

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

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEÍNAS  
RELACIONADAS À CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN  
CAPRINO**

**MARIA LUANE DA SILVA BARROSO**

**SOBRAL - CE**

**JULHO 2018**

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

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEÍNAS**  
**RELACIONADAS À CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN**  
**CAPRINO**

**MARIA LUANE DA SILVA BARROSO**

**SOBRAL-CE**  
**JULHO 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Barroso, Maria Luane da Silva

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEÍNAS RELACIONADAS  
À CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO [recurso eletrônico] /  
Maria Luane da Silva Barroso. -- Sobral, 2018.

1 CD-ROM: il. ; 4 <sup>3</sup>/<sub>4</sub> pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho  
acadêmico com 67 folhas.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela Maria Xavier Eloy.

Co-Orientação: Prof. Dr. Kleibe de Moraes Silva.

Dissertação (Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do  
Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. Eletroforese bidimensional . 2. Saanen. 3. Congelação. 4.  
Plasma seminal. I. Título.

MARIA LUANE DA SILVA BARROSO

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À  
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

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

Área de Concentração: Reprodução Animal

**ORIENTADOR:**

**PROF. DRA. ANGELA MARIA XAVIER ELOY**

**CO-ORIENTADOR:**

**PROF. DR. KLEIBE DE MORAES SILVA**

**SOBRAL - CE  
JULHO - 2018**

MARIA LUANE DA SILVA BARROSO

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE PROTEÍNAS RELACIONADAS  
À CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

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

Examinadora:

---

DR. KLEIBE DE MORAES SILVA  
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS  
PESQUISADOR

---

DR. (A) ALINE VIEIRA LANDIM  
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ  
PROFESSORA

---

DR. (A) KELMA COSTA DE SOUZA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ  
PROFESSORA

---

PROF. DRA. ANGELA MARIA XAVIER ELOY  
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ  
ZOOTECNIA  
PRESIDENTE

SOBRAL – CE  
JULHO – 2018

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus e Pai por todas as bênçãos, pelo seu perdão, amor, misericórdia e pela felicidade, pois os momentos ruins que tive na vida foi por estupidez e escolha minha, porém sei que a Sua graça se fez e faz presente em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Xavier Eloy pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade, suas correções e apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Kleibe de Moraes Silva pela co-orientação e por participar da minha banca.

A Dr<sup>a</sup>. Kelma Costa de Souza, por aceitar prontamente o convite e pela valiosa contribuição na correção deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup>. Aline Vieira Landim, por aceitar o convite para participar da minha banca.

Ao Dr. Diones Oliveira dos Santos pelos ensinamentos profissionais e de vida que me foram transmitidos.

Ao Dr. Raimundo Nonato Braga Lobo pelo enorme apoio com a estatística do trabalho.

A minha irmã Luana pelo apoio de sempre, por aguentar meu estresse e meus ataques de nervos com toda paciência do mundo, pela sua alegria, amizade, amor e apoio e dedicação durante a construção desse trabalho.

A minha querida mamãe por não medir esforços para minha formação pessoal e intelectual, e por me amar incondicionalmente.

Ao José Nobrega Medeiros, João Ricardo Furtado e Adriano Rodrigues Lima pelo enorme apoio e dedicação durante a construção desse trabalho.

Ao Wilson pelos ensinamentos práticos e teóricos no laboratório de sêmen, sempre com paciência e incentivo durante esses meses.

Ao Marcimar pela enorme ajuda com as análises no sistema CASA.

A minha querida amiga Carlinha pelo enorme apoio e dedicação durante a construção desse trabalho.

Aos meus amigos da Embrapa Danisvânia, Kelry e Pedro pela amizade, dedicação, e apoio durante a construção desse trabalho.

As minhas amigas de república Maria Tereza, Myrian e Tamyres pela relevante ajuda, convívio, companheirismo, apoio e acima de tudo pela amizade.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e incentivaram.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú, ao corpo docente, direção e administração do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela atenção e pelos conhecimentos transmitidos, os quais contribuíram para a minha formação profissional.

A todos os meus professores da pós-graduação que me proporcionaram base, conhecimento e formação profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos e irmãos da igreja que sempre me apoiaram com suas orações e amizade.

A Embrapa Caprinos e Ovinos pelo uso de seus animais, instalações, recepção e acolhimento durante a realização desse projeto.

E a todos que, de uma forma direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A falta de paciência de hoje, será a saudade de amanhã”

Frederico Elboni

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
RESUMO GERAL.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	XV
CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
Referências Bibliográficas.....	25
CAPÍTULO 2 – PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL LIGADAS AO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN .....	33
Resumo.....	34
Abstract.....	36
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	39
Resultados e Discussão.....	42
Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**μL**- Microlitro

**1DE**- Eletroforese unidimensional

**2DE** – Eletroforese bidimensional

**aSFP**- Proteína ácida do fluido seminal bovino

**BSPs**- Binder Sperm Proteins – Proteínas de ligação ao espermatozoide

**°C**- Graus Celsius

**CASA**- Sistema de Análise de Sêmen Auxiliado Computador

**CBRA**- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

**CBB**- Comassie Brilliant Blue

**CE**- Concentração espermática

**ERO's**- Espécies Reativas de Oxigênio

**IA**- Inseminação Artificial

**IP**- Intervalo entre partos

**kDa** - QuiloDalton

**mL**- Mililitro

**MOT**- motilidade total

**MOP**- motilidade progressiva

**Min**- Minuto

**MW**- Massa Molecular

**NRC**- National Research Council

**PAGE**- Eletroforese em gel de poliacrilamida

**pH**- Potencial Hidrogeniônico

**pI**- Ponto isoelétrico

**SDS**- Dodecil Sulfato de Sódio

**SDS/PAGE**- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**VIG**- Vigor

**VAP**- média velocidade de percurso

**VSL**- velocidade linear

**VCL**- velocidade curvilínea

**VE**- Volume do ejaculado

**RA**- Reação Acrossômica

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1-</b> Valores médios e desvio padrão para volume e concentração espermática; e valor individual do perímetro escrotal e do aspecto do sêmen fresco dos reprodutores Saanen.....	43
<b>Tabela 2-</b> Avaliação da motilidade e do vigor espermático do sêmen fresco e pós-descongelado analisado em microscopia óptica dos reprodutores da raça Saanen.....	45
<b>Tabela 3-</b> Médias da motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP), velocidade curvilinear (VCL), velocidade progressiva (VSL) e velocidade média de trajeto (VAP) analisados pelo sistema computadorizado CASA no sêmen de caprinos Saanen pós descongelado.....	47
<b>Tabela 4-</b> Prováveis proteínas ( <i>spot's</i> ) presentes no sêmen dos animais da raça Saanen com seus pontos isoeletricos (pI), massa molecular (MW), frequência das proteínas e suas respectivas funções.....	53

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Reprodutor caprino da raça Saanen.....17  
**Figura 2-** Fêmea caprina da raça Saanen.....17

### CAPÍTULO 2

- Figura 1-** Eletroforese em gel de poliacrilamida (2DE) apresentando seus respectivos *spot's* proteicos. ....51

## RESUMO GERAL

As proteínas são moléculas formadas por cadeias de aminoácidos e desempenham importantes funções na reprodução e no processo de criopreservação do sêmen. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de reprodutores caprinos da raça Saanen. Para tanto, seis reprodutores caprinos da raça Saanen foram usados para as coletas de sêmen através de vagina artificial. As análises de volume, concentração espermática, aspecto, motilidade e vigor foram avaliadas antes e depois da congelação. Para obtenção do plasma seminal, o sêmen fresco foi centrifugado a 10000x g durante 15 minutos à temperatura de 4° C, e posteriormente realizada a eletroforese bidimensional (2DE). Os géis foram escarneados e analisados usando-se o *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*. A congelação do sêmen foi realizada através da máquina TK3000 usando como solução diluidora o Tolera-D®. O sêmen foi submetido a duas avaliações pós-descongelação, sendo a primeira em uma semana e a segunda aos cinco meses. Para as análises espermáticas utilizou-se tanto a microscopia óptica como o sistema CASA, nas duas avaliações, respectivamente. Para os parâmetros concentração e volume do sêmen fresco, aplicou-se o teste F, através da análise de variância. Nos dados das avaliações espermáticas do sêmen fresco e pós-descongelado, foram utilizadas análises de variância, seguido de teste Bonferroni. A motilidade do sêmen fresco oscilou de 80% a 90% e o vigor de 3,67 a 4,6. No sêmen pós-descongelado a motilidade variou de 49% a 62% e o vigor de 2,80 a 3,0, sendo que um animal apresentou baixa motilidade (13,33%) e vigor (1,0). Os principais *spot's* específicos ligados à reprodução apresentaram peso molecular variando de 12 kDa a 66 kDa e pI de 4,37 a 9,57. Os resultados dos géis demonstraram que os ejaculados dos reprodutores se assemelharam entre si no perfil proteico bidimensional do plasma seminal, além de se observar nos animais a presença de *spot's* específicos ligados à reprodução, em funções como: espermatogênese, maturação espermática, motilidade espermática, reação acrossômica, diferenciação de células germinativas espermatogênicas, entre outras. O perfil proteômico do plasma seminal encontrado evidenciaram as seguintes proteínas: ASZ1, RNS10, INHBA, OSTP, ALBU, PTGDS, SRY, STX1B, LEP, LSHB, DHSO, BRS3, PRND e CIB1. Provavelmente algumas dessas proteínas estão relacionadas com a qualidade do sêmen caprino criopreservado. As possíveis proteínas são prostaglandina-H2, albumina, leptina, SRY, STX1B e FSHB.

Palavras-chave: Eletroforese 2DE; Criopreservação; Plasma Seminal

## GENERAL ABSTRACT

Proteins are molecules formed by chains of amino acids and play important roles in the reproduction and the process of cryopreservation of semen. The objective of this work was to characterize the protein profile of the seminal plasma of Saanen goat breeders. For this purpose, six goat breeders of the Saanen breed were used to collect semen through an artificial vagina. Analyzes of volume, sperm concentration, appearance, motility and vigor were evaluated before and after freezing. To obtain the seminal plasma, the fresh semen was centrifuged at 10000xg for 15 minutes at 4° C, and afterwards the two-dimensional electrophoresis (2DE) was performed. The gels were scanned and analyzed using the ImageMaster 2D Platinum 7.0 Software. Freezing of the semen was performed using the TK3000 machine using Tolera-D® as a dilution solution. The semen was submitted to two post-thaw evaluations, the first being in one week and the second to five months. For the spermatoc analyzes, both the optical microscopy and the CASA system were used in the two evaluations, respectively. For the concentration and volume parameters of fresh semen, the F test was applied through analysis of variance. In the data of sperm evaluations of fresh and post-thawed semen, analyzes of variance were used, followed by Bonferroni test. The motility of fresh semen ranged from 80% to 90% and vigor from 3.67 to 4.6. In post-thawed semen the motility ranged from 49% to 62% and vigor from 2.80 to 3.0, and one animal had low motility (13.33%) and vigor (1.0). The main specific spots linked to reproduction had molecular weight ranging from 12 kDa to 66 kDa and pI from 4.37 to 9.57. The results of the gels demonstrated that the ejaculates of the reproducers resembled each other in the two-dimensional protein profile of the seminal plasma. In addition, the presence of specific spots associated with reproduction were observed in the animals, such as: spermatogenesis, sperm maturation, sperm motility, reaction spermatogenic germ cell differentiation, among others. The proteomic profile of the seminal plasma found evidenced the following proteins: ASZ1, RNS10, INHBA, OSTP, ALBU, PTGDS, SRY, STX1B, LEP, LSHB, DHSO, BRS3, PRND and CIB1. Probably some of these proteins are related to the quality of cryopreserved goat semen. Possible proteins are prostaglandin-H2, albumin, leptin, SRY, STX1B and FSHB.

Keywords: Electrophoresis 2 DE; Cryopreservation; Seminal Plasma

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A técnica de criopreservação do sêmen permite a conservação de material genético de alta qualidade por longo período, estando avançada em várias espécies e executada nas explorações mais tecnificadas. Esta técnica contribui para a adoção de programas de melhoramento genético e na aplicação de biotécnicas da reprodução.

Em virtude do progresso das pesquisas sobre marcadores proteicos relacionados a congelamento do sêmen em bovinos, suínos e ovinos, e a escassez de estudos em caprinos, faz-se necessário o conhecimento da proteômica do sêmen caprino relacionado à resistência durante o processo de criopreservação. Esta identificação proporcionará elementos para aprofundar o conhecimento sobre a bioquímica seminal diante da crioinjúria acarretada pelas baixas temperaturas envolvidas no processo, culminando com o desenvolvimento de biomarcadores como ferramenta na escolha de reprodutores.

Este conhecimento contribuirá para seleção de animais com potencial para uso em Centrais de Inseminação visando o uso em biotécnicas como inseminação artificial (IA); fertilização *in vitro* (FIV) e Produção *in vitro* de embriões (PIF).

Este trabalho teve como objetivo realizar caracterização preliminar de proteínas do plasma seminal de reprodutores caprinos da raça Saanen.

