de  
Perfil das proteínas do sêmen de caprinos da raça Alpina Americana nas estações seca e chuvosa / Andreia Fernandes de Souza.  
-- 2008.  
105 f. : il.

Orientadora : Maria Madalena Pessoa Guerra  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.  
Inclui bibliografia.

CDD 636.390 824

1. Caprino
  2. Proteínas
  3. Sêmen
  4. Congelação
- I. Guerra, Maria Madalena Pessoa  
II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PERFIL DAS PROTEÍNAS DO SÊMEN DE CAPRINOS DA RAÇA ALPINA**  
**AMERICANA NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA**

Tese de Doutorado elaborada por

ANDREIA FERNANDES DE SOUZA

*Aprovada em 25/02/2008*

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE  
Orientadora

---

Prof.Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura/ UFC

---

Prof. Dr. Antonio Rodrigues da Silva/UFMT

---

Prof.Dr. Sony Dimas Bicudo/UNESP

---

Prof. Dr.José Luis de Lima Filho/ UFPE

---

Prof. Dr. Francisco Fernando Ramos de Carvalho/UFRPE

## **DEDICO**

**Ao meus pais, Luiz Souza e Odete Souza,  
ao meu irmão Luis Henrique, Anselmo  
Foster (esposo) e meu filho Victhor  
Foster, que são os responsáveis pela minha  
felicidade. AMO MUITO VOCÊS**

**Ao amigo Dimas Bandeira (*in  
memorian*) que nos deixou cedo, mais que  
durante o período que esteve junto a nós  
deixou seus ensinamentos e amor à  
caprino-ovinocultura.**

## AGRADECIMENTO

Faça uma lista de grandes amigos  
Quem você mais via há dez anos atrás  
Quantos você ainda vê todo dia .Quantos você já não encontra mais  
Faça uma lista dos sonhos que tinha, quantos você desistiu de sonhar  
Quantos amores jurados pra sempre, quantos você conseguiu preservar  
Onde você ainda se reconhece, na foto passada ou no espelho de agora  
Hoje é do jeito que achou que seria?  
Quantos amigos você jogou fora, quantos mistérios que você sondava  
Quantos você conseguiu entender, quantos defeitos sanados com o tempo  
Eram o melhor que havia em você  
Quantas mentiras você condenava, quantas você teve que cometer  
Quantas canções que você não cantava, hoje assobia pra sobreviver  
Quantos segredos que você guardava, hoje são bobos ninguém quer saber  
Quantas pessoas que você amava  
Hoje acredita que amam você

(A lista, Oswaldo Montenegro)

Resolvi fazer minha lista, sendo que de agradecimento. Aqui não existe grau de participação, pois todos contribuíram para tornar esse sonho possível de ter sido vivido. Desejo a todos vocês, Paz, Amor, Saúde, Sucesso, Prosperidade... Hoje e sempre...Simplesmente porque: Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós.

*DEUS* -“ Agindo Deus sua vitória quem impedirá ninguém. É a presença de um DEUS vivo e fiel que cumpre o que diz....”

À *Prof(a). Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra*, por sua atenção e pelo carinho dedicado. Agradeço sua energia que positivamente muitas batalhas me ajudou a ganhar, a sua força que bravamente conseguiu me emprestar. Que eu possa ter correspondido às suas expectativas durante esses dez anos de dedicação ao Androlab. Muito obrigada por tudo e que o Senhor continue sempre iluminando seus caminhos trazendo paz, amor e vitórias;

À *Prof(a). Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto*, pela amizade e colaboração no trabalho. “Menina inocente que corre em busca de sonhos, atravessa oceanos, em busca de um único ideal: Ser feliz... Hoje essa menina inocente é uma mulher valente, seu ideal se concretizou. E ela está aqui pra dizer aos incompreendidos que ser feliz é lutar pelos seu ideal”;

Ao *Prof. Dr José Luis de Lima Filho*, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami -LIKA e amizade;

Ao *Prof. Dr Leucio Câmara Alves*, por ceder o microscópio de fluorescência para análise de integridade de acrossoma e de DNA;

Ao *Dr Diônes Oliveira Santos*, pela colaboração na técnica de eletroforese;

Aos amigos, *André Mariano, Clarissa Izabel, Danielli Renata, Edgar Silveira, Erica Moraes, Fernanda Tenório, Flávio Silva, Sérgio Sena, Zoraide Fernandes*, compartilhadores de ciência e risadas. “As estrelas guardam seus segredos e a vida junto do tempo os desvendam. Destinos traçados onde a sabedoria é ser simplesmente feliz”;

À amiga *Maria da Conceição Gomes leitão*, pela ajuda na realização da técnica de eletroforese bidimensional. Sem o seu auxílio não seria possível a realização deste experimento;

Aos colegas do ANDROLAB (Laboratório de Andrologia da UFRPE), *Adriana Trindade, Ellen Bento, Pedro Leopoldo, Mariana Diel, Gustavo Takeda, Katarina Michele, Cristiane Scavuzzi e Karen Mascaro*;

Aos colegas do LIKA (Laboratório de imunopatologia keiso-Asami)- *Daniela Viana, Germana, Marília, Rômulo Augusto, Taciana Cavalcanti, Tatiana Porto, Flávio Veras, Petrus*;

Aos funcionários da área de Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, *Alcir, Joana D´arc e Sônia*;

Aos meus familiares, *Célia Fernandes, Iolanda Fernandes, Sônia Fernandes, Raquel Souza, Shirley Rachel, Dayvidson Thierry, Gustavo Thierry, Fred Márcio, Lucia Helena, Igor Felipe, João Henrique e Ivaldo Souto*;

Ao criador *Adriano Aquino* – Apaixonado pela caprinocultura. Sempre disposto a ceder seus animais para realização deste e de muitos outros experimentos realizados pela UFRPE;

Aos bodes *Patrick, Botafogo e Nilo*, que mesmo sem opção ajudaram contribuindo com sêmen para esse experimento;

À CAPES- Pelo auxílio financeiro

**“Sacrifícios para Deus são o espírito quebrantado” (sl. 51:17)**



## RESUMO

Na região Nordeste do Brasil, a ausência de alimentos no período de baixo índice pluviométrico é um dos fatores que mais interferem na reprodução dos caprinos, apesar destes animais estarem bem adaptados a esta região. Objetivando avaliar o efeito dos períodos de alto (AIP) e baixo (BIP) índice pluviométrico no perfil de proteínas do sêmen de caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix (Pernambuco), foram realizadas colheitas de sêmen pelo método de vagina artificial em dois anos consecutivos (2005 e 2006). As amostras de sêmen foram submetidas à análise macroscópica (cor, volume e aspecto) e microscópica (motilidade progressiva, vigor, concentração, morfologia, integridade de acrossoma e DNA) e, a seguir, divididas em alíquotas com a finalidade de realizar os procedimentos de: 1) congelação (0,5 mL), 2) dosagem de proteínas (1 mL) e 3) análise de integridade de acrossoma e de DNA ( $\pm 0,5\text{mL}$ ). As amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em máquina TK3000 (- 0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a - 20 °C/ min, de 5 °C a -120 °C) e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37 °C; 30 segundos), as amostras foram avaliadas quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma e de DNA. O perfil de proteínas das membranas espermáticas e do plasma seminal foi realizado através da análise de eletroforese bidimensional, após dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas aplicadas no gel de eletroforese. No sêmen *in natura*, não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) na motilidade progressiva (MP) entre animais e entre os períodos BIP (79,82%) e AIP (81,25%), assim como no vigor espermático nos períodos BIP (4,17) e AIP (4,00). Porém foi observado maior ( $P<0,05$ ) percentual de espermatozoides com acrossomas íntegros colhidos no período AIP (90,25%) do que no BIP (80,26%). Após descongelação, constatou-se diferença significativa ( $P<0,05$ ) na MP das amostras colhidas nos períodos BIP (60,00%) e AIP (71,30%), e não significativa ( $P>0,05$ ) no percentual de células com acrossomas íntegros no BIP (67,98%) e AIP (66,83%). Nas amostras de proteínas extraídas da membrana de espermatozoides *in natura* e descongelado, foram identificados 56 e 165 *spots* de proteínas com 25 a 103,0 kDa e 9,0 a 131,0 kDa, e com pIs 3,36 a 9,74 e de 3,37 a 8,80, respectivamente. Na avaliação das proteínas do plasma seminal foram detectados 96 *spots* de proteínas, sendo 49 *spots* no período BIP (15 a 97 kDa e pI de 4,48 a 9,83) e 47 *spots* no período AIP (4 a 106 kDa e pI de 3,00 a 8,96). Os períodos AIP e BIP apresentaram 22 *spots* de proteínas comuns, correspondendo a 45,83% de similaridade entre os *spots* analisados. Na análise dos géis das amostras de sêmen descongelado, constatou-se aumento do número de *spots* de proteínas focalizados. Sugere-se que os grupos de proteínas de baixa massa molecular do plasma seminal e da membrana espermática de caprinos interferem na motilidade espermática; e que um grupo de proteínas de 14-15 kDa e 45kDa atua na viabilidade das células espermáticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Congelação, proteína, índice pluviométrico, caprino.

## ABSTRACT

In Northeastern Brazil, the food lack on the low pluviometric index period is one of the factors that interfere on the goat reproduction, in spite of these animals be adapted to this region. The Aim of this study was to evaluating the effect of high (HPI) and low (LPI) pluviometric index on the proteins profile of goat semen of the American Alpine race raised on Camocim de São Félix, Pernambuco. It was realized semen collection by artificial vagina method during two years (2005, 2006). The semen samples were submitted to macroscopic (color, volume and appearance) and microscopic (progressive motility, vigor, concentration, morphology, and acrosome and DNA integrity) analyses and then divided into aliquots to realize the procedures: 1) freezing (0.5 mL), 2) protein dosages (1 mL) and 3) analysis of acrosome and DNA integrity ( $\pm$  0.5 mL). The samples were packed in straws (0.25 mL), freezing in machine TK3000 (-0.25 °C/min, 25 °C to 5 °C, and - 20 °C/min of 5 °C to -120 °C) and stored in cryobiologic container (-196 C). After thawing (37 ° C, 30 seconds), the samples were evaluated to progressive motility (PM), vigor and acrosome and DNA integrity. The semen protein profile was conducted through the analysis of two-dimensional electrophoresis, after determination of total protein for standardization of the protein amount applied in gel electrophoresis. On the *in natura* semen, there was no significant difference ( $P>0.05$ ) on the PM among animals and between LPI (79.82%) and HPI (81.25%) periods, as well as on sperm vigor on the LPI (4.17) and HPI (4.00) periods. However, it was observed higher ( $P<0.05$ ) percentage of sperm with intact acrosome on semen collected on HPI (90.25%) than LPI (80.26%). After thawing, it was observed significant difference ( $P<0.05$ ) on the PM of the samples obtained during the LPI (60.00%) and HPI (71.30%) periods, and no significant difference ( $P>0.05$ ) on the cells with intact acrosome on the LPI (67.98%) and HPI (66.83%). In the protein samples extracted of *in nature* and thaw sperm membrane, 56 and 165 spots of proteins were identified with 25 to 103.0 kDa and 9.0 to 131.0 kDa, and with 3.36 to 9.74 and 3.37 to 8.80 pIs, respectively. On the evaluation of the seminal plasma proteins were detected 96 spots of protein, with 49 spots in the LPI period (15 to 97 kDa, 4.48 to 9.83 pI) and 47 spots in the HPI period (4 to 106 kDa and 3.00 to 8.96 pI). The periods HPI and LPI had 22 common spots of proteins, corresponding to 45.83% of similarity among spots analyzed. In the gel analysis of the thawed semen samples it was observed increase of protein spots number than *in natura* semen. It is suggested that groups of proteins of low molecular mass of seminal plasma membrane and the sperm of goats are responsible for sperm motility and the presence of a group of proteins on 14-15 kDa and 45kDa are responsible for the viability of the sperm cells in this experiment.

**KEYWORDS:** Freezing, protein, pluviometric index, goat.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b> 11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b> 12
<b>2.1</b>	<b>Estacionalidade reprodutiva.....</b> 12
<b>2.2</b>	<b>Criopreservação do sêmen.....</b> 13
	2.2.1 Refrigeração e diluição do sêmen..... 14
	2.2.2 Congelação do sêmen..... 15
<b>2.3</b>	<b>Comportamento das membranas celulares.....</b> 17
<b>2.4</b>	<b>Lipoproteínas de baixa densidade (LDL).....</b> 18
<b>2.5</b>	<b>Plasma seminal.....</b> 18
<b>2.6</b>	<b>Proteínas seminais.....</b> 20
<b>2.7</b>	<b>Viabilidade da célula espermática.....</b> 24
<b>3</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b> 25
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTOS.....</b> 37
<b>4.1</b>	<b>Proteínas do plasma seminal de caprinos colhido nos períodos de baixo e alto índice pluviométrico relacionadas com a qualidade do sêmen.....</b> 38
<b>4.2</b>	<b>Proteínas de membrana de espermatozóides <i>in natura</i> e após descongelação colhidos de caprinos nos períodos de baixo e alto índice pluviométrico.....</b> 57
<b>4.3</b>	<b>Perfil de proteínas de membranas espermáticas de caprinos relacionado com a congelação do sêmen .....</b> 83

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura vem sendo explorada em quase todas as regiões do Brasil, onde a variação climática, alimentar e de distribuição de renda ainda são encaixos no crescimento ordenado dessa exploração pecuária. Nos últimos anos, a criação de caprinos vem ganhando grande impulso pelo potencial que representa e é considerada um instrumento eficaz de desenvolvimento da zona semi-árida do Nordeste brasileiro.

Até recentemente, o rebanho da região Nordeste era praticamente formado por animais de aptidão para carne, por consistir em uma das poucas fontes de proteínas para a população. Com o aumento da procura por leite, decorrentes de programas sociais, novas raças estão sendo introduzidas neste rebanho. Apesar de muitas raças leiteiras não se adaptarem ao clima quente da região, o cruzamento com raças nativas vem apresentado resultados satisfatórios, aliado às boas práticas de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo.

A estacionalidade reprodutiva dos animais influencia a libido, a qualidade espermática, a ovulação e a produção de proteínas que atuam na melhoria da qualidade do sêmen (SMITH et al., 1999). Devido aos aspectos negativos que surgem na estação não reprodutiva, muitos autores fazem uso da prática de criopreservação de sêmen no período reprodutivo e da inseminação artificial (IA) no período não reprodutivo, onde há redução da qualidade espermática.

Alguns estudos têm evidenciado que a composição bioquímica do sêmen, incluindo plasma seminal e componentes espermáticos, varia de acordo com a estação do ano, interferindo, conseqüentemente, na criopreservação dos gametas masculinos e na fertilidade das fêmeas inseminadas artificialmente (MAXWELL e WATSON, 1996).

Atualmente, sistemas de criação das espécies caprinas e ovinas na região Nordeste retomaram seu crescimento, sendo este o melhor momento de implementar, no manejo das criações, biotecnologias que possibilitem maior rentabilidade ao criador e confiabilidade à técnica de I.A. O objetivo deste trabalho foi relacionar as proteínas de membrana do espermatozóide do sêmen *in natura* e congelado, bem como as do plasma seminal de reprodutores caprinos, colhido nas épocas de alto e baixo índice pluviométrico, com a sensibilidade à congelamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estacionalidade reprodutiva

A redução da fertilidade também está relacionada à estação do ano. Nunes (1982) relatou que o número de saltos e a atividade espermatogênica de bodes diferem durante as estações, sendo verificada redução qualitativa e quantitativa na produção e na capacidade fecundante do gameta masculino, uma vez que os espermatozoides têm uma porcentagem mínima de motilidade e vigor na primavera e no verão, período que coincide com o anestro das cabras. A amplitude destas funções depende da raça e da latitude, diferindo entre países, exceto nos localizados na região equatorial (KARATZAS et al., 1997). Machos caprinos das raças Alpina e Saanen são sensíveis às diferenças sazonais ao longo do ano e apresentam variações nas características reprodutivas, como comportamento sexual, perímetro escrotal e aspectos quanti-qualitativos do sêmen, mais pronunciadamente nos animais adultos (SANTOS et al., 2006).

Em criações localizadas em zonas de clima temperado do hemisfério norte (acima de 40 °N), observa-se influência climática na atividade reprodutiva dos carneiros, afetando o tamanho testicular (D' OCCHIO et al., 1984; MARTEMUCCI et al., 2000), os padrões endócrinos das gonadas (LINCOLN et al., 1990; MARTEMUCCI et al., 2000), a produção quanti-qualitativa do sêmen (PELLETIER et al., 1988; PÉREZ et al., 1997; BRANDON et al., 1999) e o comportamento sexual (POULTON e ROBINSON, 1987; BRANDON et al., 1999; MARTEMUCCI et al., 2000;), devido às variações de fotoperíodo e ambientais (COLA, 1983; COLAS et al., 1986; MARTIN et al., 1990; BRANDON et al., 1999). Em experimento realizado na região sul da Itália (latitude 41°N), constatou-se que a estação exerce influência significativa na congelabilidade do sêmen de ovinos da raça Leccese, com melhor desempenho no período de verão e de outono, correspondendo à estação reprodutiva nas zonas temperadas (ALESSANDRO e MARTEMUCCI, 2003). Achados semelhantes foram observados em caprinos das raças Alpina, Saanen e Damascus (KARATZAS et al., 1997; KARAGIANNIDIS et al., 2000).

No município de Viçosa (MG), região de clima tropical, Santos et al. (2006) relataram que caprinos das raças Alpina e Saanen apresentaram variações sazonais ao

longo do ano, sendo observadas alterações nas características reprodutivas, principalmente nos animais adultos. Estes autores constataram que o manejo do fotoperíodo adotado no período não reprodutivo foi eficiente em eliminar ou minimizando estes efeitos, possibilitando a contínua utilização destes animais ao longo do ano e, desta forma, maximizar o potencial genético destes animais.

No clima Semi-Árido Paraibano, Silva et al. (2005) constataram que nas épocas mais quentes do ano ocorreu redução na concentração espermática dos caprinos mestiços de Anglo-Nubiano x SRD, apesar destes animais se encontrarem bem adaptados ao ambiente. Segundo Santos (1999), devido à queda na qualidade espermática, se torna inviável a prática de congelamento de sêmen nos períodos de transição seca-chuva no Semi-Árido nordestino, tornando-se incompatível com o custo do processamento.

A estacionalidade influencia a composição do plasma seminal e os índices de proteínas encontrados no sêmen ovino (SMITH et al., 1999) e caprino (La FALCI et al., 2002). O período reprodutivo favorece o processo de congelamento do sêmen de carneiros quando comparado ao não reprodutivo, onde a redução na concentração de proteína total e a ausência de proteínas específicas do plasma seminal foram associadas à redução na motilidade e na congelabilidade do sêmen (SMITH et al., 1999).

A inseminação artificial também sofre os efeitos da sazonalidade. Na região da Europa Ocidental, fêmeas leiteiras são inseminadas na estação não reprodutiva, com sêmen colhido e processado na estação reprodutiva, em virtude de nesta época a produção de sêmen dos caprinos leiteiros ser reduzida (CHEMINEAU et al., 1986).

A melhoria das características seminais durante a estação reprodutiva em países localizados na zona temperada se deve ao fato de no fotoperíodo observado no verão e outono haver alteração na secreção de melatonina pela glândula pineal (CHEMINEAU et al., 1986), estimulando a secreção de LH e induzindo o crescimento testicular e a secreção de testosterona. Nos dias longos, ocorre o inverso (MIYAMOTO et al., 1987).

## **2.2 Criopreservação do sêmen**

A congelabilidade do sêmen depende não somente do indivíduo, mas também de diferentes ejaculados do mesmo indivíduo (MIES FILHO, 1986; WINDSOR, 1997),

além da concentração espermática por dose inseminante (ALESSANDRO et al., 2001). A influência do fator individual tem sido avaliada por vários autores visando analisar a capacidade de criopreservação, onde enfatizam a necessidade de avaliação prévia tanto do reprodutor quanto de diferentes ejaculados de um mesmo animal (COCHRAN et al., 1985).

As crioinjúrias observadas nos espermatozóides durante o processo de congelamento podem ser físicas, bioquímicas ou funcionais. Os danos físicos ocorrem nas membranas plasmática e acrossomal, na peça intermediária e no axonema. No entanto, estas membranas são mais sensíveis do que o núcleo e a cauda do espermatozóide (SALAMON e MAXWELL, 1995). Segundo Purdy (2006), os danos físicos diferem entre as espécies, em virtude dos espermatozóides possuírem tamanhos, formas e composição lipídica diferentes. Essas particularidades devem ser consideradas quando se desenvolve um protocolo de criopreservação, onde um mesmo protocolo pode não ser aplicável a todas as espécies.

### 2.2.1 Refrigeração e diluição do sêmen

No processo de criopreservação, a ocorrência dos danos celulares tem início na fase de refrigeração do espermatozóide, onde a redução brusca de temperatura é uma das causas do estresse letal às células (WATSON, 1981). Para tanto, aconselha-se o uso da refrigeração lenta, uma vez que neste método a água intracelular sai por osmose e, com isso, impede a formação dos cristais de gelo durante o processo de criopreservação, minimizando os danos celulares (WATSON, 2000). No entanto, o estresse ocasionado pelo processo de refrigeração não impede a ocorrência de danos à membrana, provavelmente devido à mudança da fase dos lipídeos e do estado funcional das membranas (WATSON, 1981), assim como também de outros elementos presentes na membrana, principalmente as proteínas (ROBERTSON et al., 1988).

No meio diluidor de sêmen caprino inclui-se crioprotetor não penetrante (gema de ovo ou leite), crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfoxido), estabilizante (Tris ou teste), açúcares (glucose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio) ácidos (ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (EVANS e MAXWELL, 1987). Após a diluição, o sêmen é refrigerado à temperatura de

0 a 5 °C, sendo considerado o período de adaptação em que os espermatozoides reduzem seu metabolismo. Paulenz et al. (2002), ao avaliarem diferentes diluidores e temperaturas de armazenamento, verificaram que espermatozoides ovinos refrigerados a 5 e 20 °C permanecem viáveis até 30h após uso de diluidores comerciais à base de Tris + gema de ovo, quando comparados ao uso de citrato de sódio e leite.

### 2.2.2 Congelação do sêmen

Tradicionalmente adiciona-se glicerol antes da congelação, momento em que o mesmo penetra nas células visando estabilizar as concentrações intra e extracelulares. Todavia, alguns autores têm evidenciado que o glicerol determina alterações na estrutura e na integridade bioquímica dos espermatozoides, acelerando a reação acrossomal (SALAMON e MAXWELL, 2000). Após a descongelação, a sobrevivência da célula é influenciada pela maneira com que o glicerol foi adicionado antes da congelação (FISER e FAIRFULL, 1989).

A temperatura inicial de congelação também é capaz de influenciar as características espermáticas pós-descongelação. Desta forma, segundo Bag et al. (2002), a manutenção dos espermatozoides à temperatura de -125 °C, antes de sua imersão em nitrogênio líquido, determina efeito significativamente positivo na motilidade e na velocidade dos espermatozoides criopreservados, bem como na integridade da membrana plasmática, quando comparada a temperaturas de -25 a -75 °C.

Segundo Byrne et al. (2000), algumas espécies apresentam maior sensibilidade espermática à criopreservação. O armazenamento do sêmen particularmente em estado congelado, ocasiona danos ultra-estruturais, químicos e funcionais aos espermatozoides, determinando redução na motilidade, na viabilidade e na fertilidade (LEBOEUF et al., 2000). O espermatozoide ovino, por exemplo, é mais sensível à congelação quando comparado ao de outros animais de produção, como bovino e caprino, principalmente à temperatura de -10 e -25 °C (BYRNE et al., 2000). Estes autores, na tentativa de determinar a interferência de diferentes velocidades de congelação durante o intervalo de 5 °C a -25 °C, bem como sua influência na fecundação *in vivo* e *in vitro* do sêmen, utilizaram dois protocolos de congelação. O método rápido, com decréscimo de 5 °C/minuto que apresenta melhor taxa de clivagem e formação de blastocistos a partir de ovócitos maturados e fecundados *in vitro*; e o método lento, com decréscimo de



0,5 °C/minuto, seguido de IA transcervical e intra-uterina por via laparoscópica. Onde concluíram que os índices de fertilidade foram superiores em fêmeas inseminadas com sêmen proveniente do processo de congelamento rápida.

O processo de criopreservação resulta na diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen *in natura* (WABERTSKI et al., 1994). No entanto, mesmo que exista uma proporção relativamente elevada de espermatozoides que preservam a motilidade pós-descongelamento, apenas 20 a 30 % destes mantêm-se biologicamente estáveis, diminuindo a fertilidade e a capacidade de fecundação do sêmen. Desta forma, a redução da fertilização dos gametas femininos é reduzida se os mesmos não estiverem localizados em locais vicinais ao de deposição do sêmen, como no caso de fertilização *in vitro*, inseminação tubárica e intra-uterina (MAXWELL e WATSON, 1996; SALAMON e MAXWELL, 2000).

Evidências com várias espécies de mamíferos têm sugerido que machos de uma mesma espécie diferem em sua fertilidade relativa. Embora se possa prever que a fertilidade de uma população de machos deva variar de inférteis a altamente férteis, seguindo uma distribuição normal, faltam informações adequadas para confirmar este fato na maioria das espécies (KILLIAN et al., 1999). Assim, com base na viabilidade das amostras de sêmen criopreservadas, Cano (1984) classificou os reprodutores com alta e baixa sensibilidade do sêmen ao processo de congelamento. Esta classificação é independente da qualidade do sêmen fresco (CORTEEL et al., 1987), apesar de os espermatozoides adquirirem sensibilidade ao choque térmico quando atravessam os tubos epididimais, acreditando-se que isso ocorre devido à mudança dos lipídeos presente na membrana durante o trânsito epididimário (WATSON, 1981).

Os danos ultra-estruturais espermáticos são acompanhados por mudanças bioquímicas e perdas de substâncias vitais, como transaminase glutâmico oxalacética (TGO), proteínas e aminoácidos, decréscimo na atividade da fosfatase, aumento na concentração de sódio e diminuição de potássio, inativação de hialuronidase e outras enzimas, perda de prostaglandinas, redução da síntese de ATP e ADP, bem como da atividade proteolítica acrossomal (SALAMON e MAXWELL, 1995).

### 2.3 Comportamento das membranas celulares

Sabendo-se que a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio, o estudo de sua funcionalidade é de grande importância, quando associada a parâmetros tradicionais de avaliação da qualidade do sêmen (LAGARES et al., 1998). Por conseguinte, diversos autores têm avaliado a integridade da membrana plasmática como forma de conhecer a viabilidade dos espermatozoides (HARRISON e VICKERS, 1990). Muer et al. (1988) e Maxwell et al. (1997) também relataram alterações bioquímicas na membrana dos espermatozoides como danos à integridade estrutural e funcional das células durante os processos de criopreservação.

De Leeuw et al. (1990) citaram vários fatores que podem influenciar no comportamento das membranas celulares frente a alterações de temperatura e do meio, e entre eles a elevada concentração de proteínas na membrana que pode aumentar a sua estabilidade, diminuindo as chances de alterações induzidas pela refrigeração.

A estrutura da membrana espermática varia de acordo com sua localização, sendo compartimentalizada de diferentes formas, dependendo da região que ela reveste, onde cada compartimento exhibe propriedades físicas e químicas diferentes (SQUIRES et al., 1999). Desta forma, a membrana plasmática possui acentuada organização de domínio com muitas glicoproteínas antigênicas segregadas nas regiões acrossomal, pós-acrossomal, peça intermediária e peça principal (HOLT, 1984).

Segundo Wolfe et al. (1998), a coexistência de uma fase de domínio lipídico fluídica e gel na membrana espermática, induzida por sua variada localização, podem ser exacerbados durante a refrigeração espermática.

Múltiplas variações de temperatura determinam alterações na estrutura da membrana plasmática, tornando-a um mosaico de gel e fases fluídicas, tendo sido sugerido que esteja relacionada à afinidade preferencial a certos lipídios de glicoproteínas transmembranas, através do efeito de modulação do colesterol ou da presença de barreiras intramembranas que impedem a difusão livre (CARDULLO e WOLFE, 1990).

## **2.4 Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)**

Vários autores têm proposto que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) encontradas na gema de ovo podem ser responsáveis pela resistência ao choque térmico e pelo aumento da motilidade espermática pós-descongelamento (MOUSSA et al., 2002). A LDL promove a entrada de fosfolípido e colesterol e previne a saída destes compostos da membrana espermática, formando um complexo com as proteínas do plasma seminal e impedindo que estas proteínas fiquem disponíveis para atuarem na membrana espermática. Com isto, evitam o efluxo de fosfolípidos e colesterol, conferindo à célula espermática maior resistência ao choque térmico (MANJUNATH et al., 2002; BERGEROM et al., 2004).

De acordo com o estudo realizado por Moussa et al. (2002), a concentração ótima de LDL proveniente da gema de ovo é de 8,0%, incrementando significativamente a motilidade dos espermatozoides bovinos, quando comparada àquela do grupo controle. Os autores ressaltaram, todavia, que concentrações acima de 10,0 % prejudicam estas células. Em equinos, Martin (2005) afirmou que 8% de LDL adicionado ao diluidor de criopreservação do sêmen pode substituir a gema de ovo integral na composição do diluente modificado.

## **2.5 Plasma seminal**

As características bioquímicas do plasma seminal dos ejaculados variam devido a diferenças nas proporções de secreções provenientes do epidídimo e das glândulas acessórias. Esta alteração no ambiente bioquímico dos ejaculados pode modificar a resposta celular após a criopreservação, tendo sido proposta também como fonte de variação da fertilidade (WINDSOR, 1997).

As interações prejudiciais entre plasma e gema de ovo foram documentadas primeiramente por Roy (1957), e com leite por Corteel (1974) e Nunes et al. (1982). Na espécie caprina, de acordo com Roy (1957), o plasma seminal exerce efeito nocivo sobre a célula espermática em virtude da presença da enzima fosfolipase A secretada pelas glândulas bulbouretrais, que interage com os fosfolípidos presentes no leite (NUNES, 1982) ou na gema de ovo (ROY, 1957), resultando em lisolecitinas e ácidos graxos tóxicos aos espermatozoides. Por conseguinte, alguns protocolos de

criopreservação recomendam a lavagem do sêmen caprino para remoção do plasma seminal e redução dos efeitos tóxicos de tais substâncias. Misra et al. (1993) relataram que o uso de soluções estabilizantes isotônicas nas lavagens do sêmen melhoram a qualidade espermática do sêmen caprino em diversas temperaturas.

As células são lavadas uma ou duas vezes durante 10 a 15 minutos, a 550-950 G (NUNES et al., 1982; RITAR e SALAMON, 1982; LEBOEUFETAL, 1998). Este processo danifica as células caso seja executado da forma inapropriada, mas quando realizado corretamente determina benefícios ao processo de criopreservação da célula e melhora nas taxas de motilidade, porcentagem de células vivas e integridade do acrossoma do sêmen caprino pós-descongelamento (DROBNIS et al., 1980; RITAR e SALAMON, 1982; MEMON et al., 1985; LEBOEUF et al, 2000) ou refrigeração a 5 °C por 72h (ISLAM et al., 2006).

Apesar de muitos autores corroborarem que a remoção do plasma seminal em caprinos é um procedimento favorável quando se usa diluidores a base de gema de ovo, Azeredo et al. (2001) afirmaram que este diluidor preserva a motilidade das células espermáticas no sêmen in natura e no congelado com plasma seminal. Todavia, quando o plasma seminal foi retirado ocorreu aumento do porcentual de membranas danificadas pós-descongelamento. Estes achados podem ser explicados pelo fato do experimento ser realizado em ambiente tropical, na época de aumento do período de luminosidade do dia, havendo interferência do fotoperíodo, uma vez que segundo Corteel et al. (1980), apesar do efeito favorável ou não que a lavagem proporciona ao ejaculado, existem diferenças entre as colheitas de sêmen durante as estações, os quais relataram que as células suportaram melhor o processo de congelamento durante a estação reprodutiva quando comparada a não reprodutiva.

Thakkar et al. (1983) sugeriram que a fosfolipase A2 tem papel importante na fusão de membranas durante os eventos da fertilização, enquanto Dick e Buhr (1993) afirmaram que os processos convencionais de criopreservação diminuem a ação desta enzima (fosfolipase A) em até 50% e, conseqüentemente, diminuem as reações na membrana plasmática do espermatozóide, reduzindo sua capacidade fertilizante.

Assim, dentre as enzimas presentes no sêmen, a fosfolipase A tem despertado o interesse dos pesquisadores. Esta enzima localiza-se tanto nos espermatozoides quanto no plasma seminal, sendo capaz de converter moléculas de fosfolipídeos em ácidos graxos e lisolipídeos, principalmente a lisolecitina. A capacidade da lisolecitina em

fusionar membranas encontra-se bem estabelecida. Estudos morfológicos mostram que o tratamento dos espermatozoides com lisolecitinas induz a fusão da membrana acrossomal com a membrana plasmática e conseqüente reação acrossomal. É importante ressaltar que o glicerol, na concentração de 20,0 %, impede a desnaturação da fosfolipase à temperatura de 70 °C. Porém, quando adicionado junto a inibidores da fosfolipase e armazenado a -20 °C, em solução contendo o substrato para enzima, potencializa a ação do inibidor (UPRETI et al., 1999).

## **2.6 Proteínas seminais**

A reação acrossomal é o processo decorrente da capacitação espermática que consiste na desestabilização da membrana mediada pelo influxo de íons cálcio (YANAGIMACHI, 1994) e, conseqüentemente, reorganização da estrutura lipídica (COLENBRANDER et al., 2002). Proteínas epididimárias também incrementam significativamente a motilidade in vitro de espermatozoides bovinos, quando comparado ao grupo controle (REYNES-MORENO et al., 2002), dados que corroboram com os relatos de Braun et al. (1995), ao trabalharem com sêmen de garanhões.

Estes achados podem ser visualizados nos estudos de Zahn et al. (2002), ao avaliarem os parâmetros seminais de garanhões, pós-descongelção, e suas características de fertilidade após incorporação de colesterol ao meio diluente. Os autores observaram que a motilidade não foi alterada após a adição do colesterol, embora tenha sido constatado aumento significativo na integridade da membrana. Em contrapartida, foram evidenciados resultados significativamente inferiores nas fêmeas inseminadas com amostras tratadas. Na seqüência, a reação acrossomal foi testada e constatou-se que a incorporação de colesterol diminuiu o porcentual de células com reações acrossomais no momento 0 e 90 minutos após a descongelção, explicando os baixos índices de fertilidade.

De acordo com Therien et al. (1999), as proteínas do plasma seminal de bovino (BSPs) associam-se à membrana dos espermatozoides no momento da ejaculação, induzindo o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana espermática, determinando a desestabilização da mesma, e diminuindo sua estabilidade frente aos processos de criopreservação de sêmen.

O processo de criopreservação induz mudanças na organização lipídica da membrana, com conseqüente modificação nas proteínas cinéticas das enzimas intramembranas. Assim, a fusogenicidade e a resposta do sinal de transdução podem ser afetadas por estas mudanças, contribuindo com a possibilidade de que a longevidade do sêmen descongelado seja reduzida em virtude da precoce capacitação espermática (HOLT e NORTH, 1984, 1986; DROBNIS et al., 1993).

Parks e Graham (1992) relataram que a compartimentalização da membrana, com ressalva para a função das proteínas, decorre de vários fatores e que alterações estruturais nestas proteínas podem ser induzidas pela criopreservação, reduzindo a capacidade fertilizante dos espermatozóides. Trabalhando com animais de diferentes graus de congelabilidade do sêmen, Roncoleta (1999) evidenciou que algumas proteínas podem participar do metabolismo espermático durante a criopreservação. Enquanto La Falci et al. (2002), ao pesquisarem as proteínas com afinidade para heparina (HAPs), indicaram que as proteínas do plasma seminal dos caprinos criados em clima subtropical úmido estão sob controle sazonal e diretamente relacionadas à função espermática durante a estação produtiva e não reprodutiva.

As proteínas solúveis e estruturais têm papel importante no metabolismo do espermatozóide, podendo influenciar a fertilidade do touro (KILLIAN et al., 1993; COOPER, 1998; GERENA et al., 2000) devido à presença daquelas que podem estar associadas positivamente com a fertilidade. O processo de congelamento do sêmen causa alterações em algumas moléculas da proteína, interferindo no metabolismo e, conseqüentemente, a capacidade fertilizante do espermatozóide.

Durante a maturação epididimal, Sundhey et al. (1995) concluíram que a concentração de proteínas presentes na membrana da cauda do espermatozóide aumentava durante a maturação epididimal e possuíam pesos moleculares menores de 25,7 kDa e maiores de 170 kDa. Além das proteínas de 220 kDa, que possivelmente estão associadas à capacitação espermática, migração do espermatozóide no útero, ligação do espermatozóide ao ovócito, fertilização e divisão do ovócito.

Brandon et al. (1999), ao correlacionarem proteínas do plasma seminal de eqüinos com a fertilidade, afirmaram que estas proteínas podem ser usadas como indicadores da capacidade fertilizante, uma vez que sua presença indica a natureza da subfertilidade ou infertilidade, possibilitando o uso de melhores estratégias para a criopreservação do sêmen desta espécie.

De acordo com Fonseca et al. (2002), a análise em géis de eletroforese de membranas de espermatozóides de dois equinos, in natura e pós-descongelamento, demonstrou 22 bandas protéicas, sendo 14 mais evidentes que oscilaram no intervalo de massa molecular de 69,02 a 14, 31 kD, para cada ganhão e tipo de processamento. Estes autores verificaram diferentes comportamentos destas proteínas e concluíram que a diferença no perfil protéico deve interferir na congelabilidade do sêmen de ganhão. Ollero et al. (1998) verificaram perda de quatro proteínas no sêmen congelado, quando comparado ao in natura, e afirmaram que esta perda é decorrente de danos à membrana plasmática induzidos pelos processos de congelamento e descongelamento. No entanto, segundo Roncolletta et al. (1999), o número de bandas protéicas verificadas em géis de poli-acrilamida a 10,0%, no sêmen in natura e pós-descongelamento de touros, foi em torno de 22. Na análise qualitativa dos ejaculados pós-descongelamento, esses autores verificaram aproximadamente as mesmas 14 bandas protéicas mais observadas no sêmen fresco.

Algumas proteínas do plasma seminal (OPN, PGDS, BSPs, FAA e aSFP) têm sido relatadas por vários autores (EINSPANIER et al., 1994; GERENA et al., 2000; MANJUNATH et al., 2002), assim como suas concentrações ou associações à fertilidade do touro (GERENA et al., 2000; NAUC e MANJUNATH, 2000; 2002). No entanto, alta fertilidade de touros leiteiros foi significativamente associada com menor expressão de uma proteína de 14 kDa spermadhesin isoformas Z13 e maior expressão das proteínas de 55-kDa osteopontina e 58 kDa fosfolipase A2 (PLA2) (MOURA et al., 2006).

Fazer et al. (1996) encontraram principalmente três proteínas no plasma seminal bovino (BSP) e as identificaram como BSP-A1, BSP-A2 e BSP-A3, confirmando que o uso da técnica de eletroforese 2-D é uma ferramenta útil para investigar problemas relacionados com taxas baixas de concepção baixa em alguns grupos de sêmen processados, uma vez que o excesso ou a deficiência na concentração de BSPs são prejudiciais à fertilidade.

Roncolletta et al. (2006) afirmaram que a concentração da proteína ácida do plasma seminal (aSFP) foi 8,5 vezes maior no grupo de bovinos de melhor fertilidade quando comparada àquele de menor fertilidade. Estes autores também levaram em consideração o parâmetro “melhor fertilidade” para algumas funções que já haviam sido avaliadas por Einspanier et al. (1991), como fator de decapitação, ou por Schoneck et

al. (1996), como preservação da integridade da membrana e, com isso, associaram a concentração desta proteína com a fertilidade. Outra consideração realizada por Roconletta et al. (2006) é que a aSFP exerce controle sobre a peroxidação lipídica da membrana espermática. E, mesmo em concentrações reduzidas, esta proteína parece proteger os espermatozoides das espécies reativas ao oxigênio (ROS), reduzindo a atividade respiratória e minimizando a produção de ROS.

Nos caprinos, as HAPs podem estar envolvidas no processo de capacitação e fertilização, como as proteínas ligadoras de heparina, presentes em outras espécies (DESNOYERS e MANJUNATH, 1992; SANZ et al., 1993). La Falci et al. (2002), ao pesquisarem a presença das HAPs durante 12 meses que correspondem ao período das estações reprodutivas e não reprodutivas, verificaram que no plasma seminal a quantidade de proteína total correspondeu a 18 e 19% na estação não reprodutiva e reprodutiva, respectivamente, e que se ligam principalmente à peça intermediária dos espermatozoides caprinos, explicando seu efeito negativo na motilidade e na função mitocondrial. Similarmente, no ejaculado bovino, a localização da PLA2 (proteína heparina dos bovídeos 2) também é restrita à região pós-acrossomal do espermatozoide (RONKKO, 1992).

As proteínas presentes no plasma seminal variam entre as espécies (VILLEMURE et al., 2003), atuando na viabilidade da célula espermática, na motilidade espermática e na fertilização (BRANDON et al., 1999; SANCHEZ-LUENGO et al., 2004). A influência sazonal interfere, segundo Smith et al. (1999), na produção das proteínas presentes nas células espermáticas. Assim, no período não reprodutivo, devido à diminuição do volume seminal e da concentração de espermatozoides, proteínas que estavam presentes na estação reprodutiva (massa molecular 20 – 70 kDa) estavam ausentes na estação não reprodutiva.

No estudo das variações sazonais das proteínas do plasma seminal de ovinos, Cardozo et al. (2006) descreveram que foram detectadas em média 252 pontos de proteínas com pontos isoelétricos (pIs) que variaram de 4.2 a 7.6 e massa molecular de 12,5 a 83,9 kDa. Além disso, estes autores relataram que existe variação destes pI ao longo do ano, interferindo na concentração, na qualidade, na estabilidade e na viabilidade espermática, além de outros parâmetros analisados.

Ao analisar as proteínas presentes no plasma seminal de ovinos criados no Nordeste do Brasil, Câmara (2005) afirmou não existir diferença na concentração total



das proteínas presentes no plasma seminal dos animais com níveis diferentes de congelabilidade, apesar do colesterol e do HDL apresentarem variações no sêmen de baixa congelabilidade. Além disso, estes autores constataram que há relação entre a proteína 24.3 kDa e a congelabilidade do sêmen ovino. Enquanto Barrios et al. (2005) comprovaram que duas proteínas de aproximadamente 14 e de 20 kDa são responsáveis pela proteção da célula.

## **2.7 Viabilidade da célula espermática**

Alguns parâmetros como motilidade, vigor e patologias espermáticas têm sido correlacionados com a fertilidade do reprodutor (VAZQUEZ et al., 1997; SANCHO et al., 1998). Entretanto, o método mais utilizado para avaliar a viabilidade de espermatozóides submetidos aos procedimentos de congelação/descongelação consiste em determinar a porcentagem de células vivas com movimentos progressivos e dotadas de vigor (KARATZAS et al., 1997). Todavia, a maneira mais eficaz de se avaliar a preservação da capacidade fecundante dos espermatozóides na dose de sêmen é a taxa de concepção pós-inseminação artificial. Entretanto, outros testes permitem que essas avaliações sejam realizadas em laboratórios, através da combinação de testes de alta correlação com a fertilidade, como por exemplo, a análise da integridade do acrossoma, comprovando a viabilidade espermática pós-refrigeração (SAACKER e WHITE, 1972).

A instabilidade da membrana plasmática do espermatozóide submetido a variações térmicas durante o processo de criopreservação aumenta a permeabilidade desta estrutura, com perda de moléculas e íons intracelulares ou adsorção de componentes do meio diluidor (BARBOSA et al., 1999). Lin et al. (1998) demonstraram que o teste hiposmótico é significativamente correlacionado com o percentual de motilidade do sêmen in natura, fato que não ocorreu nas amostras de sêmen descongeladas.

É possível que a perda da integridade da membrana da cauda espermática seja um fator que contribua para o declínio de sua motilidade. No entanto, após a criopreservação, alguns fatores não relacionados à membrana plasmática podem ser responsáveis pela perda da motilidade do espermatozóide, uma vez que o processo de criopreservação também induz a formação de ROS que são prejudiciais à performance

dos espermatozoides (ALVAREZ e STOREY, 1992; BELL et al., 1993; O'FLAHERTY et al., 1997).

Os marcadores fluorescentes são bastante utilizados para avaliar a célula espermática. Sukardi et al. (1997), ao avaliarem a viabilidade acrossomal de espermatozoides presentes no sêmen diluído de carneiros e incubado a 39 °C por 6h, afirmaram que, após 4h de incubação, 75% dos acrossomas reagiram na ausência do cálcio ionóforo, e após 30min de incubação na presença desta substância capacitante aproximadamente 90% dos espermatozoides apresentavam acrossoma reagido.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRO, A.G.D.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BELLITTI. A post-thaw survival of ram semen spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. **Theriogenology**, v. 55, p. 1159-1170, 2001.

ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **J. Androl.**, v.13, p.232–241,1992.

AZEREDO, G.A.; ESPER , C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Rum. Res.**,v. 41, p. 257-263, 2001.

BAG, S.; JOSHI, A.; RAWAT, P. S.; MITTAL, J.P. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. **Small Rum. Res.**, v. 43, p. 23-29, 2002.

BARBOSA, L.P. GUIMARÃES, J.D.; ESPESCH. Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programa de inseminação artificial em cabras alpinas. **Rev.Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 283, 1999.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUINO-BLANCO, T, CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **Jour. Androl.**, v. 26, p. 539–549, 2005.

BELL, M.; WANG, R.; HELLESTRON, W.J.; SIKKA, S.K. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. **Jour. Andro.**, v. 14, p. 472-478, 1993.

BERGERON, A.; BOISVERT, M.; MANJUNATH, P. Comparative study on the phospholipids-binding proteins in seminal plasma of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, **Proceedings...**, Porto Seguro, 15th international Congress on Animal Reproduction, p. 226, 2004.

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

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; BOLAND, M. P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vitro and in vivo. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, n. 4, p. 265-275. 2000.

CÂMARA. D.R. **Influencia de proteíns e lipoproteínas do plasma seminal de carneiros da Raça Santa Ines sobre a congelabilidade e fertilidade in vivo.** Recife-PE. Fevereiro, 52f. Dissertação de Mestrado em Ciencia Veterinária , UFRPE. 2005.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; FORCADA.; ABECIA, A Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis **Theriogenology**, v. 66, n.4, p. 841-850, 2006.

CARDULLO, R.A.; WOLFE, D.E. The sperm plasma membrane. A little more than mosaic, a little less than fluid. New York: Plenum Press, p. 305-336. 1990.

CHEMINEAU, P.; NORMANT, E.; RAVAUULT J.P, J .; THIMONIER, J. Induction and persistence of pituitary and ovarian activiti in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton period melanotonin and the male effect. **J Reprod Fertil.**, v. 78, p. 497-504, 1986.

COCHRAN, R.C.; JUDY, J.K.; PARKER, C.F.; HALLFORD, D.M. Pre-freezing and post-thaw semen characteristics on five ram breeders collect by eletroejaculation. **Theriogenology**, v. 23, p. 431-434, 1985.

COLENBRANDER, B.; BROUWERS, J.F.H.M.; NEILD, D.M.; STOUT, T. A. E.; DA SILVA, P.; GADELLA, B.M. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. **Theriogenology**, v. 58, p. 341-345. 2002.

COOPER, T.G.. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. **Jour. of Reprod. Fertility.** Suppl, v. 53, p. 119-136, 1998.

CORTEEL, J.M. Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect. **Anim.Biochem. Biophys**, v.14, p. 741–745, 1974.

CORTEEL, J.M.; BARIL, G.; LEBOEUF, B. Development and application of artificial insemination with deep frozen semen and out-of season breeding of goats in France. **In: Proc. 4th Int. Conf. Goats. Brasilia**, v. 1, p. 523–547, 1987.

D'OCCHIO, M.J.; KINDER, J.E.; SCHANBACKER, B.D. Profiles of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone and prolactin in rams of diverse breeds: effect of contrasting short (8L:16D) and long (16L:8D) photoperiods. **Biol. Reprod.**, v. 30, p. 1039–1054, 1984.

DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; WOELDERS, H. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. **J. Androl.**, v. 12, p. 112-18, 1991.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10149-10155, 1992.

DICK, M.K.; BUHR, M.M. Phospholipase A2 activity in fresh and criopreserved spermatozoa from boars. **Canad. J. Anim. Sci.**, p. 59-64, 1993.

DROBNIS, E.Z.; NELSON, E.A.; BURRILL, M.J. Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. I. Diluent. **J. Anim. Sci.**, Suppl. 51, p. 439 (Abstract), 1980.

DROBNIS, E.Z.; CROWIE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWIE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool.**, v. 265, p. 432-437, 1993.

EINSPANIER, R.; KRAUSE, I.; TOPFER-PETERSEN, E.; KLOSTERMEYER, H.; KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. **Febs. Lett.**, v. 344, n. 1, p. 61–64, 1994.

EINSPANIER, R.; EINSPANIER, A.; WEMPE, F.; SCHEIT, K.H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 179, n. 2, p. 1006–1010, 1991.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of semen. In: **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Wellington: Butterworths, p. 122–141, 1987.

FONSECA, C.W.; MATTA, M.F.R.; CRUZ, G.M.; SOUZA, G.V.; FAGUNDES, B.; MATTA, C.G.F.; SOUZA, C.J.P.; VIANNA, S.A.B.; SILVA, J.F.S. Análise das proteínas purificadas de membranas de espermatozoides de equino in natura e pós-descongelamento em géis de eletroforese. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, n. 3, p. 191-194, 2002.

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. 4, p.103- 115, 1996.

GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; EGUCHI, N.; URADE, Y.; KILLIAN, G.J. Immunocytochemical localization of lipocalintype prostaglandin d synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 547–556, 2000.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transition in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **J. Exp. Zool.**, v. 87, p. 230-473, 1984.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 447-57, 1986.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, L.A.S.; KARATZAS, G.. Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, saanen and damascus goat bucks born and raised in greece. **Theriogenology**, v. 53, p. 1285-1293, 2000.

KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; BRIKAS, P. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 48, p. 1049-1059, 1997.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D. A.; CANCEL, A.M.; GERENA, R.L.; RODRIGUEZ, C.M.; DAY, J.R. Male factors affecting sperm fertility. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 2, p. 83-85, 1999.

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

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade de membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LIN, M.H.; MORSHEDI, M.; SRISOMBUT, C.; NASSAR, A.; OEHNINGER, S. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. **Fertil. Steril.**, v. 70, n. 6, p. 1148-1155, 1998.

LINCOLN, G.A.; LINCOLN, C.E.; MCNEILLY, A.S. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in ram of wild, feral and domesticated breeds of sheep. **J. Reprod. Fert.**, v. 88, p. 623-633, 1990.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MARTEMUCCI, G.; FACCIOLONGO, A.M.; BRAMANTE, G. Variazioni durante l'anno delle dimensioni testicolari, della libido e della testosteronemia successiva a stimolazione con Gn-RH in arieti di razza Leccese (Circannual variations in testis size, libido and testosterone hormone response to Gn-RH in Leccese rams). **Zoot. Nutr. Anim.**, v. 26, p. 199-209, 2000.

MARTIN, C.E.G.. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados.** PELOTAS, Rio Grande do Sul – Brasil, Abril 2005, Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, 2005.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JONHSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reprod. Fertil. Develop.**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MEMON, M.A.; BRETZLAFF, K.N.; OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, p. 473-475, 1985.

MIES FILHO, A.; JOBIM, M I.M.; ENDLER, J.O.; WARD, V.B.; DUARTE, M.M.B.; SOUZA, J.A.C.; MARTINS, S.C.R. Estudo sobre inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 10, n. 4, p. 235-245, 1986.

MISRA, D.N.; DEKA, B.C.; BORGOHAIN, B.N. Effect of washing on the quality of goat semen during preservation at +5 °C. **Indian J. Anim. Reprod.**, v. 14, n. 1, p. 49-50, 1993.

MIYAMOTO, A.; UMEZU, M.; HAMANO, K.; MASAKI, J. Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in male goat (*Capra hircus*). **Theriogenology**, p. 2867-2876, 1987.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. **Jour. Andr.**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoprotein extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. v. 57, p. 1695-1706, 2002.