## **CAPÍTULO 1**

## REFERENCIAL TEÓRICO

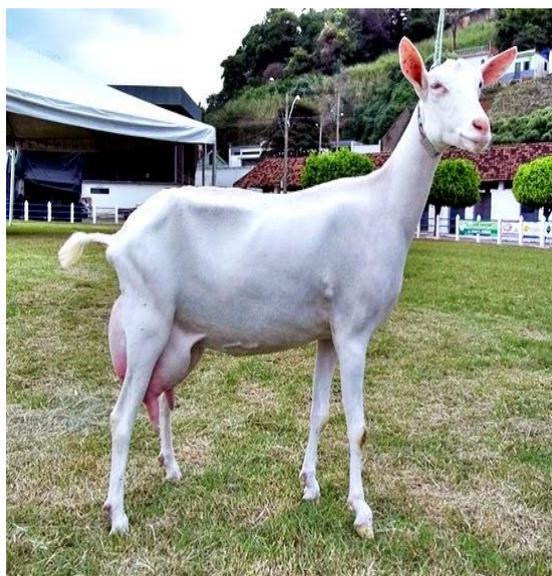
### Características gerais da raça Saanen

A raça Saanen é oriunda do Vale do Saanen na Suíça e foi introduzida no Brasil na década de 70, com a primeira referência datada de 1974, no estado de Pernambuco (CASTRO, 1984). Esta raça se caracteriza por apresentar pelagem branca ou creme, pelos curtos e finos, barbicha, orelhas pequenas, cascos amarelo-claros, pele rosê, brincos e cornos (Figuras 1 e 2). As fêmeas apresentam úberes bem formados, com excelente produção leiteira (JARDIM, 1964).



**Figura 1-** Reprodutor caprino da raça Saanen.

**Fonte:** Arquivo pessoal



**Figura 2-** Fêmea caprina da raça Saanen.

**Fonte:** Google imagens

Segundo Dairy Goat Journal essa raça é considerada de médio a grande porte, pesando os machos entre 80 a 100 kg e as fêmeas entre 50 a 80 kg (RIBEIRO, 1998). Uma criação adequada dos animais juntamente com aplicação de boas práticas de manejo nas instalações, levam os animais a produzirem de dois a três litros de leite por dia, podendo chegar a produções de seis a oito litros, em duas ordenhas (RIBEIRO, 1998).

Segundo Salles *et al.* (2001), a idade média na qual essa raça apresenta a fase de puberdade é de 180,53 dias. A idade da maturidade sexual atingida pela raça Saanen é de 5,8 meses (AHMAD e NOAKES, 1996). A qualidade seminal é um importante fator para a escolha de um reprodutor. Segundo Karatzas *et al.* (1997), avaliando as características seminais dos caprinos da raça Saanen, encontraram volume de 0,6 a 0,7 mL e concentração de 4,4 a 4,7 x

10<sup>9</sup>/mL. Castilho *et al.* (2009), trabalhando com caprinos adultos da raça Saanen criados em regime intensivo encontraram volume de 0,9 mL, motilidade espermática 91,3% e vigor espermático de 4,1. Dantas *et al.* (2011) trabalhando com as características seminais encontraram um volume de 1,18 mL, vigor 4,00, motilidade 67,66% e concentração de 3,45 x 10<sup>9</sup>/mL.

### **Plasma seminal e sua composição proteica**

O plasma seminal é a fração líquida do sêmen, sendo originada das glândulas acessórias, a saber: próstata, glândulas bulbo uretrais e glândulas vesiculares. Segundo Way *et al.* (2000), as secreções produzidas pelas glândulas sexuais acessórias são misturadas com os espermatozoides, previamente estocados na porção caudal do epidídimo durante o processo de ejaculação. No momento da ejaculação, o plasma seminal estimula a motilidade seminal e atua também como veículo para as células espermáticas.

O plasma seminal é constituído de componentes bioquímicos (íons, cálcio, citrato, etc.), alguns deles específicos para a regulação da função espermática (BARRIOS, 2000), adicionalmente aminoácidos, açúcares, minerais, fosfatases, prostaglandinas (EVANS e MAXWELL, 1990), além de ser composto por proteínas, incluindo hormônios, inibidores, enzimas, imunossupressores, substâncias ligadas aos andrógenos, inibina, imunoglobulinas e fatores de crescimento (FRAZER e BUCCI, 1996). Os constituintes do fluido seminal são influenciados por diversos fatores, como por exemplo, raça, peso corporal, idade, manejo, condições climáticas, nutrição, método de coleta de sêmen e grau de estimulação sexual (ZAMIRI e HEIDARI, 2006).

A principal função desse fluido é o transporte dos espermatozoides por ocasião da ejaculação, como também assegurar a permanência das células espermáticas no sistema genital da fêmea (YANAGIMACHI, 1994) e neutraliza o pH ácido da vagina, preservando assim os espermatozoides contra danos peroxidativos (SCHONECK *et al.*, 1996). O seu volume e composição variam entre espécies (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). Alguns autores (AUTIERO *et al.*, 1991; PANIDIS *et al.*, 1991) têm indicado que o plasma seminal contém fatores que poderiam influenciar a fertilidade de reprodutores, baseado em comparações da composição do plasma seminal entre machos de diferentes taxas de fertilidade.

Quando as células espermáticas entram em contato com o plasma seminal, ocorre uma série de episódios preparatórios nessas células para o processo de fecundação (MÜLLER *et al.*, 1997). Isso ocorre devido a ação modeladora que alguns constituintes do fluido seminal possuem sobre as várias funções espermáticas (CALVETE *et al.*, 1994). Henault *et al.* (1995)

evidenciaram um aumento da fertilidade de touros quando houve a inclusão do plasma seminal aos espermatozoides da cauda do epidídimo, indicando que algumas substâncias contidas nas secreções das glândulas anexas aumentam a fertilidade de touros.

Além da fertilidade, o plasma seminal também pode interferir no processo de congelamento. Corteel (1974) sugeriu que o plasma seminal de caprinos pode interferir no desempenho das células espermáticas durante o processo de congelamento. Aurich *et al.* (1996) comprovaram que a adição de plasma seminal de diferentes ganhos afetou a resistência de espermatozoides em suportar o estresse causado pela congelamento e descongelamento. Diante desses resultados, compreende-se a importância promissora dos marcadores moleculares do plasma seminal, entre eles as proteínas.

Recentemente a bioquímica do plasma seminal vem sendo amplamente estudada, principalmente em relação às proteínas por estarem em maior concentração do que outros componentes e, por participar ativamente do processo de fecundação (MC COULEY *et al.*, 1997; BELLIN *et al.*, 1998). Essas proteínas são parcialmente oriundas do plasma sanguíneo e, parcialmente, sintetizadas pelos testículos (KATO *et al.*, 1985), epidídimo (TURNER e REICH, 1987) e vesícula seminais (MANJANATH *et al.*, 1994).

As proteínas são macromoléculas orgânicas que estão presentes em todas as células vivas, portanto, essenciais à vida. Elas desempenham um importante papel como marcadores biológicos, tanto do ponto de vista reprodutivo como no diagnóstico e prognóstico de doenças. Com relação à reprodução, o conhecimento da função das proteínas do plasma seminal é relevante para o estudo de marcadores moleculares visando prever a fertilidade de machos (FRASER *et al.*, 2006). Entre as funções específicas desempenhadas pelas proteínas seminais encontram-se a regulação da atividade espermática; estabilidade da membrana plasmática; da capacitação espermática e interferência no processo de fertilização (MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008).

As pesquisas têm concentrado seus esforços na identificação de marcadores de congelamento e fertilidade à nível proteômico, principalmente detendo-se às proteínas contidas no plasma seminal relacionadas ao processo de congelamento do sêmen. A gama de proteínas do esperma inclui proteínas alcalinas, ácidas e de membrana. Essas proteínas participam da produção de energia nas mitocôndrias (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998), da liberação de óxido nítrico (LEWIS *et al.*, 1996), da fosforilação de proteínas (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1996) e estão associadas à motilidade espermática após o congelamento. Na espécie bovina algumas proteínas do plasma seminal têm sido relacionadas com a congelamento do ejaculado, alguns

exemplos são a Osteopontina, Proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a Albumina e a Clusterina (JOBIM *et al.*, 2009).

Moura *et al.* (2010) verificaram alguns *spot's* proteicos do plasma seminal de carneiros da raça Santa Inês apresentando correlação positiva com a integridade da membrana plasmática de espermatozoides criopreservados e observaram que essas proteínas poderiam ter função de auxiliar na estabilidade da membrana e, conseqüentemente, na viabilidade e motilidade do espermatozoide. Rêgo (2010) verificou que as proteínas mais abundantes no plasma seminal pertencem às famílias das proteínas do plasma seminal bovino (BSPs) e espermadesinas que estão relacionadas a capacitação espermática, formação do reservatório espermático no oviduto e interação espermatozoide-oócito.

A proteína Ácida do fluido seminal bovino (aSFP) cujo peso molecular é 12,9 kDa e pI 4,8 é apontada como responsável pela proteção da membrana, apresentando um efeito antioxidativo no processo de degradação oxidativa dos lipídios da membrana do espermatozoide *in vitro* (SCHONECK *et al.*, 1996). Dessa forma, a razão de animais de alta congelação apresentarem uma elevada quantidade de aSFP seria a capacidade dessa proteína em preservar a membrana da célula espermática contra a peroxidação (CHRISTOVA *et al.*, 2004).

A glicoproteína Clusterina que tem como peso molecular de 25,35 kDa e pI de 5,54 está presente em diversos processos fisiológicos, como por exemplo, adesão e agregação celular (BLASCHUK *et al.*, 1983) e maturação espermática (SYLVESTER *et al.*, 1991). Está presente no fígado, cérebro e testículo bovino (PALMER e CHRISTIE, 1992), também estando presente no plasma seminal, assim como na superfície da membrana dos espermatozoides do bovino e do homem (HOWES *et al.*, 1998), apresentando envolvimento na regulação dos processos de deslocamento e remanejamento de moléculas de lipídeos no plasma sanguíneo humano (JENNE *et al.*, 1991). Tendo em vista sua localização, esta glicoproteína pode estar envolvida na defesa das atividades da membrana espermática durante o processo de criopreservação do esperma (JOBIM *et al.*, 2004).

A Albumina é uma proteína de 66 kDa e pI 5,4 que foi encontrada no experimento de Jobim (2001), apresentando densidade óptica superior nas amostras dos reprodutores de alta congelação do sêmen. Segundo Dott *et al.* (1979), foi observado que a motilidade espermática foi estimulada quando a albumina foi acrescentada às células espermáticas epididimárias incubadas com o plasma seminal. Baas *et al.* (1983) constataram que a albumina era benéfica à motilidade no sêmen de suíno, ovino, equino e de coelho, mas que tinha pouco resultado na

motilidade espermática do bovino.

A Osteopontina é uma glicoproteína ácida, que apresenta peso de 55 kDa e pI 4,5, cuja acidez foi determinada devido à enorme quantidade de ácido aspártico e ácido glutâmico (FRANZEN e HEINEGARD, 1985). A osteopontina foi classificada como uma citoquina, que são proteínas solúveis que podem modular a função celular (PATARCA *et al.*, 1993). Devido à função da osteopontina na adesão celular, sugere-se que a ligação desta proteína com a congelação do sêmen pode ser devida à variação da função celular da membrana plasmática do espermatozoide, auxiliando na preservação da membrana no processo da criopreservação do sêmen (JOBIM, 2001; JOBIM *et al.*, 2002).

A banda proteica de peso molecular entre 15 a 17 kDa e pI entre 4,5 a 5,5 corresponde a BSP A1/A2, a qual expressou densidade óptica elevada nos animais de alta congelação (JOBIM, 2001; JOBIM *et al.*, 2004). No processo de ejaculação, as BSPs são secretadas pelas vesículas seminais, unindo-se à membrana espermática (DESNOYERS e MANJUNATH, 1992; MANJUNATH *et al.*, 1994), impulsionando o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana (THERIEN *et al.*, 1998, 1999).

## **Proteômica**

Proteoma é o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento. A proteômica surgiu no final de 1970 quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975). A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos. A análise proteômica é uma técnica que consiste no estudo do proteoma utilizando técnicas de separação e identificação, tais como eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática (HEIN *et al.*, 2013).

A identificação e o mapeamento dos componentes proteicos do ejaculado, através da técnica de eletroforese, vêm sendo utilizados desde a década de 50 (LARSON e SALISBURY, 1954; SZUMOWSKI, 1956; BENNET, 1965). Inicialmente a eletroforese em gel bidimensional foi desenvolvida pelo O'Farrell (1975). Ela separa as proteínas em duas dimensões: na primeira dimensão a separação ocorre pela focalização isoeletrica; já na segunda, ocorre por eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). A focalização isoeletrica consiste em determinar o ponto isoeletrico (pI) de uma determinada proteína. Quando são submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram até encontrar uma faixa de

pH referente ao seu pI (BERKELMAN e STENSTED, 1998). Na segunda dimensão, a separação das proteínas ocorre de acordo com suas respectivas massas moleculares, para isto, se faz uso do detergente SDS (LEHNINGER *et al.*, 1993).

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS é uma técnica utilizada para a análise de massas moleculares de proteínas (ROCHA *et al.*, 2005). A SDS-PAGE é uma ferramenta muito útil para separar moléculas de proteína por tamanho, fornecendo informações sobre o tamanho molecular e pureza das proteínas, bem como o número e o tamanho molecular de subunidades (BRUNELLE e GREEN, 2014).

### **Criopreservação**

A criopreservação é um processo onde células ou tecidos biológicos são preservados através da congelação a temperaturas muito baixas, geralmente  $-196^{\circ}\text{C}$  (PEGG, 2002). Esse processo tem possibilitado o aumento da produtividade de animais de alto valor zootécnico e uma ampla difusão de material genético de alta qualidade (CASTELO *et al.*, 2008).