MUER, S.K.; ROY, S.B.; MOHAN, G.; DHOBLE, R.L. Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. **Theriogenology**. v. 30, n. 5, p. 1005-1011, 1988.

NAUC, V.; MANJUNATHM, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A-2, BSP-A3 and BSP-30 kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 1058–1066, 2000.

NUNES, J.F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral: EMBRAPA – CNPC, 1982. 41p. (Circular Técnica, 5).

O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269–275, 1997.

OLLERO, M.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MINOBLANCO, T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability addition of seminal plasma. **J. Androl.**, v. 18, p. 732-739, 1998.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PAULENZ .H.; SOÈDERQUIST .L.; PEÂREZ-PEÂ, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram seme **Theriogenology**, v .57, p. 823-836, 2002.

PELLETIER, J.; CHEMINEAU, P.; DELGADILLO, J.A. Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, **proceedings**... Dublin, p. 211–219, 1988.

PÉREZ, R.; LÒPEZ, A.; CASTRILLEJO, A. Reproductive seasonality of Corredale rams under extensive rearing conditions. **Acta Vet. Scand.**, v. 38, p. 109–117, 1997.

POULTON, A.L.; ROBINSON, T.J. The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. **J. Reprod. Fertil.** v. 79, p. 609–626, 1987.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rum. Res.**, v .63, p. 215–225, 2006.

REYNES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biol. Reprod.**, v. 66, n. 1, p. 159-166, 2002.

RITAR, A.J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol.Sci.**, v. 35, p. 305–312, 1982.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. **Cryo-Lett.**, v. 9, p. 286–293, 1988.

ROÉNKKOÉ, S. Immunohistochemical localization of phospholipase A 2 in the bovine seminal vesicle and on the surface of the ejaculated spermatozoa. **Int J Biochem.**, v.24, 869 -876, 1992.

RONCOLETA, M.I. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozóides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros**, 1999. Dissertação de Mestrado. FCVAJ – UNESP., 104 p.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; ESPER, C.R.; BARNABE, V.H.; FRANCESCHINI, P.H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 91, p. 77–87, 2006.

ROUGER Y. **Etude des interactions de l'environnement et des hormones sexuelles dans la régulation du comportement sexuel des Bovidae**. Thèse de Doctorat Sciences Naturelles, Université de Rennes, 1974, 197 p.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318–319, 1957.

SAACKER, R.G.; WHITE, J.M. Semen quality test and their relationship to fertility. In :TECHNOLOGICAL CONFERENCE OF ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 4.,Chicago, **Proceedings...**, p.22-27, 1972.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen insemination processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination.(review). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 37, p. 185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.1-36, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SANCHO, M.; PÉREZ-SANCHEZ, F.; TABLADO, L. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. **Theriogenology**, v. 50,p. 27-37, 1998.

SANCHEZ-LUENGO, S.; AUMULLER, G.; ALBRECHT, M.; SEM, P.C.; ROHM ,K.H.; WILHELM ,B. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. **J Androl.**, v. 25, p. 234–44, 2004.

SANTOS, D.O.; SIMPLICIO, A.A .; MACHADO, R.; MELLO, A.A. Congelamento de sêmen caprino de raças exóticas na Embrapa Caprinos em Sobral, Ceará. **Cienc.Vet. Trop.**, v. 2, n. 3, p. 191-195, 1999.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, A.A.T.; FONSECA ,J.F.; BORGES , A.M; COSTA ,E.P.; GUIMARÃES, J.D.; ROVAY , H. Reproductive aspects of male goats under an artificial photoperiod exposure. **R. Bras. Zootec.**, v. 35, n. 5, 2006.

SANZ, L.; CALVETE, J.J.; MANN, K.; GABIUS, H.J.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. **Mol Reprod Dev.**, v. 35, p. 37–43, 1993.

SCHONECK, C.; BAUN, J.; EINSPANER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein SFP: effects on motility, mitochondrial activity and the lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, p. 633–642, 1996.

SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; PEÑA ALFARO, C.; AZEVEDO, S.A.; AZEVEDO NETO, J.; SILVA, E.M.N.; KARISTON, A. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. **Agropecu. Cient. no Semi-árido.**, v. 1, p. 7-14, 2005.

SMITH, J.F.; PARR, J.; MURRAY, G.R. ; MCDONALD R.M.; LEE, R.S.F. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production., v.59, p. 223–225. 1999.

SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., GRAHAM, J.K. VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin n.9, p. 1-39, 1999.

SUNDHEY, R.; AHUJA, T. S.P.; SINGH, B. Changes in the membrane proteins of buck (**Capra hircus**) spermatozoa during epididymal maturation **Small Rum.Res.**, v.16, p. 251-261, 1995.

THAKKAR, J.K.; EAST, J.; SEYLER, D.; FRANSON, R.C. Surface-active phospholipase A<sub>2</sub> in mouse spermatozoa. **Bioq. Bioph. Acta.**, v. 745, p. 44-50, 1983.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 590–598, 1999.

UPRETI, G.C.; HALL, E.L.; KOPPENS, D.; OLIVER, J.E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and PLA<sub>2</sub> inhibitor activities in ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 56, p. 107-121, 1999.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.J.; ROTA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology.**, v. 47, p. 913-922, 1997.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. **Reprod Biol Endocrino.**, v. 1, p. 39-41, 2003.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, v. 42, p. 831–840, 1994.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds.) **The Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**. London Academic Press, p. 189–218, 1981.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved Semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

WINDSOR, D. P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination on Merino ewes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 47, p. 21-29, 1997.

WOLF, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v.59, p. 1506-14, 1998.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neil, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 2 ed. New York: Raven Press Ltda. New York, p. 189-317, 1994.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA Jr, J.R. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v. 58, p. 237-240, 2002.

ISLAM, R.; AHMED, K.; DEKA, B.C. Effect of holding and washing on the quality of goat semen. **Small Rum. Res.**, v. 66, p. 51–57, 2006.

## **4 EXPERIMENTOS**

## 4.1 Proteínas do plasma seminal de caprinos colhido nos períodos de baixo e alto índice pluviométrico relacionadas com a qualidade do sêmen

Andreia Fernandes de Souza<sup>1,2</sup>, Maria da Conceição Gomes Leitão<sup>2</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>1,2</sup>, José Luiz de Lima Filho<sup>2</sup>, Edgar Silveira<sup>2</sup>, Mariana Diel Amorim<sup>2</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

### Resumo

Objetivando-se identificar as proteínas presentes no plasma seminal de caprinos colhido nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico relacionadas com a qualidade dos parâmetros espermáticos, foi obtido sêmen de três reprodutores da raça Alpina Americana, sexualmente maduros, através do método de vagina artificial. Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto aos parâmetros macroscópicos (cor, volume e aspecto) e microscópicos (motilidade progressiva, vigor e integridade do acrossoma e do DNA) e, em seguida, dividido em duas frações visando realizar os procedimentos de dosagem das proteínas do plasma seminal (1,0 mL), e análise da integridade do acrossoma e do DNA (restante do ejaculado). O perfil de proteínas do plasma seminal foi realizado através da análise de eletroforese bidimensional, após dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas aplicadas no gel de eletroforese. Não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre animais na motilidade espermática do sêmen *in natura*, assim como entre os períodos BIP (79,82%) e AIP (81,25%). Da mesma forma no vigor BIP (4,17) e AIP (4,00), no percentual de espermatozoides com acrossomas íntegros no AIP (90,25%) e BIP (80,26%) e no percentual de espermatozoides com DNA íntegros no AIP e BIP com valores próximos ou igual a 100%. Foram detectados 96 *spots* de proteínas, sendo 49 *spots* no período BIP com massa molecular relativa de 15 a 97 kDa, e ponto isoelétrico (pI) de 4,48 a 9,83, além de 47 *spots* de proteínas com massa molecular relativa que variaram de 4 a 106 kDa e pI de 3,00 a 8,96 no período AIP. Os períodos AIP e BIP apresentaram 22 *spots* de proteínas comuns, correspondendo a 45,83% de similaridade entre os *spots* analisados. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que no período de AIP uma menor quantidade de proteína do plasma seminal de caprinos e também foi observado a presença de um grupo de proteínas de 14-15 kDa, sendo necessário uma maior investigação sobre o envolvimento deste grupo de proteínas na manutenção dos parâmetros espermáticos.

*Palavras-chave:* Proteínas; plasma seminal; criopreservação; sêmen; caprino

## 1 Introdução

Nas regiões tropicais e sub-tropicais os animais de produção se reproduzem em todas as épocas do ano, porém sofrem influência de fatores ambientais como a alimentação ou temperatura (Chemineau e Xande, 1982; Restall, 1991). A variação climática interfere nos constituintes do plasma seminal de bodes das raças Alpinas devido à maior secreção das glândulas sexuais acessórias, ocorrendo, assim, aumento no volume seminal nos períodos reprodutivos e conseqüente diminuição na concentração espermática (Leboeuf, 2000).

Em virtude da composição molecular do plasma seminal variar entre as espécies, o tipo e a atuação das proteínas nos espermatozóides podem diferir. Em caprinos, diferentes fatores influenciados pela variação sazonal interferem na manutenção da viabilidade do espermatozóide (La Falci et al., 2002). Além disso, o plasma seminal exerce efeito nocivo sobre a célula espermática devido à presença da enzima fosfolipase A, secretada pelas glândulas bulbouretrais, que interage com os fosfolípidos presentes no diluente à base de leite (Nunes, 1982) ou gema de ovo (Roy, 1957), resultando em lisolecitinas e ácidos graxos tóxicos aos espermatozóides (Roy, 1957; Nunes, 1982).

O plasma seminal dos Bovídeos (BSP) contém a família das principais proteínas, designadas BSP-A1/-A2 e BSP-A3 com massas moleculares aparentes variando de 15-17 kDa; a proteína BSP-30 com massa molecular do 28-30 kDa (Manjunath, 1984), assim como a proteína da motilidade progressiva (FMP; 37,5 kDa). Em eqüinos, as proteínas HSP-2 (25 kDa, pI 6,5-6,9), HSP-1 (22-25 kDa), HSP-7 (14 kDa) e HSP-12 kDa pertencem à família das espermadesinas, sendo que a presença da SP-1 no plasma seminal possui correlação positiva com a fertilidade (Brandon e Cols, 1999; Bergeron et al., 2004). Nos varões duas proteínas com massa molecular de 26 e 55 kDa influenciam elevadas (86,0 %) taxas de partos (Flowers, 2001).

Nos caprinos, La Falci et al. (2002) identificaram algumas proteínas com afinidade à heparina (HAPs) no plasma seminal, porém estes autores afirmaram que estas proteínas possuíam massa molecular entre 73 a 104 kDa e entre 119 a 178 kDa. Villemure et al. (2003) encontraram a presença de quatro bandas protéicas denominadas de GSP (proteína do plasma seminal de caprinos), denominadas de GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa e GSP-22 kDa. Estes autores, ao realizarem cromatografia de afinidade à heparina (HPLC) para a separação das GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20



kDa e GSP-22 kDa, isolaram e analisaram as seqüências dos aminoácidos e constataram que essas proteínas são homólogas às BSPs.

As proteínas também são responsáveis pela habilidade dos espermatozoides se movimentarem, ultrapassarem as barreiras do sistema reprodutor feminino, alcançarem o local de fecundação e ligarem-se aos ovócitos para formar o zigoto (Jones, 1998). O plasma seminal pode não conter fatores essenciais para a fecundação, mas suas secreções proporcionam melhores condições para a manutenção da motilidade, da sobrevivência e do transporte espermático, tanto no sistema reprodutor do macho quanto da fêmea (Ewing e Chang, 1986). Estudos sobre proteínas do plasma seminal e da membrana espermática ainda não são conclusivos e necessitam definir os tipos de proteínas, os mecanismos envolvidos e as ações que afetam a viabilidade destes gametas (Asadpour et al., 2007).

Tradicionalmente, a purificação e caracterização das proteínas ocupam uma posição central em muitas áreas de pesquisa química. Com os avanços na clonagem e expressão do gene, torna-se ainda mais óbvio a necessidade de um método que facilite a análise de proteínas de fontes diferentes como pré-requisito para estudos da estrutura e da função de algumas proteínas essenciais (Chiou e Wu, 1999).

O estresse provocado pelas elevadas temperaturas ambientais, além de interferir nos parâmetros fisiológicos, temperatura retal, freqüência respiratória e temperatura superficial (Muller et al., 1994), interfere também no desempenho reprodutivo dos animais, através do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (River e Rivest, 1991). Machos caprinos são sensíveis às variações sazonais ao longo do ano e apresentaram variações nas características reprodutivas (comportamento sexual, perímetro escrotal e aspectos quantitativos e qualitativos seminais), mais pronunciadamente nos adultos. Assim, objetivou-se com o experimento identificar as proteínas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana, criados na região Nordeste do Brasil, colhido nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico, que estão relacionadas com a qualidade dos parâmetros espermáticos.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Local do experimento e Animais

O experimento foi realizado em propriedade particular localizada no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco (Microrregião do Brejo), com altitude de 650 m, 8°21', 35°45' (Lat.S, Long.W) e clima Tropical Úmido com temperatura mínima 10° C e máxima de 26° C, e umidade relativa do ar entre 40 e 70%. Foram utilizados três reprodutores caprinos da raça Alpina Americana, sexualmente maduros, com idade variando de 24 a 48 meses, submetidos a regime semi-intensivo, com pastejo em capim Suázia (*Digitaria swazilandensis*), Tanzânia (*Panicum maximum*) e Braquiária (*Brachiaria humidicola*). Os animais foram suplementados com 500g de concentrado/dia, contendo 26% de proteína bruta e 82% NDT (nutrientes digestíveis totais), à base de milho (*Zea mays ssp*) triturado e farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin), além de capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) no cocho. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

### 2.2 Colheita do sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas em duas épocas do ano classificadas de acordo com o índice pluviométrico (IP), como alto IP (AIP) correspondendo aos meses de julho a agosto de 2005 (IP = 210 mm e temperatura média de 18,8 °C) e baixo IP (BIP), correspondendo ao mês Janeiro de 2006 (0 mm e 22,7 °C), de acordo com o Laboratório de Meteorologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP/LAMPE, 2007). Os animais foram submetidos a duas colheitas de sêmen consecutivas por dia, através do método de vagina artificial com ajuda de uma fêmea como manequim, onde as amostras de sêmen corresponderam ao *pool* de dois ejaculados de um mesmo animal, sendo quatro amostras obtidas de cada reprodutor por período (AIP e BIP), totalizando 96 colheitas de sêmen.

### 2.3 Avaliação do sêmen

Após cada colheita e formação do *pool* de dois ejaculados de cada animal o sêmen foi submetido à avaliação macroscópica (cor, volume e aspecto) e colocado em banho-maria (37 °C) durante a avaliação das características microscópicas (motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática). A motilidade progressiva (MP; 0,0 - 100,0%) e o vigor espermático (0-5) foram avaliados de forma subjetiva, através da observação em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão), e aprovados os ejaculados com MP e vigor mínimos de 80,0% e 3,0, respectivamente, de acordo com Mies Filho, (1987). A concentração espermática foi realizada através da técnica de Câmara de Neubauer e os resultados expressos em bilhões de espermatozoides por ejaculado, assim como a análise da morfologia espermática através da técnica de câmara úmida (Mies Filho, 1998).

Em seguida, as amostras de sêmen de cada reprodutor foram divididas em duas alíquotas, uma para avaliação do perfil protéico do plasma seminal (1,0 mL) e a outra ( $\pm 0,5$  mL) para análise da integridade do acrossoma e do DNA espermático.

#### 2.3.1 Integridade de acrossoma

Alíquotas (10  $\mu$ L) das amostras de sêmen *in natura* foram diluídos em 1,0 mL de solução Tris [3,605 g de Tris (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 1,488 g de Frutose, 2,024 g de Ácido cítrico, 100mL de Água bidestilada; pH 6,8] e utilizados para confecção de esfregaço, os quais foram armazenados a 4 °C, protegidos da luz e analisados no prazo de duas semanas através da técnica de coloração de fluoresceína isothiocianato-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA; Sigma, Saint Louis, MO, USA), de acordo com Roth et al. (1998). No momento da análise, as lâminas foram coradas com 30  $\mu$ L de solução de PNA (20  $\mu$ L de PNA + 480  $\mu$ L de PBS). Em seguida, as lâminas foram refrigeradas (4 °C) durante 20 minutos, imersas em 50 mL de solução salina tamponada (PBS) e colocadas dentro de caixa de isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5  $\mu$ L da solução UCD [5,0 mg de Azida sódica; 0,5 mL de PBS, 0,1% w/v de Fenilenediamina (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 4,5 mL de Glicerol; pH 8,0], foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus/Tóquio, Japão), utilizando o filtro de

fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), e contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando a região acrossomal apresentava fluorescência verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam fluorescência verde na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

### 2.3.2 Integridade de DNA

Amostras (10 µL) de sêmen *in natura* foram armazenadas em 990 µL da solução TNE [0,1576 g de TRIS-HCl (0,01M), 0,877 g de NaCl (0,15M), 37,2 mg de EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1 mM), q.s.p. 100 mL; pH 7,4] a -196 °C para posterior avaliação da integridade de DNA espermático usando o corante Laranja de Acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), segundo metodologia utilizada por Evenson et al. (2002). Alíquotas (100 µL) das amostras foram descongeladas a 37 °C e transferidas para tubos de microcentrífuga colocados em gelo, onde foram adicionados 200µL da solução ácido detergente [0,1 mL de Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, MO, USA), (0,1% v/v); 0,877 g de NaCl (0,15 M); 8,0 mL de HCl 1N; pH 1,4], e incubados durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 60 µL da solução de Laranja de Acridina [60 µL da solução B (1,0 mg de Laranja de Acridina em 1,0 mL de água de miliQ) adicionada em 9940 µL da solução A [37,0 mL de ácido cítrico 0,1M; 63 mL de fosfato de sódio 0,2 M; 0,877 g de NaCl (0,15 M) e 37,2 mg de EDTA (1mM); pH 6,0]. Após homogeneização, 200 células foram avaliadas em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro de fluoresceína (450 – 490 nm, espelho dicromático de 510 nm). As células coradas de verde fluorescente foram classificadas como portadoras de DNA íntegros, enquanto aquelas que emitiram fluorescência vermelha, laranja ou amarela foram classificadas como portadoras de DNA danificado.

### 2.4 Dosagens das proteínas totais e eletroforese bidimensional do plasma seminal

Após colheita, 1,0 mL da amostra de sêmen foi centrifugada (600 xg) durante 10 minutos para separação do plasma seminal e dos espermatozoides. Em seguida, o plasma seminal foi acondicionado em tubos de microcentrífuga (2,0 mL) e armazenado

a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. As amostras de plasma seminal foram submetidas à dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas aplicadas no gel de eletroforese através do método de Bradford (1976).

#### *2.4.1 Eletroforese em SDS-PAGE de duas dimensões (2-D)*

A focalização isoeétrica (FI) foi realizada segundo Stenstedt et al. (2002) em fitas *Immobiline Drystrip* (7 cm; pH de 3,0 - 10,0; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), em duplicata para cada amostra analisada dos períodos de AIP e BIP. Antes da FI, as fitas foram re-hidratadas durante 15 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  em solução tampão contendo Uréia (9M; Chemical, TK, Japão), CHAPS {3-[(3cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato} a 2%, Ditiotreitól (DDT) a 1 %, gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida -IPG (pH 3-10) a 2 % e azul de bromofenol a 0,002 %, contendo 60  $\mu\text{g}$  de plasma seminal. Para máxima reprodutibilidade, as focalizações foram conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1 Vh, 200 Vh, 2.800 Vh, 3.500 Vh, 4.200 Vh e 3.500 Vh durante 3 h e 30 min (voltagem total aplicada  $\approx 8,5\text{ kVh}$ ), utilizando o sistema de eletroforese Multiphor II (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A segunda dimensão em gel de poliacrilamida a 12,5 % (2DE SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) foi conduzida em corrente constante de 15 mA por gel, utilizando o sistema vertical (BIO-RAD). Os géis foram corados com prata. As análises dos géis 2-D foram realizadas através do programa Image Máster™ (2-D Platinum software; Amersham Biociences, UK, England). Foi gerado um gel master pelo software a partir do mapa do gel na qual representa o melhor padrão de spots para cada período analisado.

#### *2.5 Análise estatística*

O experimento foi analisado com um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 com 48 repetições. Para análise dos dados foram obtidas a média e o desvio padrão e utilizados os testes estatísticos: F (ANOVA) para dois fatores e para um fator com comparações de Tukey; teste t-Student com variâncias iguais ou desiguais; teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de estatística inferencial). A verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi

realizada através do teste F de Levene (Altma,1991). O nível de significância utilizado nas decisões de todos os testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram processados e analisados através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

### 3 Resultados

#### 3.1 Análise dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco

Os volumes médios do sêmen colhido dos três reprodutores caprinos apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre animais e entre períodos de avaliação (Figura 1-I), onde no período AIP (2,05; 1,21 e 1,80 mL, respectivamente) observou-se maior volume seminal do que no período BIP (1,23; 0,90 e 1,39 mL, respectivamente). A média da concentração espermática no período AIP variou de 1,77 a  $2,72 \times 10^9$  espermatozoides/ejaculado, enquanto no BIP variou de 2,08 a  $2,56 \times 10^9$  espermatozoides/ejaculado, não se constatando diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre reprodutores, períodos e interação reprodutor período (Figura 1-II).

Os resultados dos parâmetros espermáticos encontram-se na Figura 1, onde se observa que a motilidade progressiva (Figura 1-III) não evidenciou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no sêmen *in natura*, na interação reprodutor e período avaliado, com intervalo de 78,13 a 85,00 % no período AIP e de 75,71 a 81,88 % no período BIP. O vigor espermático das amostras de sêmen período AIP evidenciou diferença entre os animais avaliados ( $P < 0,05$ ). Todavia, no período BIP não foi evidenciada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre reprodutores. Na análise de comparação entre os períodos, observou-se que as amostras de sêmen colhidas no período AIP apresentam maior ( $P < 0,05$ ) vigor do que aquelas observadas no BIP (Figura 1-IV). O percentual de espermatozoides com acrosssomas íntegros foi mais elevado ( $P < 0,05$ ) no período AIP do que no BIP, não se observando diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os animais. (Figura 1-V). A análise do percentual de espermatozoides com DNA íntegros nos períodos AIP e BIP demonstrou que os valores foram iguais ou próximos a 100,0 %, sem evidenciar diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre reprodutores, períodos ou na interação reprodutor x período.

### 3.2 Perfil das proteínas presentes no plasma seminal

A análise das proteínas do plasma seminal realizada através de SDS-PAGE bidimensional nos períodos AIP e BIP encontram-se na Figura 2. Através das imagens avaliadas pelo software, foram detectados, aproximadamente, 96 *spots* de proteínas (Tabela 1), sendo 47 *spots* com massa molecular relativa de 4,0 a 106 kDa e pI de 3,00 a 8,96 no período AIP, e 49 *spots* no período BIP, apresentando massa molecular relativa de 15 a 97 kDa, com pI de 4,48 a 9,83.

No período AIP, 76,60 % dos *spots* de proteínas apresentaram pontos isoelétricos na faixa de pH ácido (3,00 a 6,78) e 23,40 % em pH básico (7,12 a 9,14). Da mesma forma, no período BIP 77,55 % dos *spots* se encontrava na faixa de pH ácido (4,58 a 6,94) e 22,45 % de pH básico (7,58 a 9,64). Ao comparar os períodos AIP e BIP, verificou-se a presença de 22 *spots* de proteínas comuns, correspondendo a 45,83% de similaridade entre as massas moleculares relativas das proteínas analisadas, sendo 15 *spots* de proteínas entre 40 e 106 kDa, correspondendo a 68,18 % dos *spots* de proteínas similares e 7 *spots* de proteínas com massas moleculares relativas entre 10 e 39 kDa, correspondendo a 31,82 % das proteínas similares.

Os *spots* de proteínas focalizados no gel de eletroforese apresentavam proteínas com massa molecular relativa de < 26 kDa em maior quantidade (57,45 %) no período AIP. Ao contrário do período BIP, onde o número maior de proteínas (65,31%) apresentavam massa molecular realtiva >26 kDa.

No entanto, apenas no período AIP foram focalizadas proteínas com massa molecular relativa inferior a 15 kDa, correspondendo a 22 *spots* de proteínas (46,81 %) focalizadas no gel de eletroforese.

## 4 Discussão

As colheitas do sêmen ocorreram nos períodos de AIP e BIP, onde se verificou que no período AIP o volume seminal foi mais elevado do que no BIP. Entre períodos, os demais parâmetros seminais (MP, vigor e concentração) não identificadas diferenças estatísticas entre reprodutores e entre períodos. Estes dados corroboram com aqueles citados por Silva et al. (2005), ao relatarem que, apesar dos caprinos mestiços F1 (Anglo-Nubiano x SRD) encontrarem-se bem adaptados às condições climáticas do

Semi-Árido paraibano, a concentração espermática é reduzida na época mais quente do ano, enquanto a MP e o vigor não sofrem alterações.

A região Agreste do Estado de Pernambuco, situada próximo à linha do equador [8°21'; 35°45'(Lat.S, Long.W)], é caracterizada por períodos de baixos índices pluviométricos (BIP). Entretanto, geralmente os anos são caracterizados por seca prolongada e eventualmente observa-se ocorrência de chuvas intensas, evidenciando uma instabilidade climática na região, com conseqüente variação na composição dos nutrientes das pastagens e na sua capacidade de suporte (Giulietti et al., 2004). Por conseguinte, os animais criados nesta região não possuem estacionalidade reprodutiva, porém a ausência de chuvas durante alguns períodos do ano determina escassez de alimento, comprometendo a sua fertilidade.

Uma vez que não ocorrem estações climáticas definidas na Região Nordeste, é estabelecida a classificação como período de chuva (AIP) e seca (BIP). Durante o experimento foi observado menor volume seminal no período de BIP, como relatado anteriormente. Estes resultados estão de acordo com Nunes (1998), que, ao pesquisar os fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos Anglo-Nubiano, observou que na época das chuvas o sêmen apresenta melhores parâmetros quanti-qualitativos do que no período de seca, e que o fator temperatura parece ser o ponto fundamental dessas variações.

Esta diminuição do volume indica que algumas secreções seminais também reduziram e, com isso, ocasionaram ausência ou diminuição de alguns constituintes, como as proteínas do plasma seminal. Santos et al. (2000), avaliando o efeito da insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de bodes (Moxotó e mestiços Moxotó x Alpino), observaram um aumento na concentração de frutose seminal como conseqüência da variação térmica e redução das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que este ocorrido pode ser verificado devido a uma redução do perímetro escrotal, seguida de diminuição da consistência testicular, com interferência na qualidade do ejaculado.

A estacionalidade influencia a composição do plasma seminal e os índices de proteínas encontrados no sêmen ovino (Smith et al., 1999), caprino (La Falci et al., 2002) e bovino (Roncolleta et al., 1999). A maior quantidade de proteínas focalizadas nos géis analisados foi encontrada no período BIP, porém, neste período, verificou-se também ausência de proteínas essenciais à célula espermática, conhecidas proteínas de



baixo peso molecular (< 15kDa), envolvidas na manutenção de sua motilidade (Jobim et al., 2003).

Vários componentes do plasma seminal estimulam o metabolismo dos espermatozóides atuando na manutenção da motilidade e na proteção espermática através da redução de peróxidos, como as proteínas aSFP (proteínas ácidas do fluido seminal; 13 kDa) e a enzima desidrogenase láctica C4 (Schoneck et al., 1996; Silva et al., 2003). Neste experimento, um grupo de proteínas de 13 kDa com pontos isoelétricos que variaram de 8,96 a 5,73 foi identificado nas amostras do período AIP, onde os valores de MP dos espermatozóides foram superiores àqueles observados no período BIP, dos mesmos reprodutores.

Nos bovinos, as aSFP (15–16 kDa e pI de 4,7-5,2; 11-12 kDa e pI de 4,8-4,9; 13-14 kDa e pI de 6,0-6,5; 18-20 kDa e pI de 4,8-5,20) atuam como antioxidante na prevenção da peroxidação lipídica da membrana da célula espermática, contrapondo ao efeito deletério da elevada produção e liberação de peróxido das membranas de células mortas, com o objetivo de preservar a viabilidade dos espermatozóides vivos (Shannon, 1978; Jobim et al., 2003). Os resultados das análises das imagens dos géis pelo programa Image Máster apresentaram 10 *spots* de proteínas (13-17 kDa e pI de 5,73-6,08; 13-17 kDa e pI de 6,30-6,44; 12-16 kDa e pI de 9,14-9,07; 11-15 kDa e pI de 7,55-7,58; 10-15 kDa e pI de 7,73-7,59), nos períodos AIP e BIP. Nestes períodos, observou-se 77,21 a 91,44 % de espermatozóides com acrossomas íntegros, sugerindo que este grupo de proteínas auxilia na preservação das membranas da célula espermática (Marques et al., 2000, citado por Silva et al. (2003); Silva et al., 2003).

Em bovinos, um grupo de proteína da motilidade progressiva (FMP) constituído de quatro a cinco proteínas de baixa massa molecular (37,5 kDa) agregadas entre si, atuam na indução da motilidade, juntamente com cAMP (Shivaji et al., 1990). Uma outra família de proteínas designada de proteína seminal bovina (BSP-A1/-A2 e BSP-A3), com massas moleculares relativas variando de 15 a 17 kDa e 30 kDa, respectivamente, e da proteína BSP-30 com massa molecular do 28-30 kDa (Manjunath, 1984), também estão relacionadas com a motilidade espermática. Em caprinos estas proteínas, são denominadas de proteína seminal caprina (GSP; 14-15 kDa) e estão presentes nas amostras de sêmen *in natura*, e, segundo Cardozo et al. (2006) estão relacionadas com a família das BSP, ligam-se à membrana espermática durante o trânsito epididimário atuando na capacitação espermática (Villemure et al., 2003).

Neste experimento, este grupo de proteínas (14-15 kDa) esteve presente no plasma seminal em ambos os períodos avaliados (AIP e BIP), juntamente com outro grupo com massas moleculares de 38-39 kDa e pI de 5,21-5,42, onde foram observados valores de MP iguais a 81,25 e 79,82 %, respectivamente, corroborando as afirmações anteriores.

Em búfalos, Assapour et al. (2007) afirmaram que o surgimento de uma proteína de 45 kDa no plasma seminal que não foi identificada é responsável pelo maior número de células danificadas após descongelação do sêmen. Contraditoriamente, neste experimento, uma proteína foi também identificada com massa molecular relativa de 45 kDa e pI 5,5, esteve presente nas amostras colhidas no período AIP. No entanto, as análises evidenciaram, neste período, maior porcentual de células com acrossomas íntegros (90,25 %) em comparação com o BIP (80,26 %), onde não foi identificada a presença desta proteína. A perda da integridade da membrana espermática é um fator que contribui para o declínio da motilidade espermática (O'Flaherty et al., 1997; Almeida, 2006), corroborando com isto, neste experimento constatou-se que no período onde foi verificado menor porcentual de células com acrossomas íntegros (BIP), menor MP (79,82 %) no sêmen in natura. Com isso, sugere-se que a presença desta proteína (45 kDa e pI de 5,5) no plasma seminal de caprinos possui a função de proteger a célula espermática de danos no acrossoma.

Determinadas proteínas do plasma seminal se adsorcionam aos espermatozoides no trânsito epididimário ou durante a ejaculação, podendo atrasar a capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossômica (Frazer et al., 1996; Manjunath e Thérien, 2002). Estas proteínas são denominadas de decapacitantes e são removidas ou modificadas pelos fluidos uterinos para que ocorra a capacitação espermática e a fecundação (FRAZER et al., 1996). As caltrinas, denominação dada às proteínas decapacitantes, são proteínas do plasma seminal que possuem baixa massa molecular (5 a 10 kDa) e previnem o aumento da concentração  $Ca^{2+}$  nos espermatozoides, evitando a capacitação espermática precoce provocada pelo processo de criopreservação (Yanagimachi, 1994; Flesch e Gadella, 2000). Proteínas semelhantes foram identificada no período AIP com massas moleculares relativas entre 4 a 10 kDa, sendo considerado o período ideal para o processo de criopreservação do sêmen.

Nas amostras do plasma seminal de caprinos colhidas nos períodos AIP e BIP, submetidas à eletroforese bidimensional, também foram focalizadas proteínas com massas moleculares entre 78 a 106 kDa (AIP) e de 74 a 97 kDa (BIP). Estas proteínas

encontram-se dentro do grupo de proteínas com afinidade a heparina (HAPs), descrito por La Falci et al. (2002), com 73 a 104 kDa e 119 a 178 kDa, cuja presença pode ser responsável pela deteriorização da motilidade espermática e da integridade do acrossoma. Neste experimento, não se pode corroborar com estes autores em virtude dos resultados de MP e integridade do acrossoma estarem dentro dos padrões estabelecidos para o sêmen caprino.

#### **4 Conclusão**

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que no período de AIP uma menor quantidade de proteína do plasma seminal de caprinos e também foi observado a presença de um grupo de proteínas de 14-15 kDa, sendo necessário uma maior investigação sobre o envolvimento deste grupo de proteínas na manutenção dos parâmetros espermáticos.

#### **5 Referências**

- Almeida, J.L., 2006. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. Dissertação de mestrado em Ciências agrárias, Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 77p.
- Altma ,D.G., 1991. Practical Statistics for Medical Research. London: Chapman and Hall. 611p.
- Asadpour, S.M., Alavi-Shoushtari, S., Asri Rezaii, M.H., Ansari, K.H., 2007. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability Anim. Reprod. Sci. 102, 308–313.
- Bergeron, A., Boisvert, M., Manjunath, P., 2004. Comparative study on the phospholipids-binding proteins in seminal plasma of different species. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION Proceedings..., 2004, 226.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

- Brandon, C.I., Heusner, G.L., Caudle, A.B., Fayerer-Hosken, R.A., 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, 52, 863-873.
- Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T.J.A., 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66 (4), 841-850.
- Chemineau, P., Xande, A., 1982. Reproductive efficiency of Creole meat goats permanently kept with males. Relationship to a tropical environment. *Trop. Anim. Prod.*, 7, 98-111.
- Chiou, S-H., Wu, S-H., 1999. Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Analy. Chim. Acta*. 383, 47-60.
- Ewing, L.L., Chang, T.S.K., 1986. Physiology of male reproduction. In: CAMPBELL, M.F.;WALSH, P.C. *Campbell's urology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 200-274.
- Flowers, W.L., 2001. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. *Proceedings, Fifteenth International Pig Veterinary Society Congress*, 1, 45-52.
- Fraser, G.S., Bucci, D.M., Brooks, C.L., 1996. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-millilitre straws. *Theriogenology*, 46, 1103–1115.
- Giulietti, A.M., Bocage Neta, A.L., Castro, A.A.J.F., 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma da caatinga In: *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília: MMA-UFPE; Brasília, DF. 47-90.
- Jobim, M.I.M., Oberst, E.R, Salbego, C.G, Souza, D.O, Wald, V.B, Mattos, R.C., 2003. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional gel de poliacrilamida. *Acta Sci. Vet.*, 31(1), 21- 30.
- Jones, R., 1998. Spermiogenesis and sperm maturation to development of fertilizing capacity. In: Lauria, A. Gandolfi, F., Enne, G., Gianaroli, L. *Gametes, development and function*. Roma: Serono Symposia., p. 205-218.
- La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J.L., Brandelli, A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins *Theriogenology*, 57, 1035-1048.

- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 113–141.
- Manjunath, P., 1984. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in Bull seminal plasma. In: Sairam, M.R., Atkinson, L.E. (Eds.), *Gonadal Proteins and Peptides and Their Biological Significance*. World Scientific, Singapore, pp. 49–61.
- Manjunath, P., Thérien, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.*, 53, 109–119.
- Muller, C.J.C.; Botha, J.A.; Smith, W.A, 1994. Effect of shade on various parameters of Friesian cows in a Mediterranean climate in South Africa. 3. Behavior. *S. African J. Anim Sci.*, 24, 61-66.
- Nunes, J.F., Corteel, J.M., Combarous, Y. Bail 0. Leboeuf B. , 1982. Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoids de bouc. *Reprod. Nutr. Dev.* 22, 611–620.
- Nunes, J.F., 1988. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 12 (2), 77-83.
- O’Flaherty, C., Beconi, M., Beorlegui, N., 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, 29, 269–275.
- Ollero, M., Cebrian-Perez, J.A., Minoblanco, T., 1998. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability addition of seminal plasma. *J. Androl.* 18, 732-739.
- Restall, B.J., 1991. Goat production in Asian humid tropics. Eds. B.W. Norton and S. Saithanoo. *Proceedings of an International Conference*. Hat Yai. Thailand, May 1991, p .74-83.
- River, C., Rivest, S,1991. Effect of stress of the activity of the hypothalamic-pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol.Reprod.*, 45: p.523-532.
- Roth, T.L., Weiss, R.B., Buff, L.M., Wilt, D.E., Bush, M., 1998. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biol. Reprod.*, 58, 475-482.
- Roy, A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper’s gland of the goat. *Nature* 179, 318–319.

- Santos, A.D.F., Torres, C.A.A., Fonseca, J.F., Borges, A.M.B., Costa, E.P., Guimarães, J.D., Rovay, H., 2006. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *R. Bras. Zootec.*, 35(5), 1-14.
- Santos, D.O., Simplício, A.A., 2000. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. *Pesq. Agrop. Bras.*, 35 (9), 1835-1841.
- Schoneck, C., Braun, J., Einspanier, R., 1996. Sperm viability is influenced “in vitro” by the bovine seminal protein aSFT effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, 45, 633-642.
- Shannon, P., 1978. Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 54: 519-527.
- Shivaji, S., Scheit, K., Bhargava, P., 1990. *Proteins of Seminal Plasma*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 526p.
- Silva, A.E.D.F., Dias, A.L, Unanian, M.M, Freitas, A.R, Bloch Junior, C., 2003. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Rev. Bras. Zootec.*, 32 (6), 1890-1900.
- Silva, G.A., Souza, B.B., Peña Alfaro, C., Azevedo, S.A., Azevedo Neto, J., Silva, E.M.N., Kariston, A., 2005. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminiais de caprinos no semi-árido paraibano. *Agropecu. Cient. no Semi-árido*, 1, 7-14.
- Smith, J.F.; Parr, J.; Murray, G.R .; Mcdonald R.M.; Lee, R.S.F., 1999. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.*, 59, 223–225.
- Stenstedt, T.B., Bjellqvist, B., Laird, N., 2002. *2-D Electrophoresis-Principles and methods (Manual)*.
- Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2003. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. End.*, 1:39.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neil, J.D. *The Physiology of reproduction*, Eds. Raven Press, New York, 189-317.

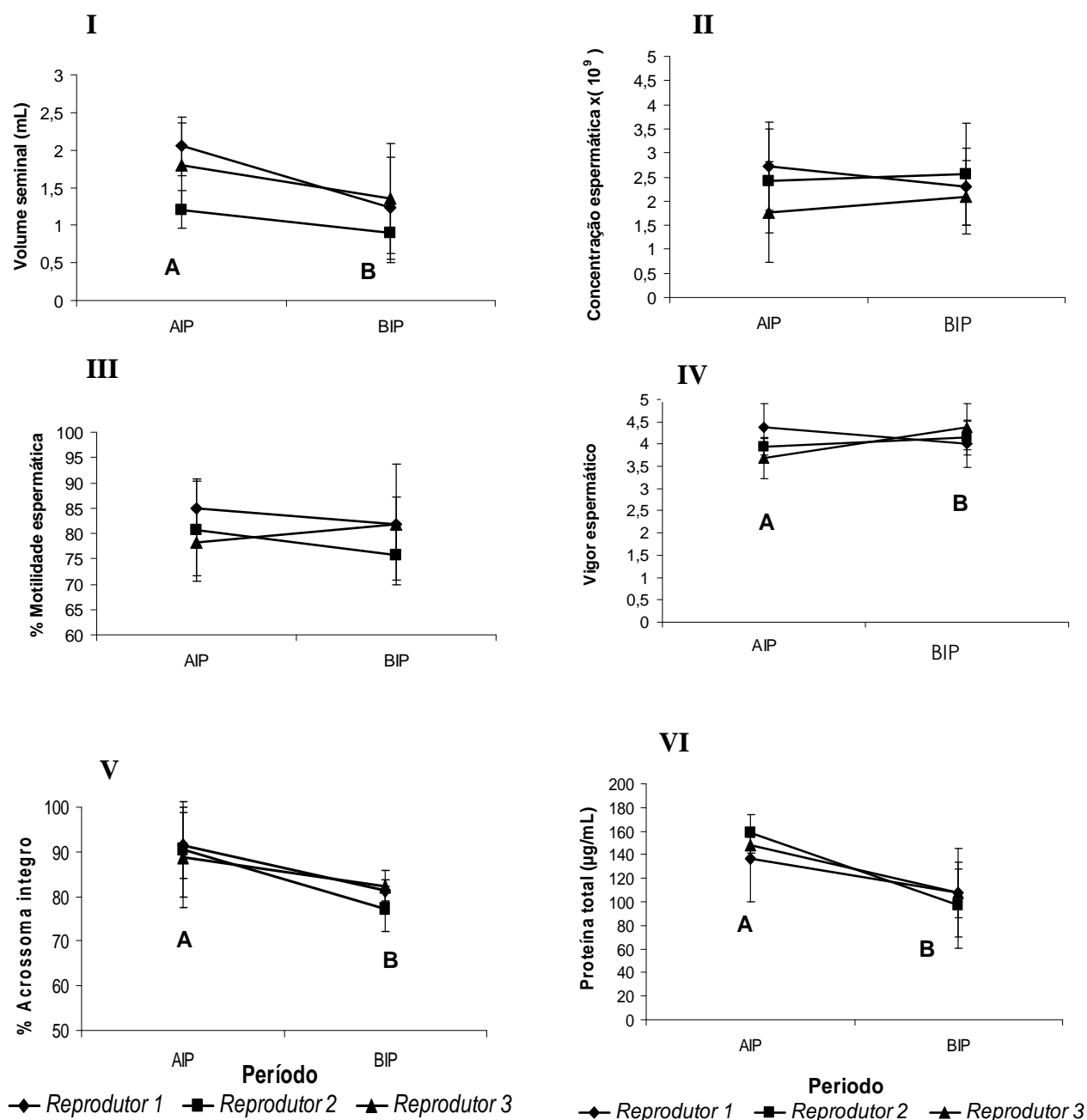


Figura 1

Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen *in natura* dos reprodutores caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico. I) Volume seminal (mL); II) Concentração espermática ( $\times 10^9$ /ejaculado); III) Motilidade espermática (%); IV) Vigor espermático (0-5); V) Acrossoma integro (%); VI) Proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ). Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre períodos AIP e BIP.

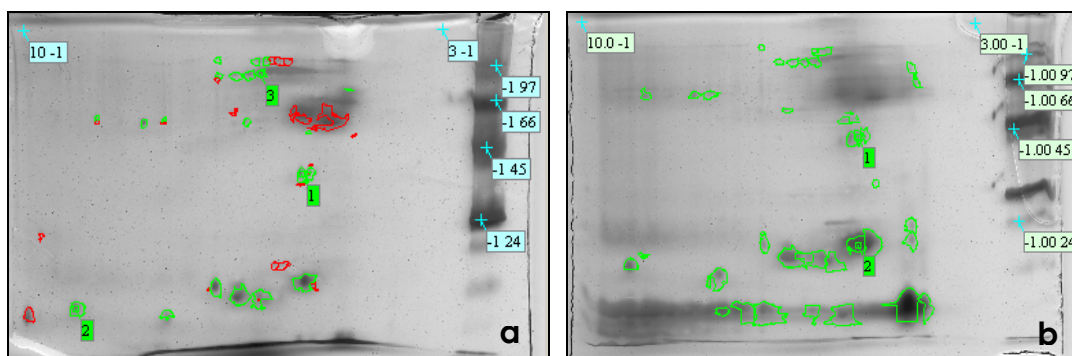


Figura 2

Eletroforese bidimensional de proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de alto (a; AIP) e baixo (b; BIP) índice pluviométrico, em gel de poliacrilamida (12,5%) corado com prata. Valores aproximados da massa molecular indicado à direita e pH indicados na borda superior do gel. *Spots* marcados de verde são similares e de vermelho são diferentes.



Tabela 1

Massa molecular relativa (Mw) e ponto isoelétrico (pI) das proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana, criados no Município de Camocim de São Felix, colhido nos períodos de alto (AIP) e baixo (BIP) índice pluviométrico, em gel de poliacrilamida (12,5%)

<b>AIP</b>		<b>BIP</b>	
<b>MW</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>pI</b>
106	6,80	97	6,78; 5,90
101	5,66	96	6,16; 5,99; 5,79; 5,65
102	5,83	86	6,08
88	6,51	85	6,49; 6,27
87	6,03; 5,84	84	6,78
86	6,25	82	6,79
78	4,14	74	4,63
69	4,06	62	5,54
64	4,06	60	6,53; 5,54; 4,88
59	8,88	58	8,73; 5,41
57	7,97; 7,67	57	8,73; 7,64; 6,31; 4,89
49	6,70	56	7,96; 7,65
48	5,22	54	5,20
46	5,10	52	5,30
45	5,33	51	4,58
39	5,08	41	5,27
38	5,21; 4,95	40	5,27
26	4,77	39	5,42; 5,29
17	4,12	36	5,41
16	6,78	26	9,62
15	4,86; 4,12	25	9,64
14	6,75; 5,26; 5,09	21	5,86; 5,73; 5,64
13	8,96; 8,92; 8,86; 6,30; 5,73	19	5,37; 5,25
12	9,14; 5,58	18	6,94; 6,81; 5,17
11	7,5	17	6,44; 6,11; 6,08
10	7,73	16	9,07
8	7,48; 7,12; 6,74; 5,89; 5,34; 4,22; 3,89	15	9,83; 7,59; 7,58
4	3,08; 3,01; 3,00		

## 4.2 Proteínas de membrana de espermatozóides *in natura* e após descongelação colhidos de caprinos nos períodos de baixo e alto índice pluviométrico

A.F. Souza<sup>1,2</sup>, M.C.Gomes Leitão<sup>2</sup>, A.M. Batista<sup>1</sup>, R. J. Silva<sup>2</sup>, J.L.Lima Filho<sup>2</sup>, M.E.C. Chaves<sup>2</sup>, A.L.F. Porto<sup>1,2</sup>, M.M.P. Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

### Resumo

Objetivou-se com este estudo avaliar o perfil protéico das membranas de espermatozóides *in natura* e após descongelação, colhidos de caprinos nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico. Foram colhidas 96 amostras de sêmen pelo método de vagina artificial de três reprodutores da raça Alpina Americana, com idade variando de 24 a 48 meses. Após a colheita, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos parâmetros macroscópicos (cor, volume e aspecto) e microscópicas (motilidade progressiva, vigor, concentração, morfologia, integridade de acrossoma e DNA) e a seguir, divididas em três alíquotas com a finalidade de realizar os procedimentos de: 1) congelação (0,5 mL), 2) perfil de proteínas das membranas espermáticas (1 mL) e 3) análise de integridade de acrossoma e de DNA (restante do ejaculado). As amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em máquina TK3000 (- 0,25 °C/ min, de 25 °C a 5 °C, e a - 20 °C/ min, de 5 °C a -120 °C) e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37 °C; 30 segundos), as amostras foram avaliadas quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma e de DNA. O perfil de proteínas das membranas espermáticas foi realizado através da análise de eletroforese bidimensional, após dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas aplicadas no gel de eletroforese. Não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) na motilidade espermática do sêmen *in natura* entre animais e entre períodos BIP (79,82%) e AIP (81,25%), assim como no vigor espermático nos períodos BIP (4,17) e AIP (4,00). Porém foi observado maior ( $P<0,05$ ) percentual de espermatozóides com acrossomas integros no sêmen *in natura* colhido no período AIP (90,25%) do que no BIP (80,26%). Após descongelação constatou-se diferença significativa ( $P<0,05$ ) na MP das amostras colhidas nos períodos BIP (60,00%) e AIP (71,30%) e não significativa ( $P>0,05$ ) no percentual de células com acrossomas íntegros no BIP (67,98%) e AIP (66,83%). Foram identificados 56 e 165 *spots* de proteínas no sêmen *in natura* e descongelado, cujos pontos isoelétricos (pIs) foram de 3,36 a 9,74 e de 3,37 a 8,80, enquanto as massas moleculares relativas variaram de 25 a 103,0 kDa e de 9,0 a 131,0 kDa, respectivamente. Na análise dos géis das amostras de sêmen descongelado, constatou-se aumento do número de *spots* de proteínas focalizados. Conclui-se que as proteínas de membranas espermáticas de

amostras de sêmen caprino *in natura*, colhidas nos períodos de alto e baixo índice pluviométrico, com massas moleculares relativas de 25 a 103 kDa estão em menor quantidade do que as presentes nas membranas espermáticas de amostras de sêmen descongelado encontradas no mesmo período, neste grupo foram encontrado proteínas com massas moleculares relativas de 9 a 131 kDa

*Palavras-chave:* Proteínas, membrana, espermatozóides, *in natura*, descongelação, caprino.

## 1.Introdução

As concentrações de moléculas protéicas no ejaculado dos animais estão sob controle da época do ano em virtude de diferenças climáticas observadas entre as estações reprodutivas e não-reprodutivas [1]. Estudos comprovam que as proteínas presentes no plasma seminal ligam-se às proteínas de membrana dos espermatozóides, provocando alterações bioquímicas como aumento da permeabilidade da membrana, injúrias celulares e choque térmico durante a congelação [2]. No entanto, algumas proteínas do plasma seminal também adsociam à membrana durante o trânsito espermático do epidídimo até a ejaculação [3]. Segundo Thétien e Manjunath [4], as proteínas do plasma seminal de bovino (BSPs) associam à membrana dos espermatozóides no momento da ejaculação, sugerindo interação do plasma seminal e das células espermáticas, com papel importante no processo de fecundação.

As proteínas atuam sobre as funções espermáticas, sendo que a ácida do fluido seminal bovino (aSFP) é uma das principais proteínas isolada no plasma seminal de bovinos (13 kDa), exercer controle sobre a peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide [5]. Mesmo em concentrações pequenas, estas proteínas parecem proteger os espermatozóides das espécies reativas ao oxigênio (ROS), reduzindo a atividade respiratória e minimizando a reação em cadeia de produção de ROS e quando encontrada em concentrações superiores nos reprodutores que possuem maior congelabilidade do sêmen, determina maior preservação da membrana do espermatozóide dos efeitos nocivos causados pela peroxidação [6]. Anteriormente identificada na espécie bovina como proteínas ligadoras de heparina (BSP A1/A2; 16,5 kDa e pI4,7; 16 kDa e pI 4,9 a 5,2,

respectivamente), sua função é fornecer melhor proteção à membrana espermática durante a congelação [7].

Nos caprinos, poucos estudos relatam o perfil protéico da membrana espermática do sêmen congelado, uma vez que a maioria dos trabalhos está relacionada com as proteínas do plasma seminal. Santos [8] relatou que no sêmen congelado de caprinos há predominância em número de proteínas de massa molecular reduzida (5,7 a 26,8 kDa), e que a sua presença é responsável por valores pequenos de motilidade espermática pós-descongelação.

Para prevenir a desestabilização precoce da membrana, fatores estabilizantes e decapacitantes presentes no plasma seminal são adsorvidos na membrana citoplasmática e causam estabilização visando prevenir a capacitação prematura durante o transporte nos sistemas reprodutores masculino ou feminino [9,10]. É possível que a ausência ou a presença de determinadas proteínas não seja deletéria à motilidade e morfologia espermática; contudo, pode ser prejudicial a outras características do espermatozóide como capacitação, reação do acrossoma e interação espermatozóide/ovócito [11]. A identificação destas proteínas pode ajudar na formulação de protocolos que melhorem a criopreservação do sêmen [12]. Por conseguinte, objetivou-se com este trabalho avaliar o perfil protéico das membranas de espermatozoides *in natura* e descongelados colhido de caprinos nos períodos de alto (AIP) e baixo (BIP) índice pluviométrico.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Animais e local do experimento*

Foram utilizados 3 reprodutores caprinos da raça Alpina Americana, sexualmente maduros, com idade variando de 24 a 48 meses, com bom estado nutricional e alimentados em regime semi-intensivo com capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) no cocho e pastejo em capim Suázi (*Digitaria swazilandensis*), Tanzânia (*Panicum maximum*), Braquiária Brachiaria humidícola) e concentrado (500g/dia) à base de milho triturado (*Zea mays ssp*) e farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin), correspondendo a 26% de proteína bruta

e 82% de NDT (nutrientes digestíveis totais), além de água e sal mineral *ad libitum*.