Existem diversas vantagens no processo de criopreservação, dentre elas a redução de custos com a obtenção e transporte de reprodutores; conservação e aproveitamento de material genético e a rápida difusão deste material genético entre locais distantes (CASTELO *et al.*, 2008).

Para que haja sucesso na propagação de um sêmen de qualidade é essencial que o processo de congelação seja eficiente. Para isso, a célula espermática necessita conservar sua capacidade fertilizante após a descongelação e deve ser capaz de preservar a habilidade de gerar energia via metabolismo, conservar a configuração normal, integridade da membrana plasmática, motilidade, assim como a integridade acrossomal (LEMMA, 2011). Os passos que constituem o processo de criopreservação são diluição, centrifugação, resfriamento, congelação e descongelação do sêmen (VIDAMENT *et al.*, 2001). No processo de criopreservação espermática o espermatozoide é submetido a um choque térmico, decorrente da queda da temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  para  $-196^{\circ}\text{C}$ . A membrana plasmática passa por uma fase de transição do estado líquido cristalina para o de gel nesta faixa de temperatura (GRAHAM, 1996).

No processo de criopreservação o diluidor utilizado minimiza a possibilidade de transmissão de patógenos, aumenta o volume do ejaculado, prolonga a sobrevivência das células espermáticas e protege de condições ambientais desfavoráveis (BITTENCOURT, 2009). Os diluidores devem ter pH e osmolaridade adequados e proteger as células

espermáticas de injúrias criogênicas (SALAMON e MAXWELL, 2000). Os principais diluidores utilizados são a base de glicina-gema, glicina-gema-leite (GONZALEZ *et al.*, 1999), água de coco (NUNES, 1998), citrato-açúcar-gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose e também o tris-gema de ovo (SALAMON e MAXWELL, 2000).

A diluição do sêmen caprino em diluidores contendo gema de ovo ou leite pode ser prejudicial para a célula espermática, devido à presença da enzima fosfolipase A no plasma seminal, originária das glândulas bulbouretrais, que catalisa a hidrólise da lecitina da gema de ovo para ácidos graxos e lisolecitinas, os quais são tóxicos para as células espermáticas (ROY, 1957; IRITANI e NISHIKAWA, 1964; AAMDAL *et al.*, 1965). NUNES *et al.* (1982) detectou a proteína SBUIII na glândula bulbouretral de caprinos, a qual diminui a sobrevivência de espermatozoides resfriados e congelados em diluidores à base de leite.

Segundo Gil *et al.* (2003), um diluidor a base de lecitina de soja pode ser uma alternativa para minimizar os riscos de veiculação de patógenos, citando como exemplo o Tolera-D®. Peres *et al.* (2015) utilizando o diluidor Tolera-D® no sêmen de bovinos das raças Nelore, Angus e Senepol, obtiveram 83% de aprovação no sêmen pós-congelado, sendo 100% em touros Nelore e Angus e 50% no Senepol. No entanto, dados sobre o Tolera-D® em caprinos ainda não foram publicados.

Em virtude das modificações bioquímicas, funcionais e estruturais da membrana plasmática, a taxa de sobrevivência dos espermatozoides submetidos a esse processo não é expressiva (VALCARCEL, 1997), e os métodos de criopreservação utilizados ainda resultam em danos em torno de 40-50% ao espermatozoide durante a congelação-descongelação (HU *et al.*, 2011). A criopreservação é um método que provoca danos para as células espermáticas por reduzir sua sobrevivência e, em decorrência, seu potencial fertilizante (YESTE *et al.*, 2014). Durante este procedimento as lesões que os espermatozoides sofrem podem ser ultras estruturais ou físicas, bioquímicas ou funcionais (ALMEIDA, 2006), alterando as membranas plasmática, acrossomal externa e as mitocondriais dos espermatozoides (WATSON, 1995), sendo as lesões nessas estruturas citadas como as principais causas de danos e perdas funcionais da célula espermática (HE *et al.*, 2001).

Segundo Silva *et al.* (2009), para se adaptar às mudanças de temperatura durante o processo de criopreservação a membrana plasmática sofre alterações como o movimento de translocação de fosfolípidios e com a exposição da fosfatidilserina. As modificações ocorridas nas membranas espermáticas durante esse processo se assemelham às mudanças fisiológicas da capacitação espermática (SILVA *et al.*, 2009). Outras condições estressantes na qual as

células espermáticas lidam são o estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores, desidratação, aumento da concentração dos solutos e formação e dissolução de cristais de gelo (BORTOLOZZO *et al.*, 2008).

Durante a criopreservação, as mudanças metabólicas ocorridas nas células geram a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), cujas consequências negativas sobre as células espermáticas foram sugeridas por Macleod (1943), no qual evidenciou que a exposição do espermatozoide humano a altas concentrações de oxigênio resultou em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser definida como uma série de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos poli-insaturados das membranas celulares (NOGUEIRA *et al.*, 2013). Entre alguns danos da peroxidação estão a perda de motilidade, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide (WHITE, 1993).

A tecnologia da congelação do sêmen caprino tem apresentado desenvolvimento notório. Contudo, pesquisas são necessárias para compreender os resultados específicos de cada animal aos diferentes fatores que interferem no processo de criopreservação do sêmen e as possíveis proteínas que estejam envolvidas nesse processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMDAL, J.; LINGSET, O.; FOSSUM, K. Toxic effects of lysolecithin on sperm. **Nordisk Veterinær Medicin**, v.17, p.633-634, 1965.

AHMAD, N.; NOAKES, D. E. Sexual maturity in british breeds of goat kids. **British Veterinary Journal**, v. 152, p. 93 – 103, 1996.

ALMEIDA, J. P. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen equino**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

AITTKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

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

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

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

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**., v. 68. p. 275-280, 1983.

BLASCHUK, O.; BURDZY, K.; FRITZ, I. B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v.258, p.7714-7720, 1983.

BERLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.72 p. 244-7, 1994.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; VANDERBOOM, R. J.; AX, R. L. Monoclonal antibody detection of heparine-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**., v. 74, n. 1, p 173-182, 1996.

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

BENNET, J. P. **Microeletroforesis of bull, ram, boar e rabbit seminal plasma proteins**. In: Congresso internacional per lariprodudioneanimale e lafecondazioneartificiale. p.186-189, 1965.

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. Edition AC (80-6429-60). Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., Manual do fabricante. 100 p. 1998.

BITTENCOURT, R. F. **Viabilidade dos espermatozoides ovinos criopreservados com a utilização do glicerol em duas concentrações, em meio diluidor com e sem trealose, associada ou não ao EDTA.** 2009. 201f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 2009.

BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; BENNEMANN, P. E.; WENTZ, I. **Inseminação artificial em suínos.** In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Roca, p. 395, 2008.

BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). **Methods in Enzymology**, v.541, p.151-159, 2014.

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

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.67-75, 2008.

CASTILHO, E. F.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; ESPESCHIT, C. J. B. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*- v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.

CASTRO, A. **A cabra.** 3. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, p. 372, 1984.

CHRISTOVA, Y.; JAMES P. S.; JONES R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.365-372, 2004.

CORTEEL, J. M. Viabilité des spermatozoides de boue conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal effect du glucose. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 14, n. 1B, p. 741-745, 1974.

DAIRY GOAT JOURNAL (S. D.). Disponível em: < [www.dairygoatjournal.com](http://www.dairygoatjournal.com)>. Acesso em: 12 jul 2018.

DANTAS, V. M.; SOUZA, M. I. L.; MONREAL, A. C. D.; CANDURI, F.; OLIVEIRA, H. G. Variações anuais nas características seminais, perímetro escrotal e testosterona plasmática em bodes Saanen no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.5, n. 1, p. 9-19, 2011.

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

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, n.4, p. 425-435,1994.

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A. P.; FOSTER, G. C. A. The maintenance of motility and the surfaces properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 113-124, 1979.

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

FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. [s.n.] São Paulo: Roca, v.2, p.395, 2008.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. **Biochemical Journal**, v.232, p.715-724, 1985.

FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A. PŁUCIENNICZAK, G.; KOTŁOWSKA, M.; KORDAN, W.; WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.; STRZEZEK, J. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reproductive Biology**, v.6, p.5-20, 2006.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 1241-1255, 2003.

GONZALEZ, C. I. M.; OBA, E.; BICUDO, S. D. Avaliação do sêmen ovino (ovis aries) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, 1999.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

HE, L.; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**, v.64, p.69-70, 2001.

HEIN, M. Y.; WALHOUT, A. J. M.; VIDAL, M.; DEKKER, J. **Proteomic Analysis of Cellular Systems**. In: Handbook of Systems Biology. San Diego: Academic Press, p.3-25, 2013.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J. F.; GRIL, L. C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.52, p.390-397, 1995.

HOWES, E. A.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.673-681, 1998.

HU, J. H.; JIANG, Z. L.; LV, R. K.; LI, Q. W.; ZHANG, S. S.; ZAN, L. S.; LI, W. K.; LI, X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, n.62, p. 83–87, 2011.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg coagulating enzyme in goat semen. **Japanese Journal of Zootechny Science**, v. 10, p. 57 – 62, 1964.

JARDIM, W. R. **Criação de caprinos**. São Paulo: Melhoramentos, p. 306, 1964.

JENNE, D. E.; LOWIN, B.; PEITSCH, M. C.; BÖTTCHER, A.; SCHMITZ, G.; TSCHOPP, J. (Complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-1 in human plasma. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.11030-11036, 1991.

JOBIM, M. I. M. **Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino**. 2001. 156f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; CIMAROSTI, H. I.; MATTOS, R. C. Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen 1. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.296-305, 2002.

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

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores proteicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, p. 15-23, 2009.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5-6 p. 1202-7, 1993.

KATO, M.; KATO, K.; GOODMAN, D. S. Immunohistochemical studion on the localization of cellular retinol binding protein in rate test and epididymis. **Biology of Reproduction**, v, 32, p. 172 -189, 1985.

LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretics studies. **Journal Biology Chemistry**, v.206, n.2, p.741-749, 1954.

LAZZARI, N.M. Saanen, raça de cabra leiteira, com grande lucratividade. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/cursos-cabras/artigos/saanen-raca-de-cabra-leiteira-com-grande-lucratividade>>. Acesso em: 12 jun 2018.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. **New York: Worth Publishers**, p. 1013, 1993.

LEMMA, A. **Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility**. In: MANAFI, M. Artificial Insemination in Farm Animals, In Tech, [S.I.: s.n.], p. 191-216, 2011.

LEWIS, S. E. M.; DONNELLY, E. T.; STERLING, E. S. L.; KENNEDY, M. S.; THOMPSON, W.; CHAKRAVARTHY, U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. **Molecular Human Reproduction**, v.2, p. 873-878, 1996.

MACLEOD J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v.138, p.512-518, 1943.

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

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**., v. 50, p.27-37, 1994.

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

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

MÜLLER K., MÜLLER, P.; HERMANN, A. Transbilayer motion of spin-labelled phospholipids in the plasma membrane of epididymal and ejaculated ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 81, 1997.

MOURA, P. P.; FRANCO, M. M.; SILVA, T. A. D. N.; ROCHA, T. L.; LEAL, D. R.; PASSOS, P. I. B.; NEVES, J. P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**. v.40, p.1154-1159, 2010.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PÉ, J. Seminal plasma proteins and spermresistanceto stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.18–31, 2008.

NOGUEIRA, B. G.; BITENCOURT, J. L.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Eletrônica Veterinária**, v.15, p. 1-15, 2013.

NUNES, J. F. **Étudedeseffetsdu plasma seminal surlasurvie in vitro desespermatozoïdes de bouc**. Paris. Université Paris VI, Tese (Ciências da Vida). p. 45, 1982.

NUNES, J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109-112, 1998.

O'FARRELL, P. H. High resolution twodimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biogical Chemistry**. v. 250, p.4007-4021, 1975.

PANIDIS, D.; ROUSSO, D.; PAPPAS, C.; KALOGEROPOULOS, A. Seminal plasma transferrin: does it help in the diagnosis of fertility? **Journal Obstetric Gynecology**, v. 11, p. 211-214, 1991.

PALMER, D. J.; CHRISTIE, D. L.; Identification of molecular aggregates containing glycoproteins III, J, K (carboxypeptidase H), and H (Kex2-related proteases) in soluble and membrane fractions of adrenal medullary chromaffin granules. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.19806-19812, 1992.

PATARCA, R.; SAAVEDRA, R. A.; CANTOR, H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of early T-lymphocyte activation-1/osteopontingene. **Critical Reviews in Immunology**, v.13, p.225-246, 1993.

PEGG, D. E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05-14, 2002.

PERES, A. R.; MORANI, E. S. C.; RONCOLETTA, M. Comparison between Bioxcel® and Tolera-D® semen extenders on semen industrialization rates. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.829, 2015.

RÊGO, J. P. A. **Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos**. 2010. 106f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

RIBEIRO, S. D. **Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos**. São Paulo: Nobel, p. 318, 1998.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Comunicado Técnico: Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. Brasília: Embrapa, 2005. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf> . Acesso: 22 jul 2018.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. *Nature*, v.159, p. 318 – 319, 1957.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, A. C.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**. v.44, p.1616-1620, 1998.

SALLES, H. O.; AZEVEDO, H. C.; SOARES, A. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; MOURA SOBRINHO, P. A. Puberdade e maturidade sexual em caprinos de raças exóticas criadas no Nordeste do Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 4, n. 2/3, p. 303-309, 2001.

SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein a SFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, n.3, p. 633-642, 1996.

SILVA, A. R.; FONTENELE-NETO, J. D.; CARDOSO, R. C. S.; LOPES, M. D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.595-601, 2009.

SYLVESTER, S. R.; MORALES, C.; OKO, R.; GRISWOLD, M. D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology of Reproduction**, v.45, p.195-207, 1991.

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

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1080-1088, 1998.

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

TURNER, T. T.; REICH, G. W. Influence of protein in rat cauda epididymal fluid on cauda sperm motility. **Gamete Research**, v. 18, p. 267-278, 1987.

VALCÁRCEL, A.; DE LÁS HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299- 309, 1997.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.201-218, 2001.

VIJAYARAGHAVAN, S.; STEPHENS, D. T.; TRAUTMAN, K.; SMITH, G. D.; KHATRA, B.; DA CRUZ E SILVA, E. F.; GREENGARD, P. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase Kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biology of Reproduction**, v.54, p.709-718, 1996.

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

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-658, 1993.

YANAGIMACHI, R. **Mammalian Fertilization**. In: KNOBIL, E. and J. D., NEILL (Eds). The physiology of reproduction. New York: Raven Press LTD, v.1, p. 189-317, 1994.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; MARÍN, H.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, v. 2, p. 1-13, 2014.

ZAMIRI, M. J.; HEIDARI, A. H. Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.176-185, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

## PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL LIGADAS AO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

### RESUMO

A caracterização do perfil proteico do plasma seminal de animais para reprodução possibilita a utilização dessas como marcadores moleculares, cuja presença ou ausência serve de indicativo de qualidade seminal. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de reprodutores caprinos da raça Saanen. Utilizou-se seis reprodutores nos quais foram realizadas coletas de sêmen através de vagina artificial, no período de setembro a outubro/2017, sendo as análises espermáticas (volume, concentração espermática, aspecto, motilidade e vigor) avaliadas antes e depois da congelação. Antes da congelação, parte do excedente do sêmen fresco coletado foi centrifugada a 10000x g durante 15 minutos à temperatura de 4° C para obtenção do plasma seminal. Foi realizada eletroforese bidimensional (2DE) do plasma seminal e após a corrida os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* e descorados com etanol. Posteriormente, os géis foram escarneados e analisados usando-se o *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, buscando quantificar e identificar os *spots* presentes. A congelação do sêmen fresco foi realizada através da máquina TK3000 usando como solução diluidora o Tolera-D ®. A primeira avaliação pós-criopreservação aconteceu após uma semana, sendo as amostras descongeladas em banho-maria a 37°C e avaliadas quanto à motilidade e vigor dos espermatozoides em microscopia óptica. A segunda avaliação aconteceu cinco meses após a congelação do sêmen, sendo as amostras de cada reprodutor descongeladas em banho-maria a 37°C, e analisadas pelo sistema computadorizado CASA, as seguintes variáveis (motilidade total, motilidade progressiva, VCL, VSL e VAP). Para comparação dos animais no que se refere à concentração e volume do sêmen fresco, aplicou-se teste F, através da análise de variância, seguido do teste de Turkey. Para o vigor e motilidade do sêmen fresco e congelado foram realizadas análises de variância, seguido de teste Bonferroni. Para as características motilidade total, motilidade progressiva, VCL, VSL e VAP analisadas no sistema computadorizado CASA foram realizadas análises de variância, seguido de teste Bonferroni. A motilidade dos espermatozoides no sêmen fresco oscilou de 80% a 90% e o vigor de 3,67 a 4,6. No sêmen pós-descongelado houve diferença entre os animais quanto à motilidade e vigor variando de 49% a 62% e 2,80 a 3,0, respectivamente, sendo que um animal apresentou baixa motilidade (13,33%) e vigor (1,0). Os resultados apresentados pelos parâmetros espermáticos do sistema CASA mostraram diferenças entre os animais quanto à

motilidade total e progressiva. Os principais *spot's* específicos ligados à reprodução apresentaram peso molecular variando de 12 kDa a 66 kDa e pI de 4,37 a 9,57. Os resultados dos géis demonstraram que os ejaculados dos reprodutores se assemelharam entre si quanto ao perfil proteico do plasma seminal. Foram encontradas as seguintes proteínas: ASZ1, RNS10, INHBA, OSTP, ALBU, PTGDS, SRY, STX1B, LEP, LSHB, DHSO, BRS3, PRND e CIB1. De acordo com a literatura, algumas dessas proteínas estão relacionadas com a qualidade do sêmen caprino criopreservado, podendo-se ressaltar a Prostaglandina-H2, Albumina, Leptina, SRY, STX1B e FSHB.

Palavras-chave: Eletroforese 2DE; Criopreservação; Plasma Seminal

## ABSTRACT

The characterization of the protein profile of the seminal plasma of animals for reproduction allows the use of these proteins as molecular markers, whose presence or absence is indicative of seminal quality. The objective of this work was to characterize the protein profile of the seminal plasma of Saanen goat breeders. Six broods were used in which semen samples were collected through artificial vagina, from September to October / 2017, and the sperm analyzes (volume, sperm concentration, appearance, motility and vigor) were evaluated before and after freezing. Before freezing, part of the fresh semen collected was centrifuged at 10000xg for 15 minutes at 4 ° C to obtain seminal plasma. Two-dimensional (2D) electrophoresis of the seminal plasma was performed and after running the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and decolorized with ethanol. Subsequently, the gels were scanned and analyzed using the ImageMaster 2D Platinum 7.0 Software, seeking to quantify and identify the spots present. Freezing of the fresh semen was performed through the TK3000 machine using Tolera-D ® as a dilution solution. The first post-cryopreservation evaluation occurred after one week, the samples being thawed in a 37 ° C water bath and evaluated for sperm motility and vigor under light microscopy. The second evaluation took place five months after semen freezing, and the samples from each breeder were thawed at 37 ° C and analyzed by the computerized system CASA, the following variables (total motility, progressive motility, VCL, VSL and VAP). For the comparison of the animals with regard to the concentration and volume of fresh semen, F test was applied through analysis of variance, followed by the Turkey test. For the vigor and motility of fresh and frozen semen analyzes of variance were performed, followed by Bonferroni test. For the total motile characteristics, progressive motility, VCL, VSL and VAP analyzed in the computerized system CASA were performed analyzes of variance, followed by Bonferroni test. Sperm motility in fresh semen ranged from 80% to 90% and vigor from 3.67 to 4.6. In post-frozen semen, there was a difference between the animals in motility and vigor ranging from 49% to 62% and 2.80 to 3.0, respectively, with one animal presenting low motility (13.33%) and vigor (1 , 0). The results presented by the spermatoc parameters of the CASA system showed differences between the animals regarding total and progressive motility. The main specific spots linked to reproduction had molecular weight ranging from 12 kDa to 66 kDa and pI from 4.37 to 9.57. The results of the gels demonstrated that the ejaculates of the reproducers resembled each other in the two-dimensional protein profile of the seminal plasma. The proteomic profile of the seminal plasma found evidenced the following proteins: ASZ1, RNS10, INHBA, OSTP, ALBU, PTGDS, SRY, STX1B, LEP, LSHB, DHSO, BRS3, PRND

and CIB1. According to the literature, some of these proteins are related to the quality of cryopreserved goat semen. Prostaglandin-H2, Albumin, Leptin, SRY, STX1B and FSHB can be highlighted.

Keywords: 2DE electrophoresis; Cryopreservation; Seminal Plasma

## INTRODUÇÃO

A seleção de reprodutores e matrizes para a composição e formação das bases dos rebanhos caprinos seguem vários critérios, dentre eles a taxa de fertilidade, a qualidade do sêmen e dados dos progenitores, levando sempre em consideração a obtenção de alta eficiência reprodutiva (MATOS *et al.*, 1992). Em geral, os animais da região Nordeste vivem em sistema extensivo e não são acompanhados do ponto de vista zootécnico, dificultando a adoção de biotécnicas reprodutivas.

As biotécnicas tais como congelamento e resfriamento do sêmen, inseminação artificial (IA), e transferência de embrião, devem ser mais exploradas e aplicadas objetivando o aumento dos índices produtivos e reprodutivos da espécie caprina. Neste contexto, a identificação de marcadores moleculares proteicos ligadas à criopreservação do sêmen, proporcionará meio de seleção de animais para a inseminação artificial (COX e ALFARO, 2007). Dentre os marcadores proteicos mais estudados podemos mencionar a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina que são encontrados na espécie bovina (JOBIM *et al.*, 2009).

Segundo Silva (2014) o processo de criopreservação apresenta uma limitação devido à presença de animais de baixa congelamento do sêmen, neste caso, o ejaculado é considerado inapto para criopreservação e o animal não é recomendado para uso em Centrais de Inseminação. A determinação do perfil proteico do plasma seminal de animais para reprodução possibilitará a utilização dessas proteínas como marcadores moleculares, cuja presença ou ausência servirá de indicativo de qualidade seminal e fertilidade, contribuindo para a seleção de reprodutores para monta natural ou IA.

Em vista do que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização preliminar de proteínas do plasma seminal de reprodutores caprinos da raça Saanen.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada na Estrada Sobral/Groaíras, km 4, Sobral- CE, na região Norte do Ceará, semiárido nordestino. O clima da região é do tipo BShw' (Classificação de Köppen), semiárido quente, com precipitações a variando de 380 a 760 mm, clima quente de baixa altitude e longitude. Possui duas estações: chuvosa e seca, sendo a primeira irregular e variando de dezembro a maio, e a segunda de longa duração de maio a novembro. A temperatura média anual é de 28°C, situando-se as máximas e as mínimas em torno de 35°C, e 22°C, respectivamente. O projeto foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA e obteve protocolo de número 005.11.016.uva.505.01.

### Coleta e análise do sêmen fresco

Foram utilizados seis reprodutores caprinos da raça Saanen, previamente treinados em coleta de sêmen com vagina artificial, com idade variando de dois a quatro anos, pertencentes ao setor cabriteiro da Unidade, submetidos a regime de criação semi-intensivo, recebendo alimentação no cocho, de acordo com o NRC (2007). Antes das coletas de sêmen, realizadas na sala de coleta, pertencente ao Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial da Embrapa Caprinos e Ovinos (LATSIA), os animais tiveram seus testículos mensurados quanto ao perímetro escrotal (cm) (PE) através do uso de fita métrica. O período das coletas correspondeu aos meses de setembro e outubro de 2017, realizadas em dois dias alternados por semana, sempre no período da manhã, sendo os animais divididos em dois grupos de três animais para cada dia de coleta. Ao todo foram realizadas cinco coletas por animal, embora tenha ocorrido perda de duas coletas de um mesmo animal, perfazendo um total de 28 coletas.

Após as coletas, as amostras foram imediatamente mantidas em banho-maria a 37°C para avaliar os seguintes parâmetros espermáticos: aspecto (aquoso leitoso e cremoso); volume do ejaculado (mL); motilidade total (MOT) (%) e vigor (V) (0-5), cujas avaliações foram realizadas em microscópio óptico de acordo com recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). A concentração espermática ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) foi determinada usando a espectrofotometria, sendo a amostra de sêmen diluída (1:400) em solução de formol salina.

Segundo o CBRA (2013), as características desejáveis do ejaculado são: aspecto (leitoso e cremoso); volume (0,5 - 1,5 mL); motilidade total (70-90) %; vigor ( $\geq 3$ ); concentração espermática ( $2-5 \times 10^9$ /mL).

### **Congelamento e descongelamento do sêmen**

Após as análises dos parâmetros espermáticos, procedeu-se a diluição do sêmen de cada reprodutor. Para diluição utilizou-se um volume que variou de 0,4 a 0,8 mL de sêmen fresco e 2,1 a 2,9 mL (volume x concentração / 200 milhões) do Tolera-D®, um diluidor comercial indicado para congelamento de sêmen de ruminantes e isento de produtos de origem animal como leite e gema de ovo.

O sêmen foi aspirado em palhetas de 0,25mL, e colocadas no equipamento TK3000, utilizando a curva P4S2 a qual reduz a temperatura a cada 0,5°C/minuto. As doses seguiram o processo de resfriamento até atingir 5°C durante 01:20 minutos e, em seguida, a máquina passou por um período de 10 horas de estabilização, após esse período iniciou-se a curva de congelamento, atingindo uma temperatura de -120°C durante 15 minutos. Posteriormente, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão de criopreservação. Para cada coleta foram utilizadas nove palhetas por animal, totalizando 252 amostras no final do experimento.

Logo após o período de uma semana uma palheta de cada animal foi descongelada em banho-maria a 37°C por cinco minutos e foram realizadas avaliações de motilidade total e vigor espermático.

### **Análise do sêmen criopreservado no Sistema de Análise de Sêmen Auxiliado por Computador (CASA)**

Cinco meses após a congelamento do sêmen fresco, as amostras foram transportadas em um botijão de criopreservação para o Laboratório de Reprodução da Universidade Estadual do Ceará (UECE), localizada em Fortaleza-Ceará. As amostras foram descongeladas em banho-maria à 37°C, diluídas em solução fisiológica e foram avaliadas cinco palhetas de cada animal de modo a termos a média individual. Essas análises foram feitas no Sistema de Análise de Sêmen Auxiliado por Computador (CASA), com uso do programa *SpermClassAnalyser*® (SCA®, Microptic S.L., Barcelona Espanha). As variáveis avaliadas foram: MOP (%) (motilidade progressiva), (MOT) (%) ( motilidade total), VAP (velocidade média de percurso

$\mu\text{m/s}$ ), VSL (velocidade linear,  $\mu\text{m/s}$ ) e VCL (velocidade curvilínea,  $\mu\text{m/s}$ ) dos espermatozoides.