Os animais pertenciam a uma propriedade localizada no Município de Camocim de São Felix, Região Agreste do Estado de Pernambucano (Microrregião do Brejo), com altitude de 650 m, 8°21', 35°45' (Lat. S, Long. W) e caracterizada por clima Tropical Úmido com temperatura mínima de 10 °C e máxima de 26 °C, e umidade relativa do ar entre 40 e 70%.

## 2.2 Colheita de sêmen e avaliação da qualidade espermática

As colheitas de sêmen foram realizadas em duas épocas do ano classificadas de acordo com o índice pluviométrico (IP; Figura 1), como baixo IP (BIP), correspondendo aos meses Janeiro de 2006 (0 mm e 22,7 °C) e Novembro de 2006 (0 mm e 22,3 °C), e alto IP (AIP), correspondendo aos meses de julho a agosto de 2005 (IP = 210 mm e temperatura média de 18,8 °C) e Maio a Junho de 2006 (IP= 137,0 mm e 19 °C), de acordo com o Laboratório de Meteorologia de Pernambuco do Instituto Tecnológico de Pernambuco (LAMPE/ ITEP, 2007).

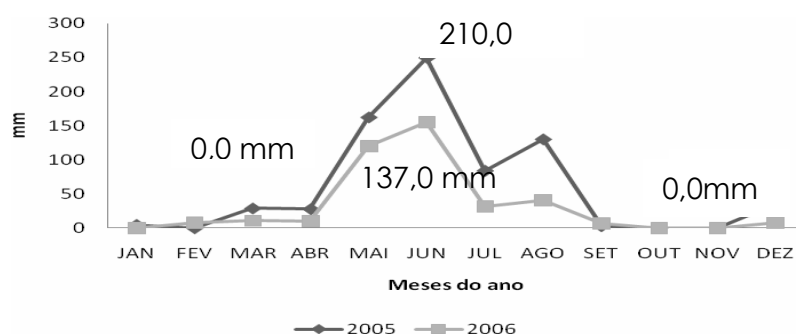


Figura 1  
Índice pluviométrico referente aos anos de 2005 e 2006, no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco (Fonte: LAMPE/ITEP, 2007).

Os animais foram submetidos a duas colheitas consecutivas de sêmen por dia, pelo método da vagina artificial com ajuda de uma fêmea como manequim. As amostras de sêmen corresponderam ao *pool* de dois ejaculados de um mesmo

animal, sendo quatro amostras obtidas de cada reprodutor por período (AIP e BIP), em dois anos de estudo (2005 e 2006), totalizando 96 colheitas de sêmen.

Inicialmente, as amostras de sêmen foram submetidas à avaliação macroscópica (volume, cor e aspecto) e colocadas em banho-maria (37 °C) durante avaliação das características microscópicas (motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática). A motilidade progressiva (MP; 0,0 - 100,0%) e o vigor espermático (0-5) foram avaliados de forma subjetiva, através da observação em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão), e aprovados os ejaculados com MP e vigor mínimos de 80,0% e 3,0, respectivamente. A concentração espermática foi realizada através da técnica de Câmara de Neubauer e os resultados expressos em bilhões de espermatozoides/ejaculado [13]. Em seguida, as amostras foram divididas em 3 alíquotas com a finalidade de realizar os procedimentos de: 1) criopreservação (0,5 mL); 2) avaliação do perfil protéico das membranas espermáticas (1,0 mL); e 3) realização de exames complementares, como integridade do acrossoma e do DNA espermático ( $\pm 0,5$  mL).

### 2.2.1 Integridade de acrossoma

Dez microlitros do sêmen *in natura* e do descongelado foram diluídos em 1,0 mL de solução Tris [3,605 g de Tris (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 1,488g de Frutose, 2,024 g de Ácido cítrico, 100 mL de Água bidestilada; pH 6,8] e utilizados para confecção de esfregaços, os quais foram armazenados a 4 °C, protegidos da luz e analisados no prazo de duas semanas utilizando-se a técnica de coloração fluoresceína isothiocianato-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA; Sigma, Saint Louis, MO, USA), de acordo com Roth [14]. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 30  $\mu$ L de solução de PNA (20  $\mu$ L de PNA + 480  $\mu$ L de PBS), refrigeradas (4 °C) durante 20 minutos, imersas em 50,0 mL de solução salina tamponada (PBS) e colocadas em caixa de isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas (5  $\mu$ L) da solução UCD [5,0 mg de Azida sódica; 0,5 mL de PBS, 0,1% w/v de Fenilenediamina (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 4,5 mL de Glicerol; pH 8,0] foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência

(Olympus, Tokio, Japão), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), onde foram contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando a região acrossomal apresentava fluorescência verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando os espermatozoides apresentavam fluorescência verde na região equatorial da cabeça ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

### 2.2.2 Integridade de DNA

Amostras (10 µL) de sêmen *in natura* ou descongeladas foram armazenadas em 990 µL de solução TNE [0,1576 g de TRIS-HCl (0,01M), 0,877 g de NaCl (0,15M), 37,2 mg de EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1mM), q.s.p. 100,0 mL; pH 7,4] a -196 °C para posterior avaliação da integridade de DNA espermático usando o corante Laranja de Acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), segundo metodologia utilizada por Everson [15]. Alíquotas (100 µL) das amostras foram descongeladas a 37 °C e transferidas para tubos de microcentrífuga e colocados em gelo, onde foram adicionados 200 µL da solução ácido detergente [0,1 mL de Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, MO, USA), (0,1% v/v); 0,877 g de NaCl (0,15M); 8 mL de 1N HCl (0,08N); pH 1,4], e incubados durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 60 µL da solução de Laranja de Acridina [60 µL da solução B (1 mg de Laranja de Acridina em 1 mL de água de miliQ) adicionada em 9940 µL da solução A [37,0 mL de 0,1M ácido cítrico; 63,0 mL de 0,2M de fosfato de sódio; 0,877 g de NaCl (0,15M) e 37,2 mg de EDTA (1mM); pH 6,0]. Após homogeneização, 200 células foram avaliadas em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). As células coradas de verde fluorescente foram classificadas como portadoras de DNA íntegros, enquanto aquelas que emitiram fluorescência vermelha, laranja ou amarela foram classificadas como portadoras de DNA danificado.

### 2.3 Criopreservação do sêmen

O processo de criopreservação foi realizado de acordo com os resultados obtidos na avaliação das alíquotas (0,5 mL) de cada ejaculado, as quais foram submetidas a duas lavagens em solução Tris, na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem) e centrifugadas (2500 xg) durante 10 minutos. Após a segunda lavagem, foi acrescentado, ao sedimento, diluente à base de leite em pó desnatado contendo glicerol (7%), à temperatura ambiente, de forma que cada dose inseminante contivesse  $150 \times 10^6$  de espermatozóides, as quais foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas em máquina TK 3000 (TK Tecnologia em congelação, Brasil), na curva de congelação rápida (- 0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a - 20 °C/min, de 5 °C a -120 °C) e, após atingir -120 °C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Uma semana após a criopreservação, as amostras foram descongeladas à temperatura de 37 °C, durante 30 segundos, e avaliadas quanto a MP, vigor, integridade de acrossoma e DNA, assim como concentração de proteínas totais

### 2.4 Dosagem das proteínas de membranas espermáticas

#### 2.4.1 Extração de proteínas totais

Os espermatozóides do sêmen *in natura* foram colocados em tubos de microcentrífuga (2,0 mL), onde o volume foi completado com solução de Tris-Cloreto (48 mg de Tris, 22 mg de CaCl<sub>2</sub>, 100 mL de água destilada; pH 7,4) e centrifugado a 300 xg por 10 minutos em centrífuga refrigerada (4 °C) para remoção completa do plasma seminal.

Quatro palhetas de 0,25 mL de sêmen foram descongeladas à temperatura de 37 °C por 30 segundos e, em seguida, colocadas em tubos de microcentrífuga (2,0 mL), onde o volume foi completado com solução de Tris-Cloreto e centrifugado a 300 xg, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (4 °C) para remoção completa do diluidor. Esta etapa foi repetida quatro vezes.

Após lavagem do sêmen *in natura* e do sêmen descongelado, ao precipitado formado pelas células espermáticas foi adicionado 1,0 mL do tampão



de extração de proteínas de membrana plasmática, composto de solução Tris-Cloreto + 40 µL de Triton X100 a 2,0%. O precipitado foi agitado em vortex durante 5 minutos e centrifugado a 9300 xg (15 minutos), sendo posteriormente utilizado para extração de proteínas. A este material foi adicionado 1,0 mL de ácido tricloroacético para cada 0,5 mL de sobrenadante, agitado em vortex e centrifugado a 9300 xg durante 15 minutos. O precipitado resultante foi lavado quatro vezes em 500 µL de acetona (4 °C) e centrifugado a 9300 xg durante 5 minutos. Após o tratamento, procedeu-se à secagem em temperatura ambiente por ± 20 minutos, obtendo o extrato de proteínas totais dos espermatozóides [16].

#### 2.4.2 Dosagem das proteínas totais

As amostras de proteínas membranas dos espermatozóides obtidos do sêmen *in natura* e descongelados foram submetidas à dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas a serem aplicadas no gel de eletroforese, através do método de Bradford [17].

#### 2.4.3 Eletroforese em duas dimensões (2-D) em gel de poliacrilamida

A focalização isoelétrica (FI) foi realizada segundo Jerrold [18] e o foco foi realizado em fitas *Immobiline Drystrips* (7 cm; pH de 3-10; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), em duplicata para cada amostra analisada. Antes da FI, as fitas foram rehidratadas por 15 horas a 28 °C em solução tampão contendo Uréia (9M), CHAPS {3-[(3cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato} a 2%, ditioneitol DTT 1%, gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida- IPG (pH 3-10) (Amersham Bioscience, Califórnia, USA) a 2% e azul de bromofenol a 0,002% (Cleveland, OH, USA), contendo 60 µg de extrato protéico de membrana plasmática. Para máxima reprodutibilidade, as focalizações foram conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1 Vh, 200 Vh, 2.800 Vh, e 3500 Vh, 4200 Vh e 3500 Vh por 3 h e 30 min (voltagem total aplicada ~ 8,5 kVh), utilizando o sistema de eletroforese MultiphorII (GEHealthcare Chalfont St. Giles, Reino Unido).

A segunda dimensão em gel de poliacrilamida a 12,5% (2DE SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) foi conduzida em corrente constante de 15mA por gel, utilizando sistema vertical (BIO-RAD). O padrão de peso molecular usado foi de 97 a 14 kDa (97 kDa – fosforilase; 66 kDa – albumina bovina; 45 kDa – ovalbumina; 36 kDa – gliceraldeído desidrogenase; 29 kDa – anidrase carbônica; 24 kDa – tripsinogênio; 20 kDa – inibidor de tripsina; 14 kDa -  $\alpha$ -lactalbumina). Os géis foram corados por 20 minutos em Comassie Brilhante Blue (250 g), ácido ortofosfórico e, em seguida, descorados em solução de 250 mL de ácido acético e 100 mL de metanol para 100 mL de água destilada. Os géis corados permaneceram em água destilada para posterior análise.

#### 2.4.4 Análise das imagens do gel

Cada gel foi copiado em *Scanner* HP e avaliado pelo programa de análise do *software* Phoretix (Non Linear USA Inc., Durham, USA). Após a identificação dos pontos de proteína, a área ( $\text{mm}^2$ ) e o volume ( $\text{mm}^2 \times$  intensidade dos pixels) de cada ponto foi obtido pela massa molecular (MW) e ponto isoelétrico (pI) e normalizado pelo experimento criado no *software* para análise dos dados. O gel referente foi selecionado de acordo com o melhor gel entre as duplicatas analisadas e usado para comparar os pontos protéicos nos diferentes géis. As análises dos géis 2-D foram realizadas através do programa Image Máster<sup>TM</sup> (2-D Platinum software da Amersham Biociences, UK, England). Foi gerado um gel master pelo software a partir do mapa do gel na qual representa o melhor padrão de spots para cada período analisado.

#### 2.5 Análise estatística

O experimento foi analisado com um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x 2 com 48 repetições. Para análise dos dados foram obtidas a média e o desvio padrão e utilizados os testes estatísticos: F (ANOVA) para dois fatores e para um fator com comparações de Tukey; teste t-Student com variâncias iguais ou desiguais; teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de estatística inferencial).

Ressalta-se que para vigor e modelos em que a interação animal e período (Índice pluviométrico) se mostraram significante nas outras variáveis, a análise de um fator foi realizada fixando-se os níveis do outro fator. Para as variáveis em que a interação não foi significante foi testado o modelo com dois fatores sem interação e adotado este último modelo no caso em que diferenças significantes foram encontradas entre animais ou entre períodos (IP). A verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene [19]. O nível de significância utilizado nas decisões de todos os testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados e analisados através do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) na versão 13.

### 3. Resultados

#### 3.1 Análise espermática

As análises das amostras de sêmen *in natura* (Figura 2) evidenciaram que o volume (mL) no período BIP não diferiu significativamente ( $P>0,05$ ) entre animais, ano e interação animal x ano. A concentração e o vigor espermático não demonstraram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, anos e interação animal x ano, nos períodos BIP e AIP, nos dois anos de avaliação (Figura 2-II e IV). A motilidade progressiva dos espermatozóides obtidos nos períodos BIP e AIP não apresentaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais. Todavia, foram constatadas diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os anos avaliados (2005 e 2006) nos dois períodos (BIP e AIP). O percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros diferiu ( $P<0,05$ ) apenas entre o ano avaliado (2005 e 2006) no período BIP, enquanto no período AIP não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, anos e interação animal x ano (Figura 2-V).

A motilidade progressiva dos espermatozóides, pós-descongelção (Figura 3-I), de amostras de sêmen congeladas no período BIP não evidenciou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, bem como na interação animal x ano. Todavia, foi observada diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os anos estudados, com menor percentual de células com motilidade progressiva nas

amostras descongeladas no ano de 2006 (2) quando comparadas ao ano de 2005 (1). O vigor espermático das amostras de sêmen descongeladas não demonstrou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais e entre anos, nos períodos BIP e AIP (Figura 3-II).

O percentual de espermatozoides com acrossomas íntegros, pós-descongelação, apresentou diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre animais e ano de avaliação no período BIP. Todavia, no período AIP não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, anos de avaliação e interação animal x ano de avaliação (Figura 3-III). Ao se avaliar a média do percentual de espermatozoides com acrossomas íntegros no sêmen *in natura* (Figura 2-V) com aquela encontrada nas doses descongeladas (Figura 3-III), evidencia-se maior perda no percentual de células com acrossomas íntegros nas amostras de sêmen descongeladas colhidas no período AIP do que no período BIP, nos dois anos avaliados (2005 e 2006).

### 3.2 Análise das proteínas de membrana espermática do sêmen *in natura* e descongelado

A concentração de proteínas totais ( $\mu\text{g/mL}$ ) das membranas espermáticas *in natura* (Figura 2-VI) evidenciou diferença significativa ( $P<0,05$ ) apenas entre períodos com médias de AIP igual a  $147,93 \mu\text{g/mL}$  e de BIP igual a  $103,84 \mu\text{g/mL}$ , tendo sido realizado *pool* das amostras de sêmen colhidas nos anos de 2005 e 2006. Nas amostras de membranas espermáticas do sêmen descongelado (Figura 3-IV) a concentração de proteínas totais ( $\mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ) evidenciou diferença significativa ( $P<0,05$ ) apenas entre períodos AIP ( $74,89 \mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ) e BIP ( $46,93 \mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ), tendo sido realizado o *pool* das amostras de sêmen colhidas nos anos de 2005 e 2006.

O estudo das proteínas de membrana dos espermatozoides obtidos do sêmen *in natura* realizado a partir da eletroforese bidimensional das amostras realizado em duplicata de cada período AIP1, BIP1, AIP2 e BIP2, evidenciou valores de similaridade entre as massas moleculares relativas das proteínas de 78,5%, 76,0%, 73,0% e 100,0%, respectivamente.

A avaliação pelo software da análise das imagens dos géis 2D detectou 56 *spots* de proteínas distribuídos nas amostras colhidas de membranas de espermatozóides *in natura* nos períodos AIP1 =16 BIP1 = 28, AIP2 = 10 e BIP2 = 2. Os pontos isoelétricos (pIs) das proteínas variaram de 3,36 a 9,74, enquanto as massas moleculares relativas variaram de 25,0 a 103,0 kDa (Tabela 1). A análise comparativa dos *spots* de proteínas similares demonstra a seguinte relação entre as amostras colhidas nos diferentes períodos: AIP1 X AIP2 = 7, BIP1 x BIP2 = 2 , AIP1 X BIP1 = 13 e AIP2 X BIP2 = 2 (Figura 4).

No gel obtido das proteínas de membrana espermática de sêmen descongelado foram obtidos 165 *spots* de proteínas de membrana de espermatozóides descongelados, com valores de similaridade de 81,16%, 81,69%, 83,56% e 83,33%, respectivamente, para as amostras dos períodos AIP1, BIP1, AIP2 e BIP2. A quantidade de *spots* de proteínas avaliados pela análise das imagens dos géis (2D) para as amostras dos períodos foram de: BIP1 = 75, BIP2 = 19, AIP1 =37 e AIP2 = 39. Os pIs das proteínas variaram de 3,37 a 8,80, enquanto as massas moleculares relativas variaram de 9,0 a 131,0 kDa (Tabela 2). A análise comparativa dos *spots* comuns demonstrou a seguinte relação AIP1 X AIP2 = 24, BIP1 x BIP2 = 13, AIP1 X BIP1 = 26 e AIP2 X BIP2 = 14 (Figura 4).

Na análise dos géis das proteínas de membrana espermática neste experimento evidenciou aumento de *spots* de proteínas focalizados nas amostras do sêmen descongelado, correspondendo a 74,66% das proteínas isoladas de membrana de espermatozóides do sêmen *in natura* e descongelado.

Ao se comparar as amostras de proteínas de membrana de espermatozóides do sêmen *in natura* (N) com as amostras do sêmen descongelado (D), obteve-se no AIP1D x AIP1N = 41,67%, BIP1D x BIPN = 30,70%, AIP2D x AIPN = 32%, BIPD2 x BIPN = 19,08% de similaridade entre as amostras analisadas (Figura 5).

O número de *spots* de proteínas detectado amostras de membranas espermáticas do sêmen *in natura* e descongelado foram 56 e 165, respectivamente, e apresentavam na maioria pI na faixa ácida. Nas proteínas de membrana espermática de sêmen *in natura* foram encontrados 41 *spots* de proteínas (73,21%) e no sêmen descongelado 141 *spots* (85,45%).

#### 4. Discussão

Os valores dos parâmetros espermáticos de amostras de sêmen *in natura* encontrados neste experimento foram similares àqueles relatados por outros autores [20,21,22], onde relatam valores entre 88,0 a 84,0% de MP, e 4,5 de vigor. Em relação à concentração espermática, Souza [23], ao avaliarem caprinos de diferentes raças criados na região da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, verificaram maior concentração de espermatozóides no ejaculado (médias de  $4,74 \times 10^9$  espermatozóides/ejaculado), do que os encontrados no período AIP ( $2,30 \times 10^9$  espermatozóides/ejaculado) e BIP ( $2,31 \times 10^9$  espermatozóides/ ejaculado) deste experimento, fato que pode ser explicado pela variação entre raças e regiões de colheita de sêmen, uma vez que estes autores realizaram o estudo em uma região com maior distribuição de chuvas durante o ano.

Em relação à MP do sêmen descongelado, os dados encontrados neste experimento variaram de 45 a 83,33%, sendo superiores aos relatados por Souza [23], onde os resultados variaram de 45,0 a 47,6% de MP. Os valores mais elevados de MP obtidos neste experimento podem ser justificados pelo uso de máquina de congelação (TK300), que controla melhor as curvas de refrigeração e congelação, enquanto os autores utilizaram outro método de congelação (geladeira e caixa isotérmica), com menor controle de temperatura durante a criopreservação das células espermáticas.

As diferenças encontradas no MIP e vigor das amostras de sêmen *in natura* e descongeladas são explicadas pelo fato de que os procedimentos de criopreservação causam extensivos danos às células espermáticas devido a alterações na transição da fase lipídica ou aumento na peroxidação, com a conseqüente redução na velocidade e no percentual de células móveis [24,25].

A análise dos géis das proteínas de membrana espermática deste experimento evidenciou aumento no número de *spots* de proteínas focalizados nas amostras do sêmen descongelado. Este aumento da concentração de proteínas de sêmen focalizadas nas amostras de membrana de espermatozóides descongelados pode ser explicado pelo fato de algumas proteínas, quando submetidas a pH baixo ou na presença de citrato, rompem as suas estruturas

determinando o aparecimento de vários peptídeos. Entretanto, para provar esta hipótese, seria necessário isolar e seqüenciar os compostos protéicos para esclarecer se as estruturas são distintas ou são produtos da desagregação das proteínas [26]. Outra hipótese para o aumento do número de *spots* de proteínas extraídas foi relatada por Olero [12], ao afirmarem que a quantidade mais elevada de proteínas extraídas no sêmen descongelado indica que o processo de criopreservação torna a membrana da célula espermática mais sensível ao detergente de extração devido a danos celulares provocados durante a criopreservação.

Ao saírem do epidídimo, os espermatozóides associam-se às secreções das glândulas sexuais acessórias, constituídas de aminoácidos, íons e proteínas, que habilitam os espermatozóides para capacitação, ligação à zona pelúcida e reação acrossômica [27]. Algumas proteínas presentes no plasma seminal se ligam às proteínas de membrana dos espermatozóides [28], provocando alterações bioquímicas, aumenta o da permeabilidade da membrana, ocorrência de injúrias celulares e choque térmico durante a congelação. Nas amostras de membrana de espermatozóides utilizadas neste experimento foram focalizadas algumas proteínas de origem do plasma seminal, como a proteína de massa molecular relativa de 20 kDa, classificada como proteína básica do plasma seminal, e que esteve presente em 100% das amostras analisadas do sêmen descongelado, enquanto outra proteína de 45-46 kDa foi encontrada nas amostras de sêmen *in natura* nos quatro períodos analisados.

A análise dos 56 e 165 *spots* de proteínas detectados nas amostras de membranas espermáticas do sêmen *in natura* e descongelado, respectivamente, evidenciou que a maioria possuía pI ácido, sendo 41 (73,21%) *spots* no sêmen *in natura* e 141 (85,45%) *spots* no sêmen descongelado. Estes dados são similares àqueles relatados por Cardozo [29], ao relatarem que dos 252 *spots* de proteínas detectados no plasma seminal de carneiros através de eletroforese 2D, somente 35 possuíam pIs acima de 7,0.

Uma proteína de 45 kDa com pontos isoelétricos de 4,84 a 7,69 e 4,89 a 7,64 encontrada na membrana de espermatozóide *in natura* e descongelado, respectivamente, foram extraídas das amostras colhidas nos períodos AIP1, AIP2 e BIP1. Estes resultados diferem dos relatos de Asadpour [30], ao

afirmarem que o surgimento de uma proteína de 45 kDa no plasma seminal de búfalos foi responsável pelo maior número de células danificadas após descongelação do sêmen, neste experimento, verificou-se que o surgimento desta proteína na membrana dos espermatozóides determinou maior percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros pós-descongelação, com valores médios de 66,54% (AIP1), 66,50% (AIP2), 73,46% (BIP1) e 62,57% (BIP2). Ressalta-se que, ao se observar menor média das células com acrossomas íntegros, esta proteína (45 kDa) esteve ausente. Como a perda da integridade da membrana espermática é um fator que contribui para o declínio da motilidade espermática [31], pode-se afirmar que no período onde foi verificado menor percentual de células íntegras (62,57%; BIP2), observou-se menor percentual de células móveis (45%) no sêmen descongelado, sugerindo que a presença desta proteína pode ter sido responsável pela proteção das células espermáticas.

Constatou-se também a presença de um *spot* de proteína de 70 kDa nas amostras de sêmen *in natura* no período AIP2 e nas amostras descongeladas do AIP2 e do BIP2. Durante o segundo ano de estudo (2006), na propriedade onde se realizou o experimento, o índice pluviométrico foi de 392 mm, valor inferior a 725 mm do primeiro ano experimental (2005), o que comprometeu a oferta de volumoso aos animais. Um menor número de proteínas foram focalizadas tanto nas amostras de membrana espermática de sêmen *in natura* e no descongelado, como também a ausência de grupos de proteínas menores que 14 kDa no período que corresponde ao período de BIP2 descongelado. Estudos recentes relatam que a proteína do choque térmico (HSP70; 70 kDa), necessária para iniciar a meiose, está presente durante o estresse térmico, fato importante que poderá esclarecer eventuais falhas na formação de espermatozóides em animais criados em climas tropicais [32]. Em humanos, a HSP70 oferece proteção contra apoptose em espermatozóides de homens inférteis [33,34].

Um grupo de proteínas com massa molecular relativa de 14-15 kDa, anteriormente identificadas e denominadas de proteínas do plasma seminal de caprinos (GSP) por Villemure [35], foi encontrado nas membranas espermáticas de amostras de sêmen descongelado de caprinos em todos os períodos deste experimento. A presença desta proteína pode estar relacionada ao elevado percentual de células com acrossomas íntegros observados após o processo de



criopreservação, reduzindo os danos normalmente verificados nas organelas e membranas dos espermatozoides, semelhantes à capacitação espermática e reação acrossomal [36]. As GSPs são proteínas relacionadas com a família das BSPs encontradas na espécie bovina, cuja função no metabolismo já foram definidos como sendo uma proteína espermática com capacidade de ligação à membrana, e que pode servir como receptoras de lipoproteínas de alta densidade (HDL), presentes no sistema reprodutor feminino, como também mediando a troca de colesterol e fosfolípidios entre a membrana espermática e o HDL. Da mesma forma, Desnoyers [37] e Manjunath [38] também sugeriram que as proteínas BSPs estabilizam a membrana espermática evitando a prematura reação acrossomal, influenciando na capacidade fecundante dos espermatozoides e no sucesso no processo de criopreservação [38,39].