### **Dosagem das proteínas totais do sêmen fresco**

Parte do excedente do sêmen fresco coletado foi destinado para a dosagem de proteínas totais. O sêmen foi centrifugado a 10000 x g por 15 minutos à 4°C, com a finalidade de separar o plasma seminal, sendo este armazenado em tubos *ependorff*® e mantido sob congelação em freezer (-20°C). As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue* às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda 580 nm. A quantificação foi feita em triplicata, usando a albumina sérica bovina (BSA) para criar uma curva padrão em concentrações conhecidas (0, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de BSA.

### **Eletroforese bidimensional (2DE)**

Foi empregada a técnica descrita por O'Farrel (1975), com algumas modificações. Inicialmente foi realizado um *pool* das amostras de sêmen que estavam mantidas sob congelação em freezer (-20°C). A focalização isoeletrica refere-se à primeira dimensão do processo 2DE que teve início com preparo da solução de reidratação. Utilizou-se tiras de gradiente de pH imobilizado (*IPG Strip*), com faixa de pH linear de 3-10 por 16 horas, em canaletas do *IPGBox* (*GE Healthcare*) e, em seguida, incubadas. Ao final da corrida as tiras foram armazenadas em tubos de ensaio e acondicionadas em freezer – 80 °C para posterior corrida de segunda dimensão.

Uma vez realizada a focalização, as tiras foram equilibradas, sob agitação, em solução de equilíbrio com ditiotreitol (DTT) por 15 minutos e, em seguida, alquiladas com iodoacetamida (IAA), também em solução de equilíbrio por 15 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas na segunda dimensão em géis de poliacrilamida à 12,5% na presença de SDS. Foi utilizado marcador de peso molecular entre 14 e 97 kDa sendo a corrida feita em duplicata para cada animal.

Depois de separadas as proteínas por eletroforese, os géis foram corados pelo *Comassie Blue* e, em seguida, os géis colocados em recipiente de plástico sob agitação, e posteriormente, foi aplicado o descorante. Para análise dos géis foi feita a digitalização usando o *Scanner Image Scanner III*, e para análise o *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*.

### **Análise estatística do delineamento experimental**

Para a comparação dos animais no que se refere à concentração e volume, aplicou-se teste F, através da análise de variância, seguido o teste de Turkey.

Foram realizadas análises de variância, seguido de teste Bonferroni para as características vigor e motilidade do sêmen com um modelo matemático que incluía o efeito fixo do sêmen (fresco ou descongelado) e os efeitos aleatórios de reprodutor e da interação sêmen x reprodutor. Para atender os pressupostos da análise de variância, como distribuição normal, homocedasticidade e independência dos resíduos, foram realizadas as transformações de vigor ( $\text{vigor}+1$ ) e motilidade  $(\text{mot}+1)^2$ .

Para as características motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP), velocidade curvalinear (VCL), velocidade progressiva (VSL), velocidade média de trajeto (VAP), foram realizadas análises de variância, seguido de teste Bonferroni com um modelo matemático que incluía o efeito aleatório do reprodutor. Para atender os pressupostos da análise de variância, como distribuição normal, homocedasticidade e independência dos resíduos, foi realizada a transformação de motilidade progressiva em  $\text{MOT}_-=\log_{10}(y^2)$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Características do sêmen fresco**

Observou-se diferença ( $P<0,05$ ) para o volume do sêmen entre os animais, mas não para a concentração ( $P>0,05$ ). O aspecto do sêmen dos reprodutores variou de leitoso a cremoso. Os resultados encontrados neste estudo para o perímetro escrotal, volume, concentração e aspecto do sêmen fresco estão de acordo com os valores adotados pelo CBRA (2013) (Tabela 1).

Tabela 1- Valores médios e desvio padrão para volume e concentração espermática; e valor individual do perímetro escrotal e do aspecto do sêmen fresco dos reprodutores Saanen.

Reprodutores	Variáveis			
	Volume (mL)	Concentraçãox10 <sup>9</sup> /mL	Perímetro escrotal (cm)	Aspecto
<b>A</b>	1,26±0,41 <sup>AB</sup>	3,74±0,94 <sup>A</sup>	30	L
<b>B</b>	1,32±0,24 <sup>AB</sup>	3,05±0,49 <sup>A</sup>	30	L
<b>C</b>	0,96±0,21 <sup>A</sup>	3,91±0,88 <sup>A</sup>	35	C
<b>D</b>	1,40±0,17 <sup>AB</sup>	4,52±0,08 <sup>A</sup>	35	C
<b>E</b>	1,74±0,33 <sup>B</sup>	3,09±0,37 <sup>A</sup>	32	L
<b>F</b>	1,28±0,22 <sup>AB</sup>	3,66±1,01 <sup>A</sup>	28	C
<b>Média <math>\bar{x}</math></b>	1.32±0.29	3.60±0.75	31,66	

Médias seguidas de letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre os animais pelo teste de Tukey (p > 0,05).

L = leitoso C = cremoso

O volume variou de 0,96 a 1,74 mL, havendo diferença (P<0,05) entre os animais C e E. Sousa (2017) trabalhando com caprinos Anglo Nubiano encontrou dados de volume que oscilaram de 0,5 a 2,3 mL. Conforme Souza (2008), caprinos da raça Alpina Americana apresentaram valores entre 0,9 e 1,4 mL no sêmen fresco. Provavelmente, a diferença entre os ejaculados possa ser explicada devido à variação entre raças. Nos caprinos, o volume varia de 0,2 a 2,0 mL, tendo como média 0,8 mL (CHEMINEU *et al.*, 1991; SALVIANO e SOUZA, 2008). Segundo Evans e Maxwell (1990), esses valores podem variar de acordo com o método de coleta, do tempo de excitação da espécie, frequência de coletas, temperatura, alteração de dieta, idade e condição corporal.

A concentração espermática oscilou de 3,05 a 4,52 x 10<sup>9</sup>/mL, tendo uma média de 3,66 x 10<sup>9</sup> /mL. Segundo Dias (2015), caprinos adultos da raça Parda Alpina apresentaram concentração espermática de 3,33 x 10<sup>9</sup>/mL. Dantas *et al.* (2011) trabalhando com caprinos Saanen encontraram uma média de 3,45 x 10<sup>9</sup>/mL. Além das variações individuais, a concentração de espermatozoides varia com o tamanho do testículo e atividade reprodutiva (MAIA, 2010). Segundo Tardif *et al.* (1999) e Christensen *et al.* (2011), os quais trabalharam com bovinos, a concentração espermática não retrata uma condição importante para desqualificação de reprodutores, exceto em condições extremamente inferiores em relação ao limite previsto. Quando a concentração espermática é mensurada, seu valor deve ser precisamente determinado, evitando trocar por valores acima do número real de espermatozoides no ejaculado, uma vez que concentrações inferiores podem não ser suficientes para alcançar o oviduto e estar presentes no momento da ovulação (KRUEGER *et al.*, 1999).

O perímetro escrotal variou de 28 a 35 cm, tendo uma média de 31,66 cm, dados esses que corroboram com os de Salles (2010) que trabalhando com caprinos Saanen encontrou uma média de 32,5 cm. Conforme o CBRA (2013), o tamanho dos testículos pode ser afetado pela idade, raça, peso corporal, processos inflamatórios, subnutrição, entre outros. A aferição do perímetro escrotal é um exame essencial na avaliação de reprodutores (PAULA *et al.*, 2008), uma vez que esta variável demonstra associação com vários fatores, como o peso corporal e idade (MUKOSA-MUGERWA e AZAZ, 1992; JOBIM *et al.*, 1989; FREITAS *et al.*, 1991; OSINOWO *et al.*, 1992), peso testicular (HAHN *et al.*, 1969; CLARK *et al.*, 2003; CARDOSO e QUEIROZ, 1988), concentração do sêmen (SOUZA e COSTA, 1992; SOUZA *et al.*, 2001), capacidade de serviço e desenvolvimento sexual (COULTER e FOOTE, 1979; OTT e MENON, 1980; YARNEY *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 2001; CLARK *et al.*, 2003).

O aspecto do sêmen variou de cremoso a leitoso, assemelhando-se aos encontrados por Dias (2015) em caprinos da raça Parda Alpina, cujos ejaculados apresentaram aspecto leitoso. Santos *et al.* (2001) não observaram variações no aspecto do ejaculado durante cinco meses de avaliação em caprinos da raça Saanen, mostrando-se sempre cremoso. Segundo Oliveira *et al.* (2013), o aspecto do sêmen de ruminantes pode ser um indicador da concentração de espermatozoides, e de acordo com CASTELO *et al.* (2008), quanto menos aquoso, menor a quantidade de plasma seminal e maior a concentração de espermatozoides. De acordo com dados do CBRA (2013), a aparência do ejaculado caprino pode ser cremosa, leitosa, serosa ou aquosa.

### **Análise do sêmen fresco e pós-descongelado quanto à motilidade e vigor em microscopia óptica**

Na tabela 2 encontram-se os resultados das avaliações de motilidade e vigor do sêmen fresco e pós-descongelado analisado em microscopia óptica (x10) após o período de uma semana. As médias foram comparadas e não se observou diferença ( $P > 0,05$ ) quanto a motilidade espermática entre os animais no sêmen fresco, já para o sêmen pós-descongelado observou-se diferença ( $P < 0,05$ ). Para o vigor observou-se diferença ( $P < 0,05$ ) entre os reprodutores no sêmen fresco, e para o sêmen pós-descongelado.

Tabela 2 – Avaliação da motilidade e do vigor espermático do sêmen fresco e pós-descongelado analisado em microscopia óptica dos reprodutores da raça Saanen.

Reprodutor	Variáveis			
	Sêmen fresco		Sêmen pós-descongelado	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
A	88,00 <sup>A</sup>	4,00 <sup>BC</sup>	59,00 <sup>A</sup>	2,80 <sup>A</sup>
B	90,00 <sup>A</sup>	4,60 <sup>A</sup>	62,00 <sup>A</sup>	2,80 <sup>A</sup>
C	86,00 <sup>A</sup>	3,80 <sup>C</sup>	58,00 <sup>A</sup>	2,90 <sup>A</sup>
D	80,00 <sup>A</sup>	3,67 <sup>C</sup>	13,33 <sup>B</sup>	1,00 <sup>B</sup>
E	86,00 <sup>A</sup>	4,20 <sup>ABC</sup>	49,00 <sup>A</sup>	2,60 <sup>A</sup>
F	84,00 <sup>A</sup>	4,40 <sup>AB</sup>	62,00 <sup>A</sup>	3,00 <sup>A</sup>
<b>Média <math>\bar{x}</math></b>	85,66	4,11	50,55	2,51

Médias seguidas de letras maiúsculas sobrescritas iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Bonferroni ( $p > 0,05$ ).

Segundo o CBRA (2013) os valores médios dos animais para motilidade e vigor encontrados neste estudo estão de acordo com os padrões mínimos sugeridos para o sêmen caprino, sendo 70% para motilidade e 3,0 para vigor no sêmen fresco e  $\geq 30\%$  de motilidade e  $\geq 2$  de vigor para o sêmen pós-descongelado.

A motilidade dos espermatozoides no sêmen fresco oscilou de 80% a 90% e o vigor de 3,67 a 4,6. Esses resultados encontrados para estas variáveis se assemelham aos de Bispo *et al.* (2011) que trabalhando com caprinos Saanen evidenciaram valores de motilidade entre 86,3% e 89,0% e vigor de 3,8 a 4,0. Bittencourt *et al.* (2007) trabalhando com o efeito da curva de resfriamento e do tempo de equilíbrio, encontraram média de 72% de motilidade e 4,10 de vigor em caprinos sem raça definida. Segundo Salvador *et al.* (2008) para obtenção de melhores resultados pós-descongelação é importante que a amostra inicial do sêmen apresente as características desejáveis segundo o CBRA (2013). A qualidade do ejaculado observada neste trabalho, levando em consideração a motilidade e o vigor do sêmen fresco, podem ser explicados pelo bom desenvolvimento e funcionamento testicular dos animais, boa libido, alimentação balanceada e, por serem reprodutores, estão sempre em avaliação.

No sêmen pós-descongelado houve diferença entre os animais quanto à motilidade e vigor, apresentando uma média de 50% e 2,5 respectivamente. Oliveira *et al.* (2011) avaliando espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS, encontraram motilidade de 54,5% para ACP-101® e 54,6% no TRIS. Bittencourt *et al.* (2006) trabalhando com o efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen criopreservado caprino sem raça definida, observaram com 4 horas de tempo de equilíbrio uma motilidade de 45% e 3,42 de vigor. Os animais A, B, C, E e F apresentaram os melhores resultados, com uma melhor conservação da motilidade e do vigor durante o processo de

criopreservação, diferentemente do animal D, no qual a motilidade e o vigor foram alterados negativamente pelo processo de criopreservação, apresentando motilidade (13,33%) e vigor (1,0).

Alguns fatores podem resultar na conservação da motilidade e do vigor espermáticos durante o processo de criopreservação, como tipo de diluente utilizado, crioprotetor, plasma seminal, curva de resfriamento, entre outros. O diluidor comercial Tolera-D® usado nesse estudo, é indicado para congelação de sêmen de ruminantes e tem em sua composição a lecitina da soja. Diluidores a base de lecitina são uma alternativa para substituir os que contêm em sua composição produtos de origem animal como lactose e gema de ovo. Ela contém uma fração lipoproteica de baixa densidade semelhante à gema do ovo e tem a capacidade de proteger a integridade da membrana fosfolipídica durante a criopreservação (FOROUZANFAR, 2010). Segundo Dalmazzo (2018), a lecitina de soja é uma alternativa viável para criopreservação de sêmen de cães. Chelucci (2015) trabalhando com caprinos da raça Sarda Bucks, observou que a viabilidade dos espermatozoides e a motilidade diminuiu significativamente após a criopreservação em comparação com o sêmen fresco em todos os diluidores testados, entretanto, essa diminuição foi menos acentuada quando a lecitina de soja foi adicionada a 1% de concentração no diluidor à base de Tris.

As diferentes respostas do sêmen pós-descongelado têm sido atribuídas à variação da composição do plasma seminal (WINDSOR, 1996). A relação das células espermáticas com as proteínas do plasma seminal tem mostrado efeitos benéficos na motilidade do sêmen ovino criopreservado (MAXWELL *et al.*, 2007). Almeida (2006) avaliando diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra o estresse oxidativo e danos aos espermatozoides equinos criopreservados, concluiu que a adição de plasma seminal protege contra a peroxidação lipídica durante a criopreservação. No decorrer do processo de congelação e descongelação do sêmen, o estresse oxidativo pode resultar na redução da motilidade e vigor espermáticos, além de poder fragmentar o DNA e provocar lesões de membrana plasmática e acrossomal, levando à diminuição da fertilidade do sêmen, pois produz alterações irreversíveis nas funções da célula espermática (BUCAK *et al.*, 2014; HAMMERSTED, 1993).

O sêmen criopreservado de todos os animais apresentou valores de motilidade e vigor inferiores aos do sêmen fresco, devendo-se isso ao fato do processo de congelação e descongelação causarem danos às células espermáticas. As etapas que ocorrem durante o processo de criopreservação do sêmen podem causar danos aos espermatozoides (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990), vindo a acarretar uma redução de 50% da viabilidade

espermática decorrente dos efeitos da temperatura e da osmolaridade, (AMMAN e PICKETT, 1987; THOMAS *et al.*, 1998). Esse processo promove um alto estresse celular e expõe as células espermáticas a condições extremamente desfavoráveis (PURDY, 2006), promovendo a formação de cristais de gelo intracelulares e aumento da concentração intracelular de solutos (MATEOS-REX e AGUILLAR, 1996). Devido à alta concentração de sais no meio durante o processo de criopreservação poderá ocorrer uma desidratação das células espermáticas, ocasionando alterações celulares, danos estruturais na membrana, desnaturação de proteínas e desarranjo das estruturas do citoesqueleto (GRAHAM, 1996).

### **Características do sêmen pós-descongelado analisado no Sistema de Análise de Sêmen Auxiliado por Computador (CASA)**

Os parâmetros analisados pelo sistema CASA foram motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP), velocidade curvalinear (VCL), velocidade progressiva (VSL) e velocidade média de trajeto (VAP) (Tabela 3). Na motilidade total e na motilidade progressiva dos espermatozoides foi observada diferença entre os reprodutores ( $P < 0,05$ ). Na comparação de médias para a velocidade curvilinear, velocidade progressiva e velocidade média do percurso também foi verificada diferença ( $P < 0,05$ ) entre os animais.

Tabela 3- Médias da motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP), velocidade curvalinear (VCL), velocidade progressiva (VSL) e velocidade média de trajeto (VAP) analisadas pelo sistema computadorizado CASA no sêmen de caprinos Saanen pós-descongelado.

Reprodutor	Variáveis				
	MOT %	MOP %	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	VAP $\mu\text{m/s}$
A	45,82 <sup>A</sup>	14,98 <sup>A</sup>	73,06 <sup>B</sup>	32,28 <sup>BC</sup>	45,86 <sup>BC</sup>
B	38,46 <sup>A</sup>	17,70 <sup>A</sup>	83,38 <sup>A</sup>	40,08 <sup>A</sup>	53,90 <sup>A</sup>
C	32,26 <sup>A</sup>	12,60 <sup>A</sup>	70,18 <sup>B</sup>	36,92 <sup>AB</sup>	48,12 <sup>AB</sup>
D	10,70 <sup>B</sup>	3,03 <sup>B</sup>	59,10 <sup>C</sup>	28,07 <sup>C</sup>	38,47 <sup>C</sup>
E	33,88 <sup>A</sup>	16,06 <sup>A</sup>	71,56 <sup>B</sup>	39,28 <sup>A</sup>	48,16 <sup>AB</sup>
F	48,50 <sup>A</sup>	17,40 <sup>A</sup>	74,52 <sup>B</sup>	34,68 <sup>ABC</sup>	47,34 <sup>B</sup>
<b>Média <math>\bar{x}</math></b>	36,67	12,30	72,88	35,73	47,58

Médias seguidas de letras maiúsculas sobscritas iguais na linha não diferem estatisticamente pelo teste Bonferroni ( $p > 0,05$ ).

O sistema computadorizado CASA é um procedimento que gera dados acerca das características cinéticas de um ejaculado fundamentando-se na avaliação individual das células (FERREIRA *et al.*, 1997; JANUSKAUSKA e ZILINSKAS, 2002). Os resultados apresentados pelos parâmetros espermáticos do sistema CASA mostraram diferenças entre os animais quanto a motilidade total e progressiva. Os resultados obtidos nesse estudo foram inferiores aos de Cavalcante (2003), que analisando o sêmen descongelado de bodes da raça Boer, encontrou com relação às motilidades total e progressiva, 51% e 21%, respectivamente. Tuli e Holtz (1995) observaram um percentual de redução da motilidade progressiva do sêmen caprino fresco para o pós-descongelado em torno de 46%. Segundo Sundaraman e Edwin (2006) o sêmen caprino sofre ações danosas sobre a motilidade total e progressiva e sobre a velocidade média da trajetória durante o processo de criopreservação.

Acredita-se que estas alterações podem acontecer em virtude das diferentes respostas de susceptibilidade a congelação que existe entre reprodutores (HAFEZ, 2004). A criopreservação causa mudanças na estrutura da membrana plasmática do espermatozoide, porém o efeito desse processo não foi o mesmo nos diferentes ejaculados obtidos. Essas diferenças podem estar associadas à variação individual de cada reprodutor, à habilidade do sêmen em resistir aos processos de congelação e descongelação, variações entre indivíduos e inclusive entre ejaculados (WATSON *et al.*, 2000; PERIS *et al.*, 2004). Diferenças entre ejaculados na qualidade do sêmen criopreservado tem sido observada em caprinos (DORADO *et al.*, 2010) e na fertilidade do sêmen ovino criopreservado após inseminação artificial (WINDSOR, 1996).

O processo de congelação do sêmen pode induzir perdas de proteínas da superfície espermática (LASSO *et al.*, 1994), além de causar alterações nos fosfolipídeos da membrana do espermatozoide (WOELDERS, 1997). Segundo Parks e Graham (1992) isso ocorre devido a facilidade encontrada para o deslocamento dos lipídeos e das proteínas e por serem covalentemente ligados. Os lipídeos dispõem de diferentes temperaturas de transição, alguns tipos se associam criando um domínio em gel, excluindo, assim, outros tipos de lipídeos que se encontram no estado líquido cristalino (WOELDERS, 1997; MEDEIROS *et al.*, 2002). Do mesmo modo como os lipídeos, as proteínas de membrana também são eliminadas por esse domínio (MEDEIROS *et al.*, 2002). Segundo Watson (2000), essas proteínas perdem suas funções que são essências para a integridade estrutural e transporte de íons. Considerando as funções específicas de proteção das proteínas do plasma seminal relacionadas ao processo de congelação do sêmen, acredita-se que a configuração, estrutura, taxa de expressão e a presença

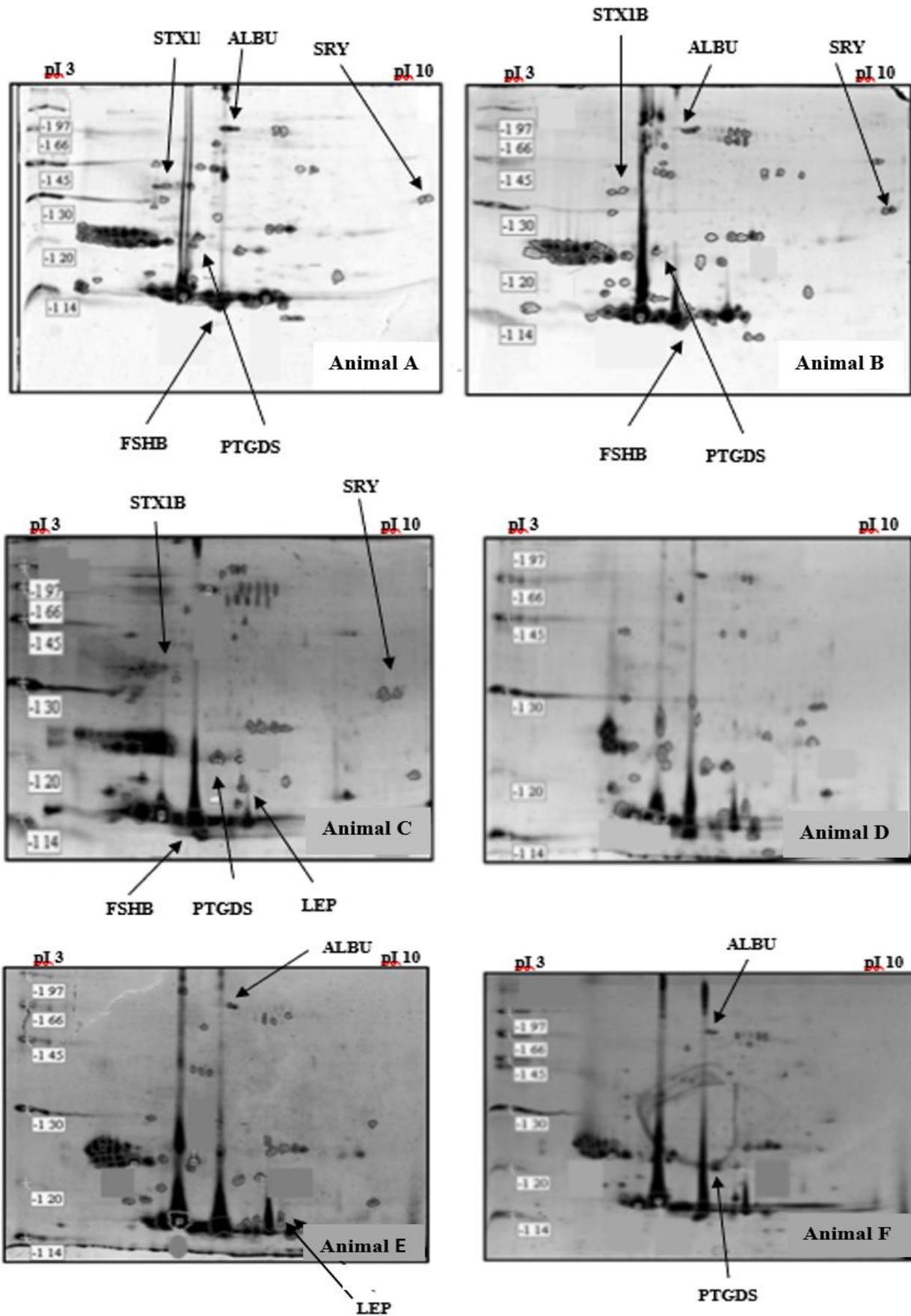
ou não destas no ejaculado podem interferir numa maior ou menor proteção durante o processo, resultando em diferentes respostas do sêmen no pós-descongelamento.

Nas análises do sêmen pós-descongelamento realizadas pelo sistema computadorizado CASA, o parâmetro velocidade curvilínea (VCL) variou de 59,10  $\mu\text{m/s}$  a 83,38  $\mu\text{m/s}$ . Já para velocidade progressiva (VSL) oscilou de 28,07  $\mu\text{m/s}$  a 40,08  $\mu\text{m/s}$ . A velocidade de trajeto (VAP) obteve resultados que variaram de 38,47  $\mu\text{m/s}$  a 53,90  $\mu\text{m/s}$ . Oliveira (2011) avaliando espermatozoides congelados caprinos da raça Saanen e Bôer com diluidor TRIS, encontraram valores de VSL (47,9  $\mu\text{m/s}$ ) e VAP (55,6  $\mu\text{m/s}$ ). Moura (2013) trabalhando com diferentes tipos de diluidores obteve valores de VCL que variaram de 66,70  $\mu\text{m/s}$  a 77,40  $\mu\text{m/s}$ ; VSL 36,45  $\mu\text{m/s}$  a 41,62  $\mu\text{m/s}$  e VAP 44,67  $\mu\text{m/s}$  a 57,62  $\mu\text{m/s}$  em caprinos Saanen e Toggenburg. CAVALCANTE *et al.* (2014) encontraram resultados de VCL 123,3  $\mu\text{m/s}$  e 116,1  $\mu\text{m/s}$  e para VAP 104,9  $\mu\text{m/s}$  e 101,7  $\mu\text{m/s}$ , respectivamente, em ovinos Santa Inês com sêmen criopreservado em TRIS e ACP-102.