## 5. Conclusão

Conclui-se que as proteínas de membranas espermáticas de amostras de sêmen caprino *in natura*, colhidas nos períodos de alto e baixo índice pluviométrico, com massas moleculares relativas de 25 a 103 kDa estão em menor quantidade do que as presentes nas membranas espermáticas de amostras de sêmen descongelado encontradas no mesmo período, neste grupo foram encontrado proteínas com massas moleculares relativas de 9 a 131 kDa.

## 6. Referencias Bibliográficas

- [1] La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues BA. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins Theriogenology 2002; 57:1035-1048.
- [2] Moustafa AR. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing-and-thawing. Acta Vet Acad Sci Hung. 1981;28(4):403-408.
- [3] Desnoyers L, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. J Biol Chem 1992; 267:10149-10155.

- [4] Thérien I, Moreau R, Manjunath P.. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod* 1999; 61: 590–598.
- [5] Einspanier R, Krause I, Calvete J J, Töpfer-Petersen E, Klostermeyer H, Karg H. Bovine seminal plasma aSFP : localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms . *Bioch Soc Lett.*1994;344( 1): 61-64.
- [6] Roncoletta M, Morani ESC, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH..Fertility-associated proteins in Nelore Bull sperm membranes. *Anim.Reprod. Sci.* 2006;91:77–87.
- [7] Mattos RC, Jobim MIM, Oberst ER, Salbergo CG, Wald VB, Horn AP, Mattos ALG. BSP A1/A2: A seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION Proceedings..., 2004, p. 462.
- [8] Santos, D.O., 2005. Estudo do perfil protéico nas membranas de espermatozóides congelados de caprinos. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -UNESP-Botucatu-SP, 62p.
- [9] Howes L, Jones R. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization *J Reprod Imm* 2002; 53 (1-2):181-192.
- [10] Pérez-Pé R, Grasa P, Fernández-Juan M, Peleato M, Cebrián-Pérez J, Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2002;61:226 –233.
- [11] Killian, G. Fertility factors in seminal plasma. Proceedings of the 14th National Association of Animal Breeders Technical Conference. Chicago, 1992, 33-38.
- [12] Ollero M, Bescos, MO, Cebrián-Perez JA, Muiso-Blanco T ., Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process *Theriogenology* 1998; 49:547-555.

- [13] Mies Filho A. Reprodução Animal. 6 ed, Porto Alegre: Sulina, 1987, (2),p.750.
- [14] Roth TL, Weiss RB, Buff LM, Wilt DE, Bush M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). Biol. Reprod 1998; 58: 475-482.
- [15] Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J. Androl 2002; 23 (1): 25-43.
- [16] Berkelma T, Stensted T,. Handbook. 2-D eletrophoresis: using immobilized pH gradients, principles e methods. Amers Pharm Biot 1998;60(1):74.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- [18] Jerrold HZ. Biostatistical Analysis. Four Edition, New Jersey Prentice Hall. 1999; p.929.
- [19] Douglas G. Practical Statistics for Medical Research, Altma,Chapman and Hall, , London ;1991:p. 611.
- [20] Silva MAV. Efeito de diferentes diluentes de congelamento e duas temperaturas de descongelamento sobre a integridade acrossômica, vigor e motilidade espermática do sêmen caprino. 1993. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- [21] Salgueiro CCMD, Nunes JF. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. Rev Bras Rep Anim 1999;23:231-232.
- [22] Cezar KL R, Guerra MMP, Santos RM B, Câmara DR, Pinheiro Júnior JW ,Oliveira R R, Silva S V, Wischral A. Influência da configuração escrotal sobre a eficiência reprodutiva de caprinos nativos criados no sertão de Pernambuco. Rev Bras Reprod Anim 2002;26:115-117.
- [23] Souza AF, Guerra MMP, Coletto ZF, Mota RP, Silva LBG, Leão AEDS, Sobrinho Nascimento ESN. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. Braz J Vet Res Anim Sci 2006;43:329-336.

- [24] Watson, PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Rep Fert Dev* 1995;7: 871-889.
- [25] Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Rep* 2004 ;19: 932-939.
- [26] Silva AEDF, Dias AL, Unanian MM, Freitas AR, Bloch Junior C. Conteúdo de Peptídeos e Avaliação Morfofisiológica dos Espermatozoides do Epidídimo e Ejaculado de Bovinos. *Rev. Bras. Zootec.* 2003;32:1890-1900.
- [27] Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 2000;52:1273-1280.
- [28] Katska L, Rynska B, Smorag Z. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1996; 44:23-31.
- [29] Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco TJA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006 ;66:841-850.
- [30] Asadpour SM, Alavi-Shoushtari S, Asri Rezaii MH, Ansari KH. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability *Anim Rep Sci* 2007;102: 308–313.
- [31] O’Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997;29:269–275.
- [32] Eddy M. Spermatogenesis and HSP70 chaperones. *Biol Reprod* 1999; 60:74.
- [33] Beere HM, Green DR. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2001;11:6-10.
- [34] Erata GO, Toker NK, Durlanık O, Kadıoğlu A, Aktan G, Toker GA. The role of heat shock protein 70 (Hsp 70) in male infertility: Is it a line of defense against sperm DNA fragmentation? *Fertil Steril.* 2007;17:6 -21.

- [35] Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol End* 2003;1:39-41.
- [36] Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshallb CE, Dejarnett JM, Allenc CH. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology* 2001;56:31-40.
- [37] Desnoyers L, Therien I, Manjunath P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 1994; 37:425-435.
- [38] Manjunath P, Soubeyrand S, Chandonnet L, Roberts KD. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J* 1994;303:121-128.
- [39] Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation, *J Reprod Imm* 2002;53:109–119.

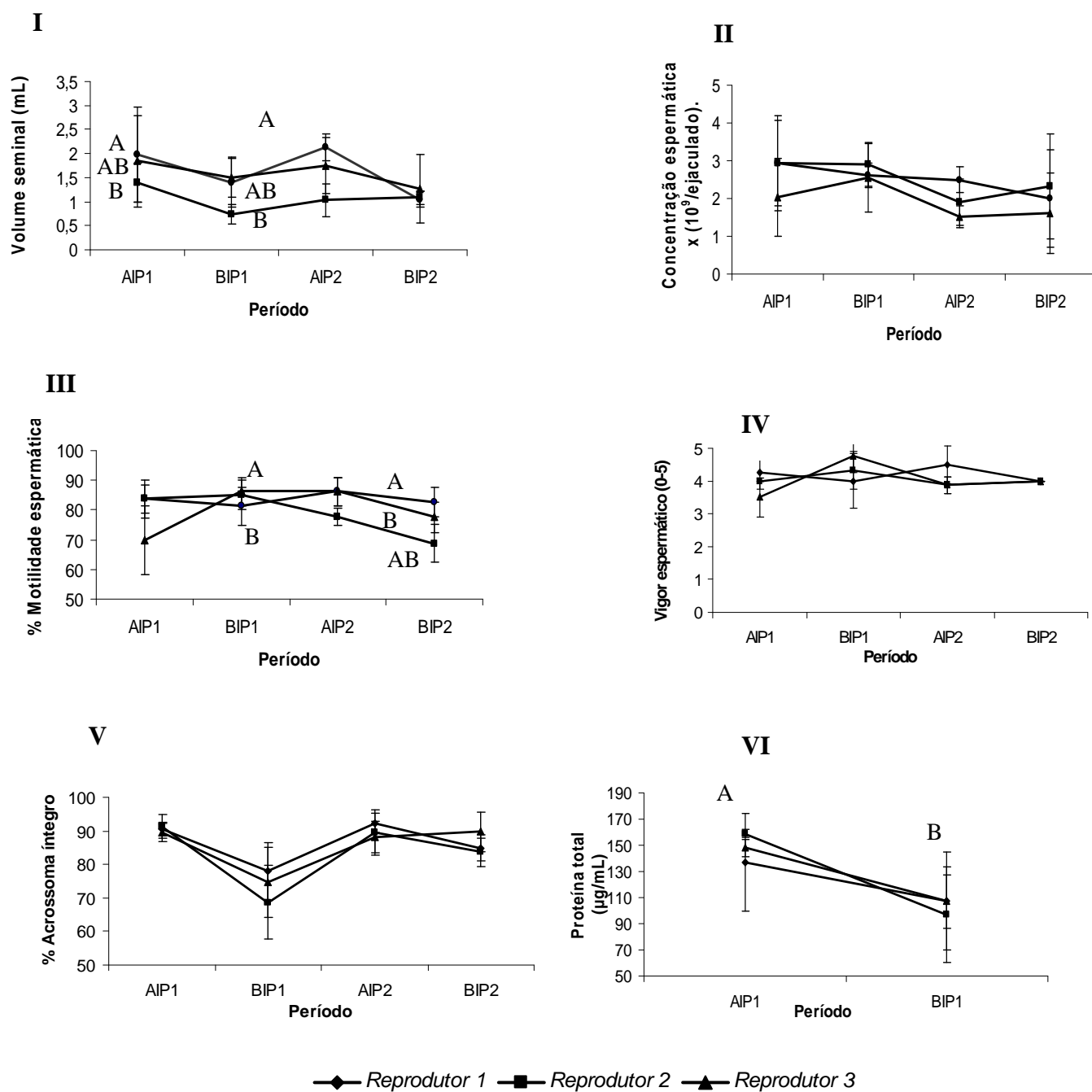


Figura 2

Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen *in natura* dos reprodutores caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico. I) Volume seminal (mL); II) Concentração espermática x (10<sup>9</sup>/ejaculado); III) Motilidade espermática(%); IV) Vigor espermático (0-5); V) Acrossoma íntegro (%); VI) Proteína total (µg/mL). Letras maiúsculas indicam diferença significativa (P<0,05) entre períodos AIP e BIP.

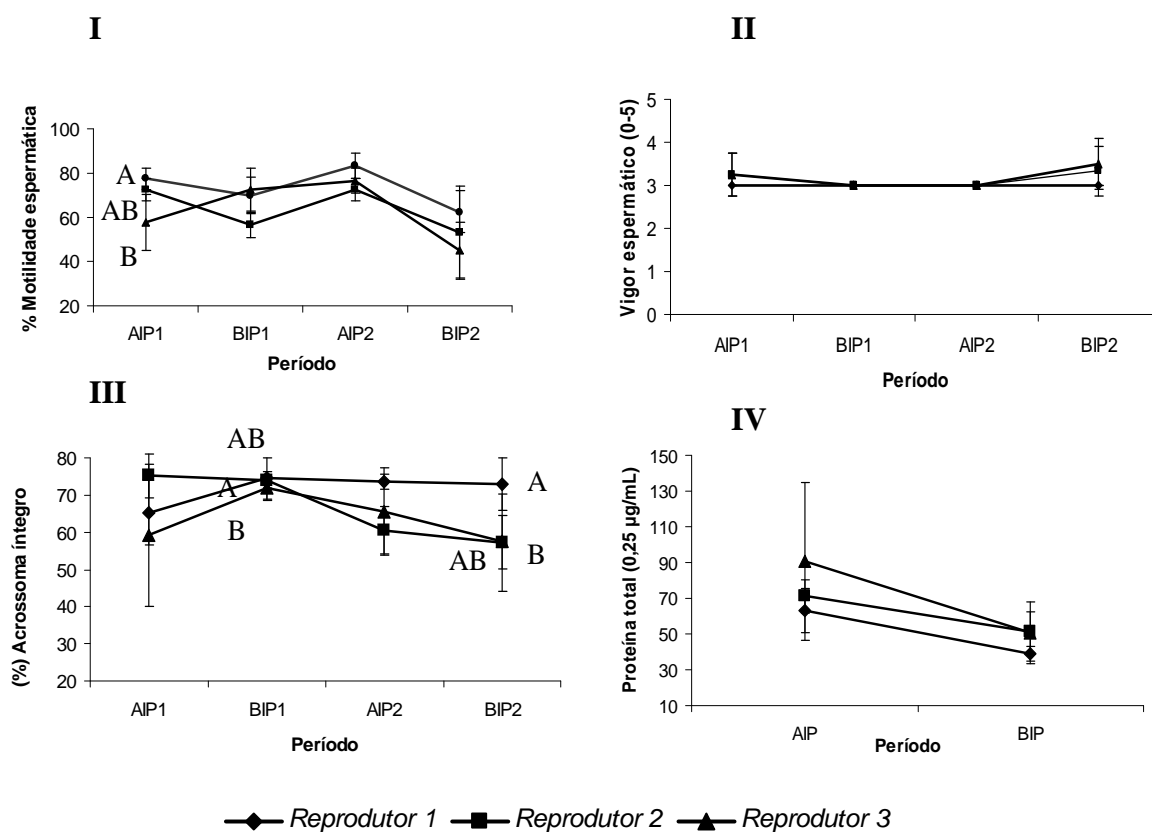


Figura 3

Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen descongelado de reprodutores caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico. I) % Motilidade espermática II) Vigor espermático (0-5), III) % Acrossoma íntegro, IV) Proteína total ( $\mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ).; Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre períodos.

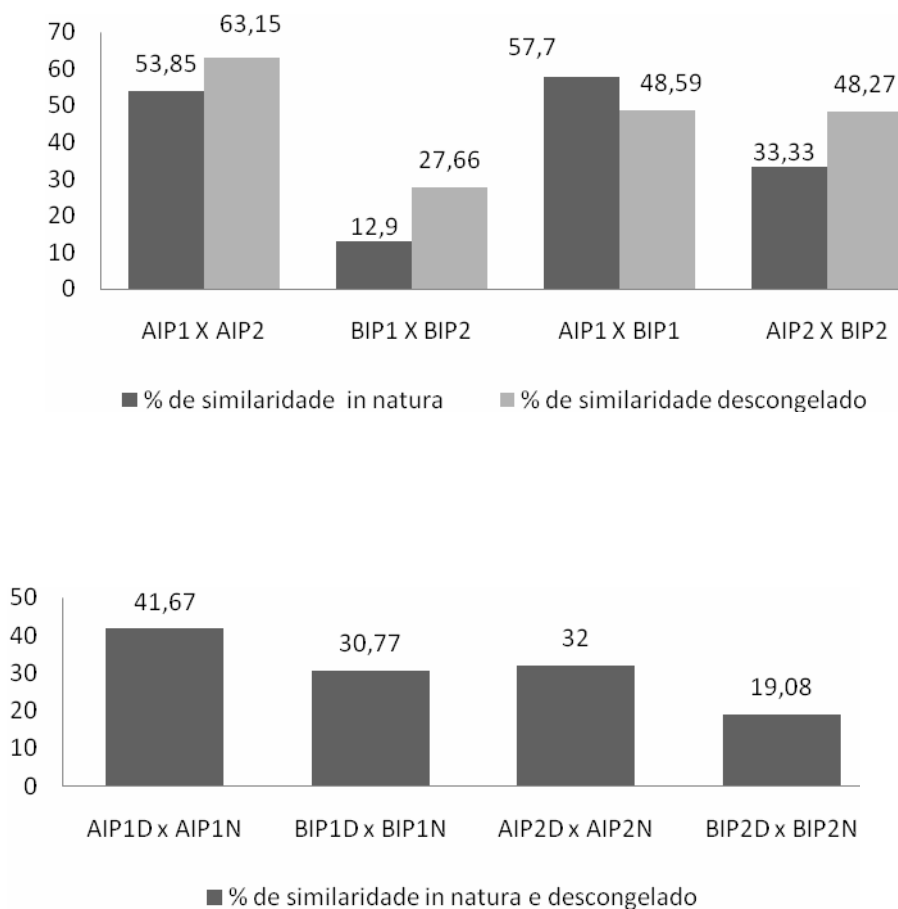


Figura 4

Gráficos representando o percentual de similaridade dos *spots* de proteínas de membrana espermática do sêmen *in natura* e descongelado, entre os períodos experimentais: AIP1 x AIP2, BIP1 x BIP2, AIP1 x BIP1, AIP2 x BIP2 e AIP1D x AIP1N, BIP1D x BIP1N, AIP2D x AIP2N, BIP2D x BIP2N de caprinos da raça Alpina Americana, criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico.



Tabela 1

Identificação das proteínas de membrana de espermatozóides *in natura* de caprinos da raça Alpina Americana criados na região Agreste do Estado de Pernambuco, de acordo com a massa molecular (kDa) e o ponto isoelétrico (pIs), independente do reprodutor e do período de colheita

<b>Mw. kDa</b>	<b>pIs</b>	<b>Mw. kDa</b>	<b>pIs</b>
<b>103</b>	4,99	<b>59</b>	9,53; 7,55
<b>102</b>	5,11	<b>58</b>	7,43
<b>97</b>	4,42	<b>55</b>	5,74
<b>91</b>	5,53	<b>54</b>	8,90;5,21
<b>88</b>	4,05	<b>53</b>	4,50
<b>87</b>	4,73	<b>51</b>	4,72
<b>85</b>	5,77	<b>49</b>	4,77
<b>84</b>	4,52; 4,30	<b>48</b>	5,00
<b>81</b>	9,74;9,26;5,36	<b>47</b>	5,88; 5,37
<b>80</b>	6,50; 5,11; 4,74	<b>46</b>	6,90; 5,60
<b>77</b>	6,10;5,61; 5,44; 5,30	<b>45</b>	7,69; 5,69; 4,84
<b>73</b>	8,71	<b>44</b>	7,13
<b>72</b>	7,14	<b>43</b>	7,88;6,88
<b>70</b>	5,25	<b>42</b>	8,65; 5,14
<b>67</b>	6,48	<b>39</b>	7,02;5,53
<b>66</b>	4,94; 4,27	<b>35</b>	6,99
<b>64</b>	5,37	<b>33</b>	8,09
<b>62</b>	3,70	<b>29</b>	3,83
<b>60</b>	8,81	<b>25</b>	3,36

Tabela 2

Identificação das proteínas de membrana de espermatozoides descongelados de caprinos da raça Alpina Americana criados na região Agreste do Estado de Pernambuco, de acordo com a massa molecular (kDa) e o ponto isoelétrico (pIs), independente do reprodutor e do período de colheita

Mw kDa	pIs	Mw kDa	pIs	Mw kDa	pIs
		<b>54</b>	3,71	<b>34</b>	8,68; 8,95
<b>90</b>	5,79;5,89;5,99	<b>53</b>	4,70	<b>33</b>	4,16;4,72
<b>87</b>	5,89	<b>51</b>	7,67; 6,37	<b>32</b>	5,17
<b>86</b>	6,00	<b>50</b>	3,46; 6,53; 5,31	<b>29</b>	7,95
<b>85</b>	7,62	<b>49</b>	5,08; 7,90; 7,63	<b>28</b>	4,26;7,97; 6,47
<b>82</b>	5,47	<b>48</b>	5,73; 5,69; 6,59	<b>27</b>	5,07;5,85;5,66;4,50; 4,33
<b>81</b>	5,35; 5,21	<b>47</b>	6,36	<b>26</b>	6,38;6,12;6,18; 6,66
<b>80</b>	6,32	<b>46</b>	5,45; 5,13; 4,71	<b>25</b>	4,86; 5,24; 3,82
<b>72</b>	5,78;5,18;5,45;5,94; 6,02; 4,89; 5,85	<b>45</b>	5,13;4,50; 4,92;6,73; 7,41	<b>24</b>	7,22
<b>71</b>	5,57	<b>44</b>	4,12	<b>23</b>	3,65; 4,54; 6,31; 4,88
<b>70</b>	5,07; 5,61;6,23	<b>43</b>	6,26	<b>22</b>	3,82; 5,88; 5,20
<b>69</b>	5,90; 4,82	<b>42</b>	5,71; 5,32	<b>21</b>	4,51; 5,66; 5,39
<b>68</b>	5,30	<b>41</b>	6,04, 5,88, 5,16, 5,66, 5,50	<b>20</b>	6,33; 6,66; 5,83; 5,38; 7,95; 7,71; 4,76
<b>65</b>	4,02; 3,92; 5,28	<b>40</b>	5,63;6,43; 4,52	<b>19</b>	4,81;7,94; 6,37; 7,06; 6,15; 6,67
<b>62</b>	5,46; 5,36	<b>39</b>	7,65; 7,38	<b>18</b>	6,32; 6,43; 6,80
<b>58</b>	6,65; 4,70; 4,75; 3,95	<b>38</b>	8,80	<b>17</b>	6,25
<b>57</b>	5,60;5,79;5,47;6,01;6,14	<b>37</b>	7,53; 4,70	<b>16</b>	6,47; 6,04; 6,11; 3,80; 8,1; 4,12
<b>55</b>	6,66	<b>36</b>	6,33	<b>14</b>	4,72; 5,33; 4,77; 5,83;4,66
				<b>&lt; 14</b>	

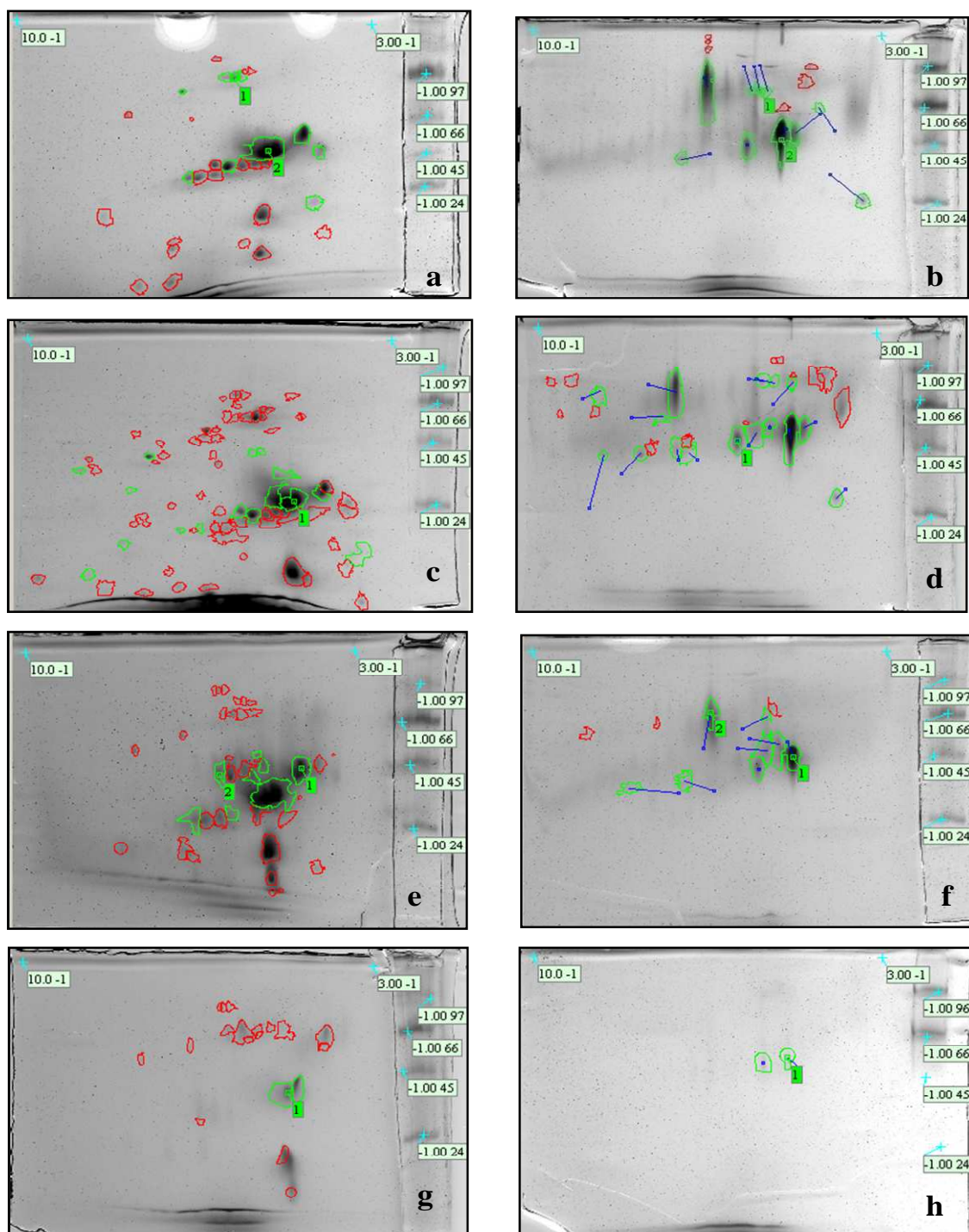


Figura 5

Geís de eletroforese bidimensional digitalizados referentes às proteínas presentes na membrana espermática do sêmen *in natura* e descongelado de caprinos criados na região Agreste do Estado de Pernambuco, de acordo com a massa molecular relativa (kDa) indicado à direita e o ponto isoelétrico (pIs) indicados na borda superior do gel, e comparados de acordo com os períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico: a,b) AIP1D x AIP1N ; c,d)BIP1D x BIP1N; e,f) AIP2D x AIP2N; g, h) BIP2D x BIP2N. Spots marcados de verde são similares e de vermelho são diferentes.

### 4.3 Perfil de proteínas de membranas espermáticas de caprinos relacionado com a congelação do sêmen

A.F. Souza<sup>1,2</sup>, M.C.Gomes Leitão<sup>2</sup>, Z.F. Coletto<sup>1</sup>, F. O. Silva<sup>2</sup>,

J.L.Lima Filho<sup>2</sup>, A.L.F. Porto<sup>1,2</sup>, M.M.P. Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

#### Resumo

Objetivando-se avaliar o perfil das proteínas de membranas de espermatozóides caprinos colhidos em períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico relacionado com a congelabilidade do sêmen, foram obtidas amostras de sêmen de três reprodutores da raça Alpina Americana nos anos de 2005 (1) e 2006 (2). Após colheita, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos parâmetros espermáticos e, em seguida, divididas em três alíquotas com a finalidade de realizar os procedimentos de: 1) congelação (0,5mL), 2) perfil de proteínas das membranas espermáticas (1mL) e 3) análise de integridade do acrossoma e do DNA ( $\pm 0,5$ mL). A criopreservação do sêmen foi realizada em máquina e as amostras foram armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37 °C, 30 segundos), as amostras foram avaliadas quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma e de DNA. O perfil de proteínas das membranas espermáticas foi realizado através da análise de eletroforese bidimensional, após dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas aplicadas no gel de eletroforese. Não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na motilidade espermática do sêmen *in natura* entre os animais, assim como entre as épocas BIP (79,82%) e AIP (81,25%). Constatou-se que a média de espermatozóides com acrossomas íntegros no sêmen *in natura* colhido no período AIP (90,25%) foi mais elevada ( $P < 0,05$ ) do que no BIP (80,26%). Após a descongelação constatou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na MP das amostras colhidas Nos períodos de BIP (60,00%) e AIP (71,30%). Foram identificados 165 *spots* de proteínas com diferentes massas moleculares relativas (Mw) de 9,0 kDa a  $> 131$ kDa e com pontos isoelétricos (pIs) de 3,37 a 8,80. Na análise do número de *spots* de proteínas comuns entre os grupos experimentais observou-se a seguinte relação: AIP1 X AIP2= 24, BIP1 x BIP2 = 13, AIP1 X BIP1 = 26 e AIP2 X BIP2= 14, correspondendo a 63,16%, 27,66%, 48,60% e 48,28% de similaridade entre os géis analisados, respectivamente. Apenas dois *spots* de proteínas foram encontrados em todos os grupos experimentais que correspondem à massa molecular de 20 e 14 kDa. Sugere-se que proteínas de baixa massa molecular ( $< 14$  kDa) são responsáveis pela preservação das características espermáticas em doses de sêmen descongeladas e que a criopreservação do sêmen deve ser realizada nos períodos de maior índice pluviométrico.

*Palavras-chave:* Proteínas, membranas, criopreservação, sêmen, caprino.

## 1. Introdução

A congelação de sêmen é um método auxiliar no emprego de biotécnicas como inseminação artificial (IA), transferência de embrião e fertilização *in vitro*. Durante a criopreservação do sêmen da maioria das espécies de animais domésticos ocorrem alterações bioquímicas e moleculares nos espermatozóides em decorrência de reorganização lipídica determinada pela desorganização das associações lipoprotéicas, principalmente durante as etapas de refrigeração e descongelação (Weitze e Petzoldt, 1992). Desta forma, o sucesso da congelação do espermatozóide depende da manutenção de várias funções que o possibilitará fertilizar o ovócito, como preservação da estrutura da membrana plasmática, da integridade do acrossoma, das funções das mitocôndrias e do axonema, assim como da integridade do DNA (Carneiro, 2002).

Proteínas solúveis e estruturais têm papel importante no metabolismo do espermatozóide e influenciam na sua capacidade fertilizante (Killian et al., 1993; Cooper, 1998; Gerena et al., 2000). Alguns estudos sugerem que uma proteína de 14,4 kDa pode afetar negativamente a capacidade de criopreservação da célula espermática, quando encontrada em maior concentração, determinar baixa congelabilidade do sêmen (Roncoletta, 1999; Roncoletta et al., 2002). Em touros, constatou-se que as proteínas do plasma seminal bovino (BSP), A1/A2 (16,5 kDa, pI 4,7; 16,0 kDa, pI 4,9 a 5,2, respectivamente), anteriormente conhecidas como proteínas ligadoras de heparina (HBP), fornecem melhor proteção à membrana espermática durante a congelação (Mattos et al., 2004). Estas proteínas são produzidas pelas glândulas sexuais acessórias masculinas, excretadas no plasma seminal e ligadas a proteínas de membrana espermática. Nos caprinos, estas proteínas são denominadas de GSP (proteínas do plasma seminal caprino) e possuem massa molecular mais elevada do que em outras espécies (La Falci et al., 2002).

As proteínas do plasma seminal (BSP) já foram estudadas nas espécies bovina (Chandonnet et al., 1990), suína e equina (Calvette et al., 1997), com baixa massa molecular (<30 kDa), e estão relacionadas à habilidade fertilizante do espermatozóide. Killian et al 1993, correlacionaram o perfil protéico do plasma seminal com a fertilidade do touro, esses mesmos autores também resalvam que a presença de um grupo de proteínas de massa molecular de 26 kDa pI 6,2 e 55 kDa pI 4,5 esteve predominante em touros de alta fertilidade e duas proteínas, de massa molecular 16kDa pI 4,1 e 16 kDa pI 6,7 foi predominante em animais de baixa fertilidade, sendo esta

proteína de 16 kDa, recentemente imunoidentificada como sendo Spermedezin Z13 (Moura et al., 2006).

Na espécie caprina estas proteínas variam de acordo com as estações reprodutivas e não reprodutivas, devido a mudanças endócrinas que afetam as secreções das glândulas sexuais acessórias. Em virtude de se ligarem principalmente à peça intermediária do espermatozóide caprino, a sua presença determina efeito negativo na motilidade como consequência de alteração na função mitocondrial (La Falci et al., 2002)

Dessa forma, a análise bioquímica das proteínas espermáticas colhidas de reprodutores em períodos de diferentes índices pluviométricos poderá identificar os fatores relacionados aos efeitos adversos da criopreservação, possibilitando, no futuro, a adoção de técnicas que minimizem os efeitos adversos da congelação sobre a viabilidade espermática e, assim, contribuir para o uso da técnica de IA por um número maior de criadores. Objetivou-se com este trabalho avaliar o perfil protéico das membranas de espermatozóides caprinos colhidos em períodos de BIP e AIP relacionado com a congelabilidade do sêmen.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Animais*

Foram utilizados três reprodutores caprinos da raça Alpina Americana, sexualmente maduros (24 a 48 meses), com bom estado nutricional e alimentados em regime semi-intensivo com capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) no cocho e pastejo em capim Suázi (*Digitaria swazilandensis*), Tanzânia (*Panicum maximum*) e Braquiária (*Brachiaria humidicola*). Os animais foram suplementados com concentrado (500g/dia) à base de milho (*Zea mays ssp*) triturado e farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin), correspondendo a 26,0% de proteína bruta e 82,0% NDT, além de água e sal mineral *ad libitum*.

### *2.2 Colheita de sêmen*

As colheitas de sêmen foram realizadas no período de julho/2005 a dezembro/2006, em propriedade localizada no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco (Microrregião do Brejo), com altitude de 650m, 8°21', 35°45' (Lat.S, Long.W), caracterizada por Floresta

subcaducifólia e caatinga hipoxerófila, e clima Tropical Úmido com temperatura mínima de 10 °C e máxima de 26 °C, assim como umidade relativa do ar entre 40,0 e 70,0%.

As amostras de sêmen foram colhidas em dois períodos do ano classificados de acordo com o índice pluviométrico (IP; Figura 1) como baixo IP (BIP), correspondendo aos meses janeiro de 2006 (0 mm e 22,7 °C) e novembro de 2006 (0 mm e 22,3°C), e alto IP (AIP), correspondendo aos meses de julho a agosto de 2005 (210 mm e 18,8 °C) e maio a junho de 2006 (137 mm e 19 °C), de acordo com o Laboratório de Meteorologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco (LAMPE / ITEP, 2007).

Os animais foram submetidos a colheitas de sêmen através do método da vagina artificial com ajuda de uma fêmea como manequim. Cada amostra de sêmen correspondeu ao *pool* de dois ejaculados de um mesmo animal, sendo quatro amostras obtidas de cada reprodutor por período (BIP e AIP) nos dois anos utilizados, totalizando 96 colheitas de sêmen.

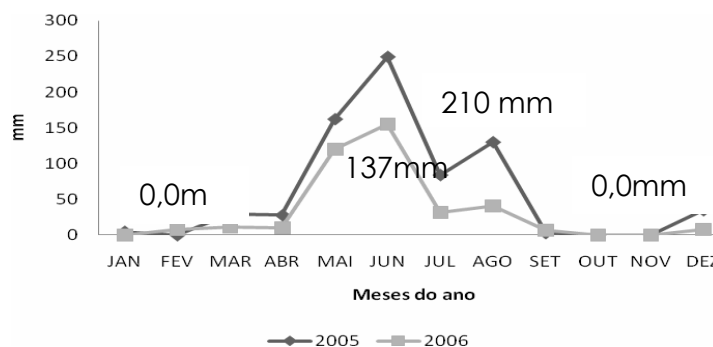


Figura 1  
Índice pluviométrico referente aos anos de 2005 e 2006, no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco (Fonte: LAMPE /ITEP, 2007).

### 2.3 Avaliação do sêmen

Após cada colheita, o ejaculado foi colocado imediatamente em banho-maria a 37 °C durante a avaliação das características macroscópicas (cor, aspecto, volume) e microscópicas (motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática). Sendo que a motilidade progressiva (MP; 0,0-100,0%) e o vigor espermático (0-5) foram avaliados de forma subjetiva, de acordo com Mies Filho (1998), e aprovados os ejaculados com MP e vigor mínimos de 80,0% e 3,0, respectivamente. A seguir, realizou-se a formação do *pool* dos ejaculados antes da avaliação da concentração

espermática, obtida através da técnica de Câmara de Neubauer e os resultados expressos em bilhões de espermatozoides/mL, e da análise da morfologia espermática, realizada através da técnica de câmara úmida (Mies Filho, 1998).

Em seguida, as amostras de sêmen foram divididas em três alíquotas, sendo 0,5 mL para criopreservação, 1,0 mL para avaliação do perfil protéico das membranas dos espermatozoides e o restante do ejaculado foi utilizado para realização dos exames complementares, como integridade do acrossoma e do DNA espermático.

### 2.3.1 Integridade de acrossoma

Dez microlitros do sêmen *in natura* ou descongelado foram diluídos em 1,0 mL de Tris [3,605 g de Tris (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 1,488 g de Frutose, 2,024 g de Ácido cítrico, 100 mL de Água bidestilada; pH 6,8] e utilizados para confecção de esfregaços, os quais foram armazenados a 4 °C, protegidos da luz e analisados no prazo de duas semanas utilizando-se a técnica de coloração fluoresceína isothiocianato-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA; Sigma, Saint Louis, MO, USA), de acordo com Roth et al. (1998). No momento da análise, as lâminas foram coradas com 30 µL de solução de PNA (20 µL de PNA + 480 µL de PBS). Em seguida, as lâminas foram refrigeradas (4 °C) durante 20 minutos, imersas em 50,0 mL de solução salina tamponada (PBS) e colocadas dentro de caixa de isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5 µL da solução UCD [5,0 mg de Azida sódica; 0,5 mL de PBS, 0,1% (w/v) de Fenilenediamina (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 4,5 mL de Glicerol; pH 8,0] foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tokio, Japão), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), onde foram contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando a região acrossomal apresentava fluorescência verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam fluorescência verde na região equatorial da cabeça espermática.

### 2.3.2 Integridade de DNA

Amostras (10 µL) de sêmen *in natura* ou descongeladas foram armazenadas em 990 µL de uma solução TNE [0,1576 g de TRIS-HCl (0,01M), 0,877 g de NaCl (0,15M), 37,2 mg de EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1 mM), q.s.p. 100,0 mL; pH 7,4] a -196 °C para posterior avaliação da integridade de DNA espermático usando o corante Laranja de



Acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), segundo metodologia utilizada por Evenson et al. (2002). Alíquotas (100 µL) das amostras foram descongeladas a 37 °C e transferidas para tubos de microcentrífuga colocados em gelo, onde foram adicionados 200 µL da solução detergente [0,1 mL de Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, MO, USA), (0,1% v/v); 0,877 g de NaCl (0,15M); 8 mL de 1N HCl (0,08N)], e incubados durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 60 µL da solução de Laranja de Acridina [60 µL da solução B (1mg de Laranja de Acridina em 1 mL de água de miliQ) adicionada em 9940 µL da solução A [37,0 mL de 0,1M ácido cítrico; 63,0 mL de 0,2M de fosfato de sódio; 0,877 g de NaCl (0,15M) e 37,2 mg de EDTA (1 mM); pH 6,0]. Após homogeneização, 200 células foram avaliadas em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). As células coradas de verde fluorescente foram classificadas como portadoras de DNA íntegros, enquanto aquelas que emitiram fluorescência vermelha, laranja ou amarela foram classificadas como portadoras de DNA danificado.

#### *2.4 Criopreservação do sêmen*

Para criopreservação, as amostras de sêmen (0,5 mL) foram submetidas a duas lavagens em solução de Tris [3,605 g de Tris; 1,488 g de Frutose; 2,024 g de Ácido cítrico; 100,0 mL de Água bidestilada; pH 6,8), na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem], e centrifugadas a 2500 xg, durante 10 minutos. Após a segunda lavagem, diluiu-se o sedimento com solução à base de leite em pó desnatado acrescida de glicerol (7,0%), à temperatura ambiente, de acordo que cada dose inseminante contivesse aproximadamente  $150 \times 10^6$  espermatozoides por palheta (0,25 mL). A congelação foi realizada em máquina TK 3000 (TK Tecnologia em congelação, Uberaba ,MG, Brasil), na curva de congelação rápida (-0,25 °C/ min, de 25 °C a 5 °C, e a -20 °C/ min, de 5 °C a -120 °C) e, após atingir -120 °C, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Uma semana após a criopreservação, as amostras foram descongeladas à temperatura de 37 °C, durante 30 segundos, e avaliadas quanto a MP, vigor, integridade de acrossoma e DNA, assim como concentração de proteínas totais.

## 2.5 Dosagem das proteínas de membranas espermáticas

### 2.5.1 Extração de proteínas totais da membrana dos espermatozóides

Quatro palhetas de 0,25 mL foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos e, em seguida, colocadas em tubos de microcentrífuga (2,0 mL), onde o volume foi completado com solução de Tris-Cloreto (48 mg de Tris, 22 mg de CaCl<sub>2</sub>, 100 mL de água destilada; pH 7,4) e centrifugado a 300 xg, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (4 °C) para remoção completa do diluidor. Esta etapa foi repetida quatro vezes.

Após lavagem do sêmen, ao precipitado formado pelas células espermáticas foi adicionou-se 1,0 mL do tampão de extração de proteínas de membrana plasmática, composto de solução de Tris-Cloreto + 40 µL de Triton X100 (2,0%; Sigma, Saint Louis, MO, USA). O precipitado foi agitado em vortex por 5 minutos e centrifugado a 9300 xg, durante 15 minutos, sendo posteriormente utilizado para extração de proteínas. A este material foi adicionado 1,0 mL de Ácido tricloroacético (Sigma, Saint Louis, MO, USA) para cada 0,5 mL de sobrenadante, agitado em vortex e centrifugado a 9300 xg durante 15 minutos. O precipitado resultante foi lavado quatro vezes em 500 µL de acetona gelada (4 °C), e centrifugado a 9300 xg, durante 5 minutos. Após o tratamento, procedeu-se à secagem na temperatura ambiente, obtendo o extrato de proteínas totais dos espermatozóides (Berkelman e Stensted, 1998).

### 2.5.2 Dosagem das proteínas totais

As amostras de proteínas de membranas dos espermatozóides obtidos do sêmen *in natura* e descongelados foram submetidas à dosagem de proteína total para padronização da quantidade de proteínas a serem aplicadas no gel de eletroforese, através do método de Bradford (1976).

### 2.5.3 Eletroforese em duas dimensões (2-D) em gel de poliacrilamida

A focalização isoeétrica (FI) foi realizada segundo Stenstedt et al. (2002) utilizando fitas Immobiline Drystrips (7 cm; pH de 3-10; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), em duplicata para cada amostra analisada. Antes da FI, as fitas foram re-hidratadas por 15 horas a 28 °C em solução tampão contendo Uréia (9M; Chemical, TK, Japão), CHAPS {3-[(3cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato} a 2%, ditiotreitól (DTT a 1%), gradientes de pH imobilizados em

géis de poliacrilamida (IPG; pH 3-10), 2% e azul de bromofenol a 0,002%, contendo 60 µg de extrato protéico de membrana plasmática. Para máxima reprodutibilidade, as focalizações foram conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1 Vh, 200 Vh, 2800 Vh, e 3500 Vh, 4200 Vh e 3500 V por 3h e 30min (voltagem total aplicada  $\approx$  8,5 kVh), utilizando o sistema de eletroforese Multiphor II (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido).

A segunda dimensão em gel de poliacrilamida a 12,5% (2DE SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) foi conduzida em corrente constante de 15 mA por gel, utilizando o sistema vertical (BIO-RAD). Os géis foram corados com Comassie Brilhante Blue R-250 (Sigma, Saint Louis, MO, USA).

#### *2.5.5 Análise das imagens do gel*

As análises dos géis 2-D foram realizadas através do programa Image Máster™ (2-D Platinum software; Amersham Biociences, UK, England).

#### *2.6 Análise estatística*

O experimento foi analisado com um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 com 48 repetições. Para análise dos dados foram obtidas a média e o desvio padrão e utilizados os testes estatísticos: F (ANOVA) para dois fatores e para um fator com comparações de Tukey; teste t-Student com variâncias iguais ou desiguais; teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de estatística inferencial).

Ressalta-se que para vigor e os modelos em que a interação animal e período (Índice pluviométrico) se mostraram significante nas outras variáveis, a análise de um fator foi realizada fixando-se os níveis do outro fator. Para as variáveis em que a interação não foi significante foi testado o modelo com dois fatores sem interação e adotado este último modelo no caso em que diferenças significantes foram encontradas entre animais ou entre períodos (IP). A verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene. O nível de significância utilizado nas decisões de todos os testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados e analisados através do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) na versão 13.

### 3. Resultados

As avaliações das amostras de sêmen *in natura* demonstraram que o volume seminal (mL) no período BIP não apresentou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, ano e interação animal x ano. A concentração e o vigor espermático não apresentaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, ano e interação animal x ano, tanto no período BIP quanto no AIP, nos dois anos de avaliação (Figura 2 II,IV). A motilidade progressiva dos espermatozóides colhidos nos períodos BIP e AIP (Figura 2-III) não evidenciaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais. Todavia, foram constatadas diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os anos avaliados (2005 e 2006) nos dois períodos (BIP e AIP). O percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros diferiu ( $P<0,05$ ) apenas entre o ano avaliado (2005 e 2006) no período BIP, enquanto no período AIP não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, ano e interação animal x ano. A concentração de proteínas totais ( $\mu\text{g/mL}$ ) evidenciou diferença significativa ( $P<0,05$ ) apenas entre períodos (BIP e AIP), tendo sido realizado um *pool* das amostras de sêmen colhidas nos anos de 2005 e 2006. (Figura 2-VI)

A motilidade progressiva dos espermatozóides avaliados pós-descongelamento (Figura 3-I) de amostras de sêmen congeladas no período BIP não demonstrou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, assim como na interação animal x ano. Todavia, foi constatada diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre anos, com menor percentual de células com motilidade progressiva nas amostras descongeladas no ano de 2006 (2) quando comparadas ao ano de 2005 (1). A análise do vigor espermático das amostras de sêmen descongeladas não constatou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais e entre ano, tanto no período BIP quanto no AIP (Figura 3-II)

O percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros das amostras de sêmen descongeladas evidenciou diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre animais e ano de avaliação no período BIP. Todavia, no período AIP não se evidenciou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, anos de avaliação e na interação animal x ano de avaliação (Figura 3-III). Ao se analisar a média do percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros de amostras de sêmen *in natura* (Figura 2) com aquelas de amostras de sêmen descongeladas (Figura 3) constata-se que houve maior perda no percentual de células com acrossomas íntegros nas amostras de sêmen descongeladas

colhidas no período AIP nos anos de 2005 (1) e 2006 (2), do que no período BIP, nos dois anos avaliados (2005 e 2006).

A análise estatística da quantidade de proteínas totais ( $\mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ) das amostras de sêmen descongeladas (Figura 3-IV) não evidenciou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais, ano de avaliação e na interação animal x ano de avaliação, tendo sido realizado um *pool* das amostras de sêmen colhidas nos anos 2005 e 2006. Todavia, as concentrações de proteínas totais tanto no período BIP quanto no AIP foram mais elevadas nas amostras de sêmen *in natura* (Figura 2) do que nas amostras descongeladas (Figura 3) dos três reprodutores.

Os percentuais de espermatozoides com DNA íntegros não evidenciaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre animais e entre anos de avaliação, assim como na interação entre animal x ano de avaliação, uma vez que nas amostras de sêmen descongeladas as médias variaram de 99,67 a 100,00%.

O estudo da eletroforese bidimensional das proteínas de membrana plasmática dos espermatozoides (Tabela 1), realizado nas amostras de cada período (BIP e AIP), nos dois anos estudados (2005 e 2006), evidenciou valores de similaridade nas duplicatas de cada amostra avaliada de 83,56% no BIP1, 83,33% no BIP2, 81,16% no AIP1 e 81,69% no AIP2 (Figura 4). A análise das imagens, utilizando o software dos géis de 2D, detectou 165 *spots* de proteínas com pontos isoelétricos (pIs), que variaram de 3,37 a 8,80, enquanto as massas moleculares variaram de 9,0 kDa a 131 kDa. O estudo comparativo dos *spots* de proteínas comuns entre os períodos analisados demonstra a seguinte relação de similaridade entre as massas moleculares relativas das proteínas os géis avaliados nos dois períodos: BIP1 x BIP2 = 27,66%, AIP1 X BIP1 = 48,60%, AIP2 X BIP2 = 48,28% e AIP1 X AIP2= 63,16%.

#### 4. Discussão

A análise do sêmen *in natura* colhido de reprodutores caprinos criados no Município de Camocim de São Félix, região Agreste do Estado de Pernambuco, evidenciou que algumas características seminais sofreram alteração de acordo com o índice pluviométrico observado no período de colheita de sêmen, onde se constatou que no período BIP o volume seminal, a concentração e o vigor espermáticos não apresentaram alteração entre animais, anos de avaliação e interação animal x ano. Todavia, a motilidade espermática e o percentual de espermatozoides com acrossomas

íntegros diferiram entre os anos avaliados (2005 e 2006). As variações entre os diferentes parâmetros espermáticos podem ser explicadas pelo fato de que as colheitas de sêmen realizadas no período de BIP (janeiro de 2006 e novembro de 2006), meses em que o IP foi de 0 mm, comprometeu a oferta de água como também a qualidade da pastagem e do volumoso fornecido aos animais, gerando uma possível carência nutricional. Fato observado principalmente no período BIP2, pois nos meses que antecederam as colheitas de sêmen do período BIP1 ocorreram chuvas atípicas de verão (35 mm), preservando a qualidade das pastagens e do volumoso fornecido aos animais.

No período AIP, correspondendo aos meses de julho a agosto de 2005 e maio a junho de 2006, ocorreu distribuição de chuvas mais uniforme, apresentando índices pluviométricos de 210 e 137mm, respectivamente, valores próximos à média histórica da região para estes meses (175 mm e 143 mm, respectivamente). Ao se comparar a variação entre os anos de 2005 e 2006, constatou-se que houve variação entre reprodutores quanto a volume seminal, mas não foi evidenciada diferença em concentração e vigor espermáticos. Segundo Delgadillo e Chemineau (1992), redução na produção de plasma seminal e, conseqüentemente, menor volume do ejaculado, é ocasionado pelo bloqueio no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o qual é sensível às mudanças de estação do ano e do fotoperíodo, acarretando redução na estimulação das glândulas sexuais acessórias.

A adaptação dos animais à variação climática é de grande importância para a sua eficiência reprodutiva, apesar de não terem sido realizadas mensurações de temperatura corporal e ambiental para comprovar um possível estresse térmico nos animais durante o experimento. Sabe-se que o estresse provocado por elevadas temperaturas interfere no desempenho reprodutivo dos animais, através do eixo hipotálamo pituitária-gonadal, (River e Rivest, 1991) e, conseqüentemente, na função reprodutiva do macho (Nunes et al., 1997). Alguns parâmetros seminais observados no período BIP demonstraram que o aumento da temperatura pode alterar a qualidade seminal, principalmente o volume do ejaculado e a concentração espermática, mesmo sem diferirem estatisticamente. Ao estudar os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos criados no semi-árido paraibano, Silva et al. (2005) discordaram parcialmente de Machado e Simplício (1991), ao relatarem que, apesar dos caprinos mestiços F1 (Anglo-Nubiano x SRD) encontrarem-se bem adaptados às condições climáticas do Semi-Árido paraibano, a

concentração espermática é menor na época mais quente do ano, enquanto a MP e o vigor não sofrem alterações, sem relatarem alteração no volume seminal.

Na avaliação da viabilidade das doses de sêmen submetidas à congelação, constatou-se, quando a colheita e a congelação de sêmen foram realizadas no período BIP do ano de 2006 (2), menor percentual de espermatozóides com motilidade progressiva após a descongelação, quando comparadas ao ano de 2005 (1). Além de que o percentual de células com acrossomas íntegros destas amostras de sêmen variou entre animais e anos de colheita de sêmen. Estes resultados podem ser explicados pela ocorrência de pequena quantidade de chuvas (Figura 1) verificada nos meses de novembro e dezembro de 2005, meses anteriores à colheita de sêmen do período BIP1, o que não foi constatado em setembro e outubro de 2006, onde não se observou ocorrência de chuvas, meses que antecederam às colheitas de sêmen do período BIP2. Apesar do vigor espermático não ter evidenciado diferença entre estes períodos.

O período AIP não determinou diferença na motilidade progressiva dos espermatozóides, quando se comparou os dois anos de avaliação (2005 e 2006), apesar de haver sido constatada variação entre os reprodutores utilizados. O vigor espermático e o percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros não diferiram entre animais e anos de avaliação, apesar de que no ano de 2005 houve ocorrência de chuvas nos meses que antecederam àqueles da colheita de sêmen, diferindo do observado no ano de 2006. Todavia, observou-se maior perda no percentual de espermatozóides com acrossomas íntegros nas amostras de sêmen colhidas e congeladas neste período AIP (23,42%), nos anos de 2005 e 2006, do que no período BIP (12,24%), nos dois anos avaliados. O aumento de acrossomas defeituosos no AIP pode ser explicado, em geral, pela fase das mudanças da composição de lipídeos e proteínas de membrana observado no processo de criopreservação, que são produzidas durante o choque térmico e a congelação, processo que desestabilizam as membranas (WATSON, 2000).