Neste estudo, os resultados das três variáveis (VCL, VSL e VAP) que estão diretamente relacionadas a velocidade dos espermatozoides demonstram que o sêmen caprino pós-descongelado está de acordo com os valores encontrados na literatura. Esses três parâmetros são frequentemente empregados para descrição geral do movimento do espermatozoide (MORTIMER, 2000). Brito (2017) afirma que os parâmetros de velocidades também são importantes para avaliar o potencial de fertilidade do sêmen. Diante disso, é importante a análise dos padrões de movimento espermático, sendo esta variável considerada um fator da eficiência da criopreservação (FISER, 1982; CRISTANELLI, 1985; ARRUDA, 2000; NAGY, 2004). Cox *et al.* (2006) descreveram o trajeto da célula espermática de caprinos como relativamente rápida, e constataram uma ligação entre os parâmetros de velocidade com a eficiência no deslocamento do muco cervical caprino. Segundo Farrel *et al.* (1998), os parâmetros VCL e VSL estão relacionados à hiperatividade espermática, que é um padrão de motilidade observado nas células espermáticas que estejam no processo de capacitação.

## **Proteomica**

A eletroforese bidimensional proporcionou a identificação dos *spot's* proteicos, cujos géis de referência para cada animal podem ser visualizados na figura 1. Com ajuda do *Software ImageMaster 2D Platinum 7.0*, foi possível identificar a quantidade de *spot's* presentes para cada animal. Para a identificação das prováveis proteínas (*spot's*) foram usados seus valores de ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular (MW). O número de *spot's* variou de 115 (animal F) a 188 (animal A) e o número de *spot's* correspondentes (*Matches*) variou de 45 (animal F) a 122 (animal A). Os principais *spot's* específicos ligados à reprodução apresentaram peso molecular variando de 12 kDa a 66 kDa e pI de 4,37 a 9,57.



**Figura 1-** Eletroforese em gel de poliacrilamida (2DE) do plasma seminal de caprinos Saanen apresentando seus respectivos *spot's* proteicos. À esquerda de cada gel encontram-se os valores dos padrões de massa molecular (MW), os quais variam de 97,0 a 14,4 kDa e acima de cada gel os pIs de 3,0 a 10,0. Os *spot's* indicados pelas setas demonstram as prováveis proteínas que estão relacionadas a criopreservação do sêmen caprino da raça Saanen.

SOUZA *et al.* (2004) trabalhando com proteínas seminais de ovinos da raça Santa Inês, notaram que a maior parte das proteínas encontradas tinham peso molecular abaixo de 75kDa e pIs ácidos. Segundo Cardozo *et al.* (2006), proteínas com peso molecular entre 14-24kDa foram as principais encontradas no plasma seminal ovino da raça Rasa Aragonesa. Jobim *et al.* 2003 trabalhando com às espécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* encontraram 12 *spot's* proteicos com peso molecular variando entre 11 a 26kDa e pI 4,1-8,5, presentes nos animais de alta congelação do sêmen. Os resultados dos géis demonstram que os ejaculados dos reprodutores se assemelharam entre si no perfil proteico bidimensional do plasma seminal, além de se observar nos animais a presença de *spot's* específicos ligados à reprodução, em funções como: espermatogênese, maturação espermática, motilidade espermática, reação acrossômica, diferenciação de células germinativas espermatogênicas, entre outras.

As prováveis proteínas (*spot's*) presentes no sêmen dos animais da raça Saanen com seus pontos isoelétricos (pI), massa molecular (MW), frequência das proteínas e suas respectivas funções estão ilustrados na Tabela 4. Duas proteínas Ankyrin repeat SAM and basic leucine zipper e Inactive ribonuclease like protein 10 (ASZ1 e RNS10) foram observadas em 100% dos animais. As proteínas Inhibin beta A chain (INHBA) e Osteopontin (OSTP) estiveram presentes em 83% dos animais independente da resposta após o processo de criopreservação. Duas proteínas Serum albumin (ALBU) e Prostaglandin-H2 (PTGDS) estiveram presentes em 66% dos reprodutores, os quais eles apresentaram uma qualidade seminal satisfatória após a descongelação. As proteínas Follitropin subunit beta (FSHB), Sex-determining region Y protein (SRY) e Syntaxin 1B (STX1B) estiveram presentes em 50% dos animais, sendo encontradas especificamente nos animais que apresentaram bons resultados no pós-descongelamento. A proteína Leptin (LEP) esteve presente em 33% dos animais que apresentaram qualidade seminal satisfatória após a congelação. As proteínas Lutropin subunit beta (LSHB), Sorbitol desidrogenase (DHSO), Bombesin receptor subtype3 (BRS3), Prion-like protein doppel (PRND) e Proteína ligante de cálcio e integrina 1 (CIB1) estiveram presentes em 16% dos animais, sendo encontradas somente naqueles que apresentaram qualidade seminal satisfatória após a congelação.

Tabela 4- Prováveis proteínas (*spot's*) presentes no sêmen dos animais da raça Saanen com seus pontos isoelétricos (pI), massa molecular (MW), frequência das proteínas e suas respectivas funções.

Proteínas	pI	MW	Frequência	Função
RNS10- Inactive ribonuclease-like protein 10	5,03	20	100%	Fertilidade
ASZ1- Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper	5,77	53	100%	Atua na espermatogênese
OSTP- Osteopontin	4,37	29	83%	Imunidade e reprodução
ALBU- Serum albumin	5,58	66	67%	Proteína importante do plasma seminal
PTGDS- Prostaglandin-H2	5,78	18	67%	Sistema nervoso central e sistema reprodutor masculino
INHBA- Inhibin beta A chain	7,08	12	83%	Secreção hormonal
FSHB- Follitropin subunit beta	5,69	12	50%	Desenvolvimento dos folículos e espermatogênese
STX1B- Syntaxin 1B	5,25	33	50%	Regulação do cálcio na reação acrossômica
SRY- Sex-determining region Y protein	9,57	27	50%	Determinação do sexo masculino
LEP- Leptin	6,99	16	33%	Função reprodutiva
LSHB- Lutropin subunit beta	8,30	12	16%	Espermatogênese e ovulação
DHSO- Sorbitol desidrogenase	7,25	37	16%	Motilidade dos espermatozoides
BRS3- Bombesin receptor subtype3	9,14	44	16%	Maturação e função dos espermatozoides
PRND- Prion-like protein doppel	9,11	15	16%	Ligada à reação normal do acrossoma
C1B1- Proteína ligante de cálcio e integrina 1	4,61	21	16%	Diferenciação de células germinativas/espermatogênicas

Observa-se que as proteínas RNS10 (pI: 5,03 e Mw: 20 kDa) e ASZ1 (pI: 5,77 e Mw: 53 kDa) estão relacionadas com os processos fisiológicos das células espermáticas, porém, na literatura consultada não foi encontrada relação com o processo de criopreservação do sêmen. A RNS10 é uma proteína epididimária proximal necessária para a maturação do sêmen pós-testicular e fertilidade masculina, além de estar envolvida na ligação das células espermáticas à zona pelúcida do oócito (UNIPROT, 2018). A proteína ASZ1 exerce um papel central na espermatogênese, controlando elementos transponíveis e dificultando sua mobilização, que é fundamental para a integridade da linhagem germinativa e, também, poderá agir mediante interações proteína-proteína durante a maturação das células germinativas (UNIPROT, 2018).

A osteopontina é uma glicoproteína (pI: 4,37 e Mw: 29 kDa), que se uni as células espermáticas em razão da ejaculação (SOUZA *et al.*, 2008). Ela também auxilia na interação entre espermatozoides e oócitos ao longo da fertilização (MOURA, 2005). Segundo Gerena

(2000) e Cancel *et al.* (1997), essa proteína tem ação sobre alguns aspectos da membrana das células espermáticas, além da capacitação espermática. Jobim (2001) trabalhando com touros observou que a osteopontina foi predominante no plasma seminal nos animais de alta congelamento. De acordo Jobim *et al.* (2002), a ligação dessa proteína com a congelamento em bovinos é atribuída à modulação da função celular na membrana plasmática do espermatozoide, auxiliando na proteção da célula no processo de criopreservação do sêmen. A osteopontina foi encontrada tanto no animal que apresentou baixa qualidade seminal no pós-descongelamento, quanto nos animais que apresentaram uma boa resposta após o processo de criopreservação. Diante do que foi encontrado nesse estudo, sugere-se mais pesquisas sobre a osteopontina e sua relação com o processo de criopreservação do sêmen caprino.

UYSAL (2007) trabalhando com a qualidade do sêmen de carneiro congelado-descongelado, observou que várias concentrações de ALBU foram utilizadas para melhorar a motilidade e viabilidade pós-descongelamento dos espermatozoides, proteção do acrossoma e integridade da membrana, sendo os melhores resultados obtidos a partir de 20 mg / mL de ALBU. Em bovinos, verificou-se em animais de alta congelamento do sêmen a presença da ALBU com maior densidade óptica (JOBIM, 2001). A ALBU (pI: 5,58 e Mw: 66 kDa) é a principal proteína do plasma seminal e está envolvida na extração de colesterol da membrana plasmática (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000). Estudos mostraram que esta proteína sérica é benéfica à motilidade do sêmen de suínos, ovinos, equinos e coelhos, mas com pouco efeito na motilidade espermática do sêmen bovino (BAAS *et al.*, 1983). Diante desses relatos, sugere-se uma ligação desta proteína com a criopreservação do sêmen caprino da raça Saanen.

A PTGDS (pI: 5,78 e Mw: 18 kDa), segundo os dados obtidos pelo Uniprot (2018), desempenha papel importante tanto na maturação quanto na manutenção do sistema nervoso central e do sistema reprodutor masculino, além disso, a PTGDS funciona como um condutor de esteroides e lipídios que fornece hormônios tireoidianos e retinóides ao espermatozoide em amadurecimento (LEONE *et al.*, 2002). Dentre os achados da literatura, não foi possível encontrar uma associação dessa glicoproteína com o processo de criopreservação. Segundo Pierre Lescuyer (2005), essa proteína é encontrada em tecidos do coração, dos órgãos genitais e dos fluidos corporais (plasma seminal e urina). A PTGDS está localizada nas células de Sertoli e Leydig, nas ampolas, nas células epiteliais do epidídimo e em espécies como o ovino e equino, fazendo parte de 8% de todas as proteínas secretadas pelo epidídimo (FOUCHÉCOURT *et al.*, 1999; URADE e HAYAISHI, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2000).

De acordo com o Uniprot (2018), a INHBA (pI: 7,08 e Mw: 12 kDa) é uma subunidade da ativina e da inibina, que estão envolvidas na regulação de inúmeras funções como secreção de hormônios gonodais, secreção de hormônios hipotalâmicos e hipofisários, além do desenvolvimento e maturação de células germinativas. Kaipia *et al.* (1992) relataram que a expressão da INHBA em diferentes estágios do ciclo epitelial seminífero regula a espermatogênese. Lin *et al.* (2006) trabalhando com marcadores de genes candidatos para qualidade espermática e fertilidade de javalis, relataram uma associação significativa da proteína INHBA com as características de qualidade espermática. Apesar dessa proteína atuar na qualidade do sêmen, não foram encontrados trabalhos relacionando-a ao processo de criopreservação. Diante disso, sugere-se mais estudos sobre a INHBA e sua relação com o processo de criopreservação do sêmen em caprinos.

As proteínas SRY (pI: 9,57 e Mw: 27 kDa), STX1B (pI: 5,25 e Mw: 33 kDa) e FSHB (pI: 5,69 e Mw: 12 kDa) foram encontradas especificamente nos animais que apresentaram bons resultados no pós-descongelamento, possivelmente estão ligadas à proteção das células espermáticas durante o processo de criopreservação. Porém não foi encontrado na literatura trabalhos que relatem a relação dessas proteínas com a congelação-descongelação. A SRY é um regulador transcricional e está envolvido em diferentes aspectos da regulação gênica, além de agir como um indutor na determinação sexual masculina (UNIPROT, 2018). Segundo os dados Uniprot (2018), a STX1B está envolvida no acoplamento de vesículas sinápticas em zonas ativas pré-sinápticas e pode mediar a regulação de  $Ca^{2+}$  da reação acrossomal excitose no esperma. A FSHB é uma proteína que estimula o desenvolvimento do folículo e espermatogênese nos órgãos reprodutivos (UNIPROT, 2018).

Abdel-Khalek (2016) trabalhando com búfalos, revelou que a adição de 20 ng / mL de LEP ao diluidor Tris teve efeitos benéficos sobre a motilidade, habitabilidade e normalidade dos espermatozoides em sêmen diluído, equilibrado e descongelado. A LEP (pI: 6,99 e Mw: 16 kDa) foi adicionada ao sêmen de homens normospermicos e, após congelados e descongelados, observou-se que a leptina adicionada ao esperma capacitado melhorou a qualidade do DNA do espermatozóides após a criopreservação, possivelmente induzindo a atividade de certas enzimas antioxidantes (FONTOURA, 2016). Nesse estudo a LEP foi encontrada no sêmen de reprodutores que tiveram bons resultados após a criopreservação, sugerindo-se que essa proteína provavelmente esteja relacionada com o processo de congelação e descongelação do sêmen de caprinos. Segundo Conway e Jacobs (1997), a ação dessa proteína sobre a reprodução pode ocorrer de forma direta, quando ela age sobre as gônadas

promovendo o aumento na produção de esteroides sexuais, e indireta, através da sua atividade sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, cuja função é informativa sobre o estado nutricional do indivíduo, permitindo que o processo reprodutivo siga em frente quando houver reservas energéticas suficientes para reprodução.