O número de gametas com acrossomas íntegros observados nas amostras de sêmen *in natura* no período BIP1 foi inferior aos demais períodos analisados, diferindo dos percentuais observados nas doses descongeladas, onde os menores percentuais foram observados no período BIP2, fato que pode ser justificado pela lavagem do sêmen antes da criopreservação, separando os gametas danificados daqueles íntegros (dados não publicados). Em carneiros, Alessandro et al. (2003) relataram que, no sul da Itália, o percentual de espermatozóides com acrossomas danificados no sêmen *in natura* é

menor no período reprodutivo (65,00%) do que no não reprodutivo (77,00%), e os valores de MP e vigor não apresentam alteração durante o ano. Além de a variação sazonal determinar maior instabilidade na célula espermática, o processo de criopreservação também interfere na integridade do acrossoma, decorrente da instabilidade na membrana espermática semelhante àquela observada durante o processo de capacitação (Maxwell e Watson, 1996). Esta instabilidade da membrana plasmática do espermatozóide aumenta a sua permeabilidade, determinando perda de moléculas e íons intracelulares ou adsorção de componentes do meio diluidor (Barbosa et al., 1999). Lesões nas membranas plasmáticas ocasionadas pelo processo de congelamento e descongelamento determinam formação de cristais de gelo no interior da célula (Mies Filho, 1986). Em decorrência disto, a avaliação da integridade de membrana após a descongelamento é de suma importância para estudar os danos causados pela criopreservação, uma vez que esta pode ser considerada um indicador indireto da viabilidade espermática (Magistrini et al., 1997).

Tulli e Holtz (1995) afirmaram que volume, concentração, motilidade progressiva e vigor espermáticos de caprinos Boer criados em clima temperado (Alemanha) sofrem alterações na estação não-reprodutiva. Os resultados observados neste experimento corroboram com aqueles obtidos pelos autores citados, em relação às doses de sêmen descongeladas, onde se verificou que a MP das amostras colhidas no período de AIP foram superiores àquelas realizadas no período BIP, corroborando com Machado e Simplício (1991), ao afirmarem que o período AIP é o mais indicado para colheita e criopreservação de sêmen nesta região.

A concentração de proteínas totais diferiu entre os períodos, sendo maior no AIP (74,90  $\mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ) do que no BIP (46,93  $\mu\text{g}/0,25\text{mL}$ ). Uma vez que as proteínas participam como potencializadoras da motilidade e estimuladoras da reação acrossômica, fatores essenciais à fecundação *in vivo* e *in vitro* (Bellin et al., 1994). Segundo Kjaestad et al. (1993) e Januskauskas et al. (2000), existe correlação entre MP e integridade de acrossoma com os índices de fertilidade, apesar de atualmente serem utilizadas técnicas de avaliação espermática mais sofisticadas como análise computadorizada da MP e uso de sondas fluorescentes para análise da integridade do acrossoma. No entanto, reprodutores com características seminais semelhantes podem apresentar diferença entre 20 e 25% nos seus índices de fertilidade. Devido a este fato, a busca de novos marcadores deve ser estimulada para comprovar a fertilidade de um



reprodutor (Lunault e Kiliam, 1996; Larson e Miller, 2000), justificando a realização de estudos que avaliem a natureza protéica das membranas plasmáticas dos espermatozoides submetidos à criopreservação.

Durante o ano ocorrem alterações nas concentrações de gonadotrofinas que afetam a função endócrina e as secreções das glândulas vesiculares e do epidídimo, assim como os constituintes do plasma seminal, alterando a concentração de proteínas (Smith et al., 1999). Santos (2005), ao estudar o perfil eletroforético (SDS-PAGE 2D) das proteínas presentes na membrana espermática do sêmen congelado de caprinos, revelou a presença de peptídeos com massa molecular de 5,7 a 26,8 kDa e proteínas de 31,3 a 65,4 kDa. Esta classificação não foi a mesma utilizada neste experimento, pois seguindo a classificação descrita por Nelson e Cox (2002), peptídeos possuem massa molecular de até 10 kDa.

Os peptídeos que apresentam massas moleculares de 8,4 a 10,3 kDa são correlacionados com MP de 70,00 a 80,00% no sêmen *in natura* (Lima Dias, 2002). Todavia, Santos et al. (2007), ao identificarem esses peptídeos no sêmen congelado, sugeriram que os mesmos são responsáveis pela redução da MP dos espermatozoides. Neste estudo, constatou-se a presença destas proteínas de baixa massa molecular relativa (<14 kDa e pIs de 3,55 a 8,48) nos períodos AIP1, API2 e BIP1 no sêmen descongelado com valores médios de MP pós-descongelação (69,16%; 77,5%; 66,39%), respectivamente. No período de BIP2, à presença de um número reduzido de proteínas, principalmente as de baixa massa molecular relativa, possa ter interferido na MP deste período com média de 53,61% pós-descongelação. No entanto, uma vez que não foram realizados testes *in vivo* não se pode confirmar que estas interfiram na fertilidade dos caprinos.

A proteína de massa molecular relativa de 20 kDa (4,76 a 6,66 pI) esteve presente em 100% das amostras analisadas e a de 24 kDa (7,2 pI) foi identificada apenas no período BIP1. Segundo Wempe (1991), estas proteínas são secretadas pelas glândulas vesiculares e classificadas como proteínas básicas do plasma seminal, as quais, de acordo com Katska et al. (1996), ligam-se às proteínas de membrana dos espermatozoides e provocam alterações bioquímicas aumentando a permeabilidade da membrana, injúria celular e choque térmico durante a congelação, reduzindo a energia dos espermatozoides e a homogeneidade da população espermática (Bailey et al., 2000).

A capacitação espermática determina mudanças fisiológicas que proporcionam aos espermatozoides competência para a fertilização, onde as proteínas possuem um papel importante na fusão do espermatozoide com o oócito (Yanagimachi, 1994; Frazer et al., 1996; Flesch e Gadella, 2000). Algumas proteínas estão presentes no acrossoma e são removidas ou sofrem alteração durante o processo de capacitação, incluindo as chamadas proteínas decapacitantes, conhecidas como caltrinas, que possuem massa molecular de 5 a 10 kDa (Yanagimachi, 1994) ou de 12, 14, 26, 32, 38 e 41 kDa (Frazer et al., 1996), presentes no sêmen congelado de bovino. Outras proteínas produzidas no epidídimo atuam na estabilização acrossomal e possuem massa molecular de 125 a 259 kDa (Yanagimachi, 1994). Durante os períodos de avaliação deste experimento constatou-se a presença das seguintes proteínas com massas moleculares relativas: 14 e 41 kDa nos períodos AIP1, BIP1 e AIP2, assim como de 14 kDa no período BIP2. Além de que foram observadas proteínas similares ou menores que 14 kDa em todos os períodos estudados. O período AIP1 apresentou uma particularidade, quando comparado aos demais períodos analisados, devido à presença de proteínas com massa molecular acima de 94 kDa e ponto isoelétrico variando de 5,94 a 6,61 pI. Apesar das massas moleculares encontradas serem sugestivas, não se pode afirmar que algumas dessas proteínas podem ser uma caltrina ou proteínas estabilizadoras de acrossoma, uma vez que não se realizou a análise da estrutura protéica, muito embora as massas moleculares relativas a elas se enquadrem no grupo relatado.

Vale ressaltar que a ausência da proteína de massa molecular de 66 kDa imuno identificada como albumina (Oberst et al., 2002), é indicativo que os animais utilizados neste experimento possuíam espermiogênese normal, uma vez que conforme relato de Rocha (1974), a presença desta proteína está relacionada a alterações espermáticas ocasionadas por hipoplasia testicular, banda protéica de 66 kDa

## **5. Conclusão**

Com base nos resultados de motilidade e integridade de acrossoma das células espermáticas obtidos após o processo de congelação, e da presença de proteínas extraídas de membranas de espermatozoides caprinos através da análise da eletroforese bidimensional de membranas de espermatozoides caprinos colhidos em períodos de alto e baixo índices pluviométricos, conclui-se que proteínas de baixa massa molecular (<14k Da) são responsáveis pela preservação das características espermáticas em doses

de sêmen descongeladas e que a criopreservação do sêmen deve ser realizada nos períodos de maior índice pluviométrico.

## **6. Referências Bibliográficas**

- Alessandro, A.G.D., Martemucci, G., 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 93–102.
- Barbosa, L.P., Guimarães, J.D., Espeschidt, C.J.B., 1999. Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programa de inseminação artificial em cabras alpinas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 23 (3), 283-285.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J-F., Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21, 1-7.
- Bellin, M.E., Hawkins, H.E., AX. R.L., 1994. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.* 72, 2441-2448.
- Berkelma, T., Stensted, T., 1998. Handbook. 2-D eletrophoresis: using immobilized pH gradients, principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA.
- Jerrold H.Z., 1999. *Biostatistical Analysis*. Four Edition, New Jersey: Prentice Hall. 929 p.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Calvette, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., Topfer-Petersen, E., 1997. Isolation and characterization of heparin and phosphoreylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine Pbi. *FEBS Lett.* 407, 201-206.
- Carneiro, G. F., 2002. Transporte e Criopreservação de Semen Equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 5, 37-41.
- Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., Manjunath, P., 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 313-318.
- Cooper, T.G., 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 119-136.

- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum. Res.* 9, 47-59.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469, 197-235.
- Frazer, G.S., Bucci, D.M., Brooks, C.L., 1996. Electrophoresis do gel de polyacrylamide de two-dimensional do semen de bovídeos após cryopreservation em meias palhas do mililitro. *Theriogenology* 46, 103-115.
- Gerena, R.L., Irikura, D., Eguchi, N., Urade, Y., Killian, G.J., 2000. Immunocytochemical localization of lipocalintype prostaglandin d synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. *Biol. Reprod.* 62, 547-556
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy bulls. *Theriogenology* 53, 859-875.
- Katska, L., Rynska, B., Smorag, Z., 1996. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 23-31.
- Killian, G.J., Chapman, D.A., Rogowski, L.A., 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49, 1202-1207.
- La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, B.A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins *Theriogenology* 57, 1035-1048.
- Lima Dias, A., 2002. Estudos morfofisiológicos de componentes protéicos para caracterizar diferenças entre espermatozóides do ejaculado e epidídimo, em bovinos. 82p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Machado, R., Simplicio, A.A., 1991. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados na região semi-árida. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, p. 433.
- Magistrini, M., Palmer, C., 1987. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 127-133.
- Mattos, R.C., Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbergo, C.G., Wald, V.B., Horn, A.P., Mattos, A.L.G., 2004. BSP A1/A2: a seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION Proceedings... , p. 462.

Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 55-65.

Mies Filho, A. *Reprodução Animal*. 6 ed, Porto Alegre: Sulina, 1987, v.2,750 p.

Mies Filho, A., Jobim, M.I.M., Endler, J.O., Ward, V.B., Duarte, M.M.B., Souza, J.A.C., Martins, S.C.R., 1986. Estudo sobre inseminação artificial com sêmen congelado em ovinos no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 10 (4), 235-245.

Miller, D.J., Winer, M.A., Ax, R.L., 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* 42, 899-915.

Moura, A.A, Koc, H., Chapman, D.A., Killian, G.J., 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *J. Androl.*, 27, 2, 201-211.

Nelson, D.L., Cox, M.M., 2002. *Lehninger Princípios de bioquímica*. 3.edição. Sarvier, São Paulo

Nunes, J.F., Ciríaco, A.L.T., Suassuna, U., 1997. *Produção e reprodução de ovinos e caprinos*. 2.edição, Gráfica LCR. Fortaleza.

*Practical Statistics for Medical Research*, Douglas G. Altman, Chapman and Hall, Great Britain, London, 1991, 611 p.

Oberst, E.R., Jobim, M.I.M., Cimarosti, H.I., Souza, D.O., Salbego, C.G., Wald, V.B., Mattos, R.C., 2002. Imunoidentification of Albumin and Osteopontin in Seminal Plasma of Taurine and Zebuine Bulls. *Ciê. Agrá.*, 23, 1, 21-28.

River, C., Rivest, S., 1991. Effect of stress of the activity of the hypothalamic-pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.* 45, 523-532.

Rocha, M.C., Garcia, O. S., Ferreira Neto, J.M., 1974. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebus com alterações reprodutivas. *Arq. Esc. Vet. da UFMG* 26 (2), 223-233.

Roncoletta, M., 1999. Perfil em SDS-PAGE das proteínas de plasma seminal e membrana de espermatozoides e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores de sêmen. 110f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

Roncoletta, M., Morani, E.S.C., Franceschini, P.H., 2002. seminal plasma protein identification and it relation with bull semen freezability. *Theriogenology* 57 (1), 479.

- Roth, T.L., Weiss, R.B., Buff, L.M., Wilt, D.E., Bush, M., 1998. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biol. Reprod.* 58, 475-482.
- Santos, D.O., Silva, A.E.D.F., Simplicio, A.A., Vasconcelos, E.A.R., Campos, F.A.P. Eletroforese bidimensional da membrana plasmática de espermatozoides caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, Paraná. Anais... 17, 2007. p. 157-157.
- Santos, D.O., 2005. Estudo do perfil protéico nas membranas de espermatozoides congelados de caprinos. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -UNESP-Botucatu-SP,62p
- Silva, G.A., Souza, B.B., Peña Alfaro, C., Azevedo, S.A., Azevedo Neto, J., Silva, E.M.N., Kariston, A., 2005. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. *Agropecu. Cient. no Semi-árido* 1, 7-14.
- Silva, C.L.S.P., 2002. Two Dimensional Electrophoresis: Principles and Applications. *Ciê. Agr. Saúde. FEA*, 2, (1), 74 – 78.
- Smith, J.F, Parr, J. Murray, G.R.M, Mcdonald, R.M, Lee, R.S.F., 1999. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. In: Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 59, 223–225.
- Stenstedt, T.B., Bjellqvist, B., Laird, N. 2-D Electrophoresis-Principles and methods (Manual), 2002.
- Tuli, R.K., Holtz, W., 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen, in the Northern temperatezone. *Theriogenology*, 43, 1359-1363.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Anim. Reprod.Sci.*, v.60(1),481- 492.
- Wempe, F., Henschen A., Scheit K.H., 1991. Gene expression and cDNA cloning identified a major basic proteinconstituent of bovine seminal plasma as bovine monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1). *DNA Cell Biol*, 10, 671-679.
- Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. 1994. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds) *The physiology of the reproduction*. 2.edição. Raven Press, New York.

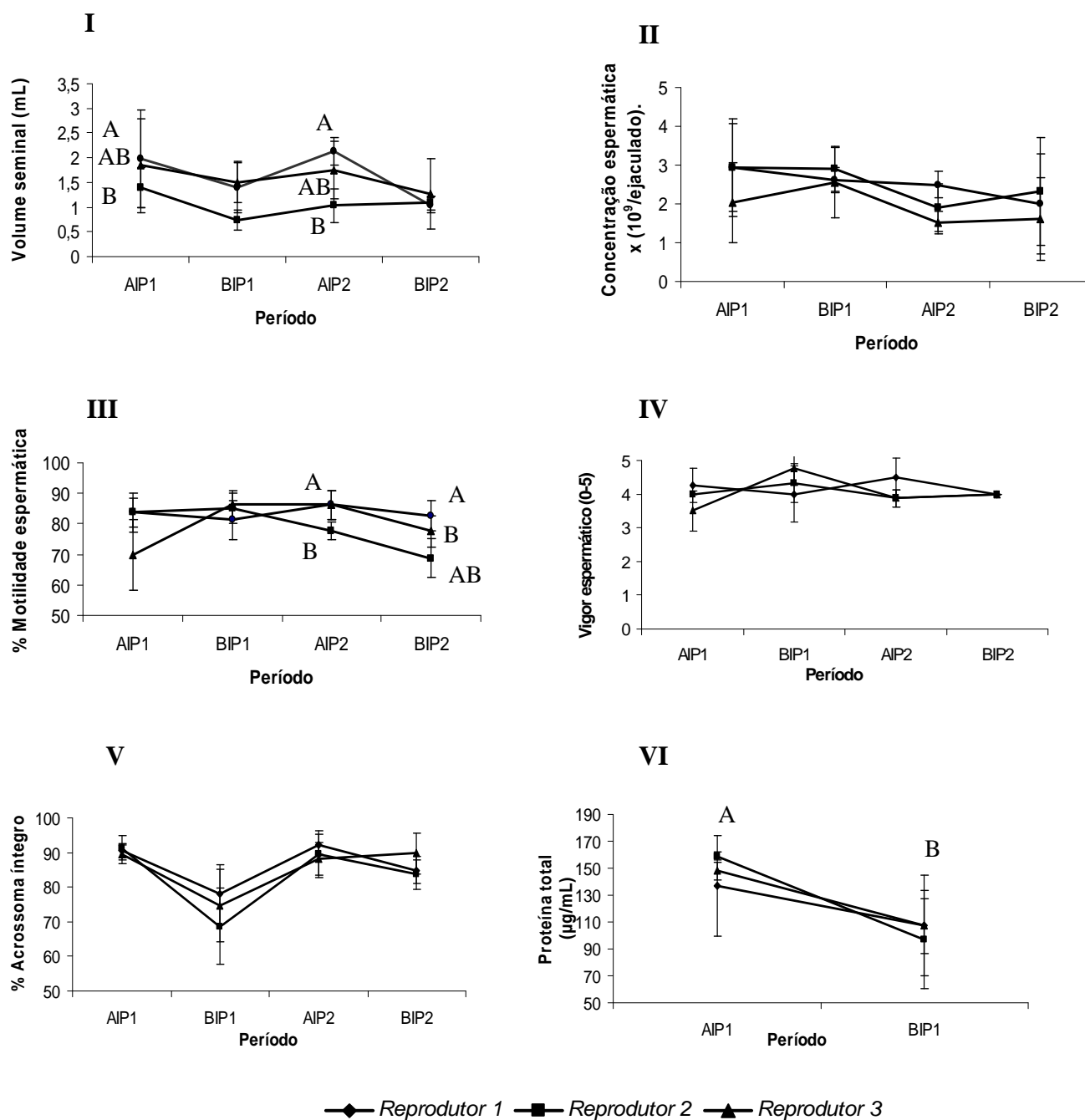


Figura 2

Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen *in natura* dos reprodutores caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico. I) Volume seminal (mL); II) Concentração espermática x (10<sup>9</sup>/ejaculado); III) Motilidade espermática(%); IV) Vigor espermático (0-5); V) Acrossoma íntegro (%); VI) Proteína total (µg/mL). Letras maiúsculas indicam diferença significativa (P<0,05) entre períodos AIP e BIP.

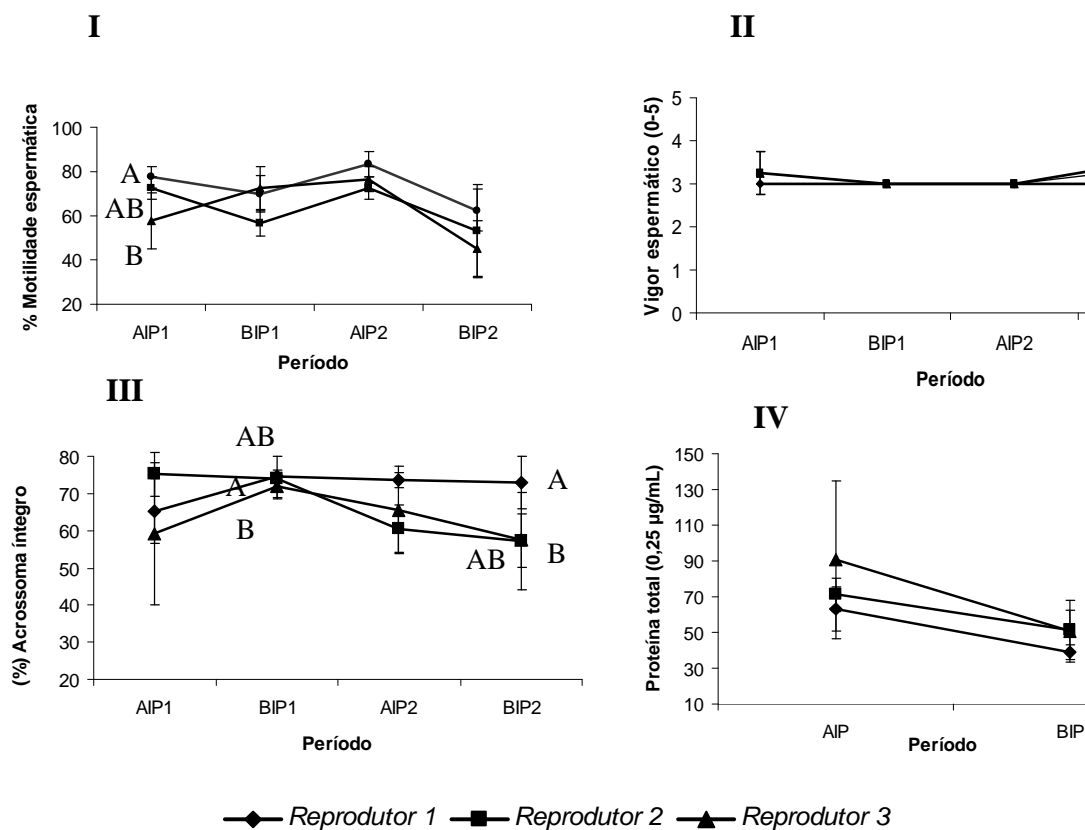


Figura 3

Média e desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen descongelado dos reprodutores caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico. I) Motilidade espermática(%); II) Vigor espermático (0-5); III) Acrossoma íntegro (%); IV) Proteína total (µg/mL). Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre períodos AIP e BIP.



Tabela 1

Proteínas da membrana plasmática de espermatozóides descongelados de caprinos da raça Alpina Americana criados no Município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do Estado de Pernambuco, nas épocas de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico dos anos de 2005 (1) e 2006 (2), de acordo com a massa molecular (MM) e o ponto isoelétrico (pIs)

Períodos							
AIP1		AIP2		BIP1		BIP2	
MW kDa	pI	MW kDa	pI	MW kDa	pI	MW kDa	pI
>90	6,61-5,18	90	5,79-5,99	72	4,89-6,02	87	5,89
85	7,62	82	5,47	70	6,23	86	6,00
80	6,32	81	5,21-5,35	62	5,36-5,46	70	5,61-5,07
65	4,02	72	5,18-5,78	58	4,70	69	5,90
53	4,70	71	5,57	57	5,60-6,14	69	4,82
54	3,71	58	6,65	51	6,37	68	5,30
48	5,73	51	7,67	50	5,31-6,53	65	3,92-5,28
46	4,71-5,45	50	3,46	49	7,90	61	5,47
45	4,50-5,13	49	5,08	48	6,59	58	3,95
43	6,26	48	5,69	47	6,36	55	6,66
41	6,04	46	3,74	45	6,73-7,41	49	7,63
42	5,71	45	4,92	41	5,50-5,66	40	4,52
29	7,95	42	5,32	40	6,43	37	4,70
23	3,65	44	4,12	39	7,65	28	6,47
21	4,51	41	5,16-5,88	38	8,80	20	4,76
20	6,33	40	5,63	37	7,53	14	4,66
18	6,32	33	4,16-4,72	36	6,33		
16	6,04-6,47	27	4,50-5,85	34	8,68-8,95		
14	4,72-5,33	26	6,12-6,38	32	5,17		
14>	3,37-6,98	20	6,66	28	4,26-7,97		
		19	4,81-7,94	27	4,33		
		18	6,43	26	6,66		
		16	3,80	25	3,82-5,24		
		14	4,75-5,58	24	7,22		
				23	4,54-6,31		
				22	3,82-5,88		
				21	5,66-5,39		
				20	5,83-7,95		
				19	6,15-7,06		
				18	6,80		
				17	6,25		
				16	4,12-8,17		
				14>	3,55-9,79		

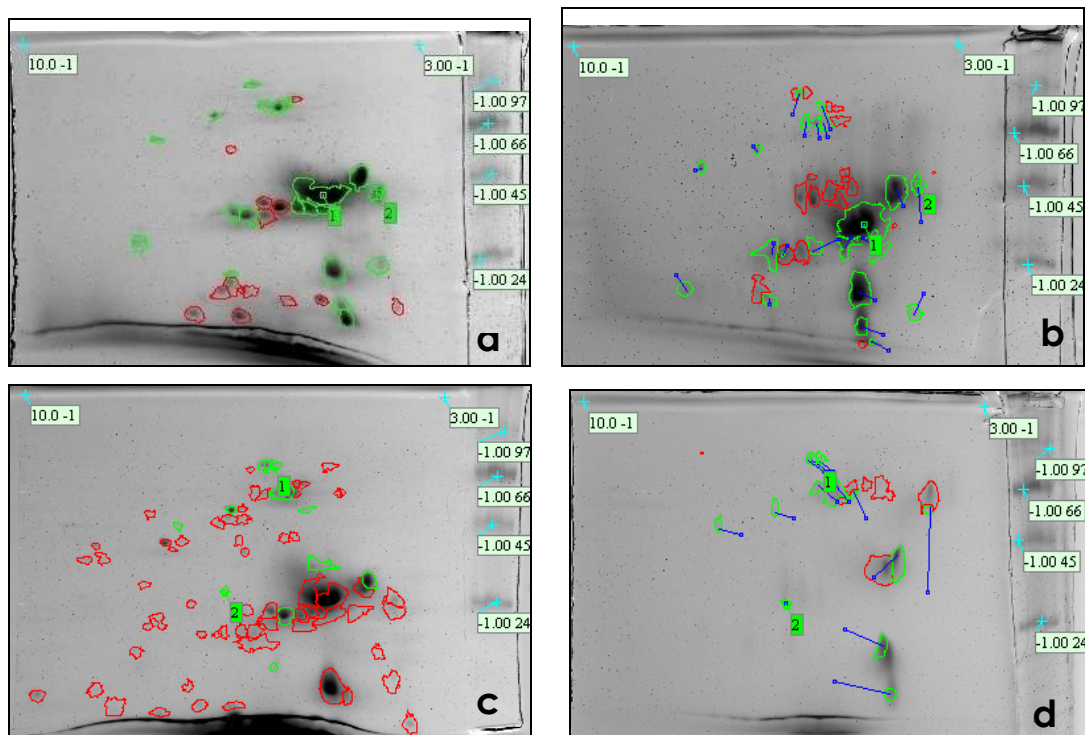


Figura 3

Eletroforese bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides descongelados de caprinos da raça Alpina Americana criados no município de Camocim de São Felix, pertencente à Região Agreste do estado de Pernambuco, nos períodos de a)AIP 1 ; b) AIP2; c)BIP1,; d) BIP2, em gel de poliacrilamida (12,5%) . Valores aproximados da massa molecular indicado à direita e pH indicados na borda superior do gel. Spots marcados de verde são similares e de vermelho são diferentes.