Dentre os achados bibliográficos, não foi possível identificar uma relação das proteínas LSHB (pI: 8,30 e Mw: 12 kDa), DHSO (pI: 7,25 e Mw: 37 kDa), BRS3 (pI: 9,14 e Mw: 44 kDa), PRND (pI: 9,11 e Mw: 15 kDa) e a proteína CIB1 (pI: 4,61 Mw:21 kDa) com o processo de congelamento e descongelamento do sêmen, e como essas proteínas foram encontradas em um número pequeno de animais, sugere-se mais estudos sobre essas proteínas e sua relação com o processo de criopreservação do sêmen caprino. A proteína LSHB promove a espermatogênese e a ovulação, estimulando os testículos e os ovários a produzir esteroides, já a DHSO pode realizar um importante papel na motilidade das células espermáticas, gerando uma fonte energética para os espermatozoides (UNIPROT, 2018). Segundo os dados da Uniprot (2018) a proteína BRS3 tem papel na divisão, maturação ou função das células espermáticas e medeia sua ação por associação com proteínas G que ativam o sistema mensageiro secundário de fosfatidilinositol-cálcio. A PRND é essencial para a reação normal do acrossomo e para a fertilidade masculina normal e a proteína CIB1 é uma proteína de ligação ao cálcio que exerce um papel na regulação de processos celulares, tais como diferenciação celular, divisão celular, trombose, angiogênese, hipertrofia cardíaca e pode regular o ciclo celular e diferenciação de células germinativas espermatogênicas e /ou diferenciação de células de Sertoli de suporte (UNIPROT, 2018).

## CONCLUSÕES

O perfil proteômico do plasma seminal encontrado evidenciaram as seguintes proteínas: ASZ1, RNS10, INHBA, OSTP, ALBU, PTGDS, SRY, STX1B, LEP, LSHB, DHSO, BRS3, PRND e CIB1. Provavelmente algumas dessas proteínas estão relacionadas com a qualidade do sêmen caprino criopreservado. As possíveis proteínas são prostaglandina-H2, albumina, leptina, SRY, STX1B e FSHB. Como o número de animais foi pequeno, sugere-se a realização de outros estudos com expressivo número de caprinos e da espectrometria de massas para validação dessas proteínas como marcadores moleculares.

O diluidor Tolera-D® conferiu uma proteção na congelação e descongelação do sêmen, porém não existem dados publicados utilizando esse diluidor no sêmen caprino. Diante disso, sugere-se mais pesquisas relacionando o diluidor Tolera-D® com sêmen caprino.

Estudos sobre a proteômica e sua relação com a qualidade do sêmen pós-descongelado em caprinos são escassas se comparados as outras espécies, dessa forma, o presente estudo vem contribuir para o conhecimento do perfil proteômico do sêmen caprino da raça Saanen, e novas pesquisas devem ser realizadas no intuito de ampliar os conhecimentos sobre a influência das proteínas do plasma seminal sobre o sêmen criopreservado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L. **EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, p.772, 2006.

AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7; p- 145-173, 1987.

ARAGÃO, C. P. M. **Morfometria da cabeça de espermatozoides caprinos diluídos e criopreservados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c)**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2011.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo. 2000.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; GARCIA, A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, p.166-179, 2004.

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

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68. p. 275-280, 1983.

BISPO, C. A. S.; PUGLIESI, G.; PALHÃO, M. P.; COELHO, P. G. B.; KER, P. G.; RODRIGUES, M. T.; CARVALHO, G. R. Características in vitro e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 653-660, 2011.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO-FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p. 27-37, 2006.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO-FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. Criopreservação do sêmen caprino: efeito da curva de resfriamento e do tempo de equilíbrio. **Ciência Animal**, v. 17, n.2, p.75-82,2007.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.1, p.17-32, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BAŞPINAR, N.; UYSAL, O.; TAŞPINAR, M.; BILGILI A.; ÖZTÜRK, C.; GÜNGÖR, Ş.; İNANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, p.1–8, 2014.

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

CARDOSO, F. M.; QUEIROZ, G. F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam , v.17, p. 77 - 84 ,1988.

CARDOZO, J.A. et al. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(06\)00074-4](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(06)00074-4)>. Acesso em: 08 jun. 2018.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75. 2008.

CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; SALGUEIRO, C. C. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; NUNES, J. F. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). Univesidade de Brasília, DF. **Ciência Animal brasileira**, v.15, n.3, p. 344-353, 2014.

CAVALCANTE, T. V. **Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos da raça bôer e alpina durante as estações reprodutivas e não reprodutivas**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Jaboticabal, 2003.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, p. 104, 2013.

CHACUR, M. G. M.; MACHADO, NETO N. B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros. **Revista Veterinária e Zootecnia** v. 13, n.1, 2007.

CHELUCCI, S.; PASCIU, V.; SUCCU, S.; ADDIS, D.; LEONI, G. G.; MANCA, M. E.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, p. 1064-1074, 2015.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Collection and preservation of spermatozoa. In (Ed.) Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, 1.ed. FAO, p. 115-157, 1991.

CHENOWETH, P. J. Geneticspermdefects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.

CLARK, S. G.; SCHAEFFER, D. J.; ALTHOUSE, G. C. B-mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total of sperm numbers. **Theriogenology**, v.60, p.1011-1023, 2003.

CONWAY, G. S.; JACOBS, H. S. Leptin: a hormone of reproduction. **Human Reproduction**, v.12, p. 633–635, 1997.

CORRÊA, M. N.; MEINCKE, W.; LUCIA, J. R. T.; DESCHAMPS, J. C. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001.

COULTER, G. H.; FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to reproductive traits in cattle: a review. **Theriogenology**, New York, v. 11, p. 297-311, 1979.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.

COX, J. F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 83-87, 2007.

CRISTIANELLI, M. J.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effects off egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p.681-686, 1985.

D'AMOURS, O.; FRENETTE, G.; FORTIER, M.; LECLERC, P.; SULLIVAN, R. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. **Reproduction, Bristol**. v. 139, p. 545-56, 2010.

DALMAZZO, A.; LOSANO, J. D. A.; ROCHA, C. C.; TSUNODA, R. H.; ANGRIMANI, D. S. R.; MENDES, C. M.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D'ÁVILA.; NICHI, M.; BARNABE, V. H. Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. **Animal biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 174-182, 2018.

DIAS, J. C. O.; SANTOS, M. C. R.; PENITENTE FILHO, J. M.; OLIVEIRA, G. D.; MENDES, V. R. A.; MANCIO, A. B. Características do sêmen caprino descongelado após a adição de ringer lactato, citrato de sódio e solução tris. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.2, p.243-250, 2015.

DORADO, J.; RODRUGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168– 177, 2010.

DOTT, H. M.; HARRISON, R. A. P.; FOSTER, G. C. A. The maintenance of motility and the surfaces properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 113-124, 1979.

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v.17, p.2904–2911, 2002.

EVANS, G.; MAXWELL, W. Inseminacion artificial de ovejas e cabras. Zaragoza (España). **Editorial Acribia S. A.** 1990.

FARREL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOT, R.H. Quantification of bull sperm characteristics by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, n.4, p.871- 879, 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L .S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, p.1-16, 1997.

FISER, P. S.; AINSWORTH, L.; FAIRFULL, R. W. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. **Canadian Journal of Animal Science**, v.62; p.425-428, 1982.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochem Biophys Acta**, v. 1469, n. 3, p.197-235, 2000.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H. R.; NASR-ESFAHANI M. H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of RAM semen. **Theriogenology**, v.73, p.480–487, 2010.

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

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS pages characterization of the protein in equine seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v. 46, p. 579-591, 1996.

FREITAS, V. J. F. Biometria testicular de caprinos e ovinos criados no estado do Ceará. In: *Ciência Animal*, Fortaleza, v.1, p.51-63, 1991.

GAVIRAGHI, A.; DERIU, F.; SOGGIU, A.; GALLI, A.; BONACINA, C.; BONIZZI, L.; RONCADA, P. Proteomics to investigate fertility in bulls. **Veterinary Research Communication**, v. 34, p. 33-36, 2010.

GERENA, R. L. Immunocytochemical localization of lipocalin. Type prostaglandin D, synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 62, p. 547-556, 2000.

GOULARTE, K. L.; GASTAL, G. D. A.; SCHIAVON, R. S.; GONÇALVES, A. O.; SCHNEIDER, J. R.; CORCINI, C. D.; LUCIA JR, T. Association between the presence of protein bands in ram seminal plasma and sperm tolerance to freezing. **Animal Reproduction Science**, v.146, p. 165-169, 2014.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; SUAREZ, S. S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p.809-15, 2003.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ed., São Paulo: Manole, p. 530, 2003.

HAHN, J.; FOOTE, R. H.; SEIDEL JR., G. E. Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. **Journal of Animal Science**, v.29, n.1, p.41-47, 1969.

HAMMERSTEDT, R. H; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-86, 1990.

HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, v. 127, p.527-535, 2004.

JOBIM, M. I. M. **Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino**. 2001. 156f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores proteicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: CBRA, p. 15-23, 2009.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; CIMAROSTI, H. I.; MATTOS, R. C. Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen 1. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.296-305, 2002.

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

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; WAID, V. B. Biometria testicular em ovinos de raças de corte. I. Reprodutores racionados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.13, n.4, p.247-254, 1989.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v.39, p.1-8, 2002.

KAIPIA, A.; PENTTILA, T.L.; SHIMASAKI, S.; LING, N.; PARVINEN, M.; TOPPARI, J. Expression of inhibin beta A and beta B, follistatin and activin. **Endocrinology**, v.131, p. 2703-2710, 1992.

KAMAL.; GUBARTALLAH, A.; AHMED, A.; AMEL; BAKHIET, O.; BABIKER, A. Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen Bucks under the climatic conditions of Khartoun. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.4, n.11, p.942-944, 2005.

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

LASSO, J. L.; NOILES, E. E.; ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 255-65, 1994.

MAIA, M. S. **Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos**. (Circuito de tecnologias adaptadas para a agricultura) Natal: EMPARN, p. 20, v.13, 2010.

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

MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C. G. C. **Técnicas de control de lareproducción em ganado caprino**. In: Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a laproducción animal. Cuenca: Universidad de Castillala Mancha. p. 183-202, 1996.

MATOS, C. A.; THOMAS, D. L.; NASH, T. G.; STOOKEY, J. M. Genetic analyses of scrotal circumference size and growth in Rambouillet lambs. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 1, p. 43-50, 1992.

MATOS, M. N. C. **Efeito da sazonalidade no perfil de proteínas de espermatozoides em caprinos da raça Moxotó**. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2012.

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

MEDEIROS, C. M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MEDEIROS, A. S. L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. Botucatu, 2003. 113f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2003.

MORTIMER, S. T. CASA – Practical Aspects. **Journal Andrology**, v.21, p.515- 524, 2000.

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

MOURA, T. C. M.; SILVA, S. V.; ARRUDA, L. C. P.; SOUZA, H. M., SILVA, E. C. B.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. **Uso de antioxidantes não enzimáticos na criopreservação de sêmen caprino**. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX– UFRPE: Recife, 2013.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, P.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 43, 4 (suppl.), p.18-31, 2008.

MUKOSA-MUGERWA, E.; AZAZ, Z. Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. **Theriogenology**, v.38, p.979-988, 1992

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry, **Animal Reproduction Science**, v. 80, p.225-35, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **Nutrient requirements of Sheep**. Washington, D.C.: National Academy Press, p. 362, 2007.

OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 47, p.257-60, 1993.

OLIVEIRA, I. R. S.; ALVES, H. M.; CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; BEZERRA, A. C. D. S.; SILVA, A. R. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**. v.4, n.2, p.216-221, 2013.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; MOURA, A. A. A. N. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS [Evaluation of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water media based (ACP-101®) or TRIS]. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, n.6, p.1295-1302, 2011.

OSINOWO, O. A.; MARIRE, B. N.; EKPE, G. A. Preliminary study of postnatal growth and reproductive tract development in Yankasa rams. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 27, p. 49-54, 1992.

OTT, R. S.; MENON, M. A. Breeding soundness examinations of rams and bucks. In: Society of Theriogenology sheep and goat manual. Hastings, NE: **Society for Theriogenology**, v. 10, p.38, 1980.

PAULA, N. R. O. **Parâmetros clínicos, hematológicos, sorológicos e reprodutivos em reprodutores natural e experimentalmente infectados com CAEV**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, p.193, 2008.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992

PEÑA, A. I. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación**. 1997. 329f. Tese (Doutorado) - Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, 1997.

PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of ram semen facilitate sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 224–233, 2004.

- POYSER, N. L. Prostaglandins in reproduction. **Research Studies Press Chichester**, 1981.
- PRADO, R. B.; KOIVISTO, M. B.; CARREIRA, J. T.; PERRI, S. H. V.; RODRIGUES, L. H.; ATIQUE NETTO, H.; TORREGROSSA, T. L. G.; VICENTE, W. R. R.; FELICIANO, M. A. R. Efeito da utilização de diferentes diluidores para a produção in vitro de embriões bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1118, 2012.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.
- RODRÍGUEZ, C. M.; DAY, J. R.; KILLIAN, G. J. Expression of the lipocalin-type prostaglandin D synthase gene in the reproductive tracts of Holstein bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, Bristol, v.120, p.303-309, 2000.
- SALLES, M. G. F. **Parâmetros fisiológicos e reprodutivos de machos caprinos Saanen criados em clima tropical**. 2010. 168f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 2010.
- SALVADOR, D. F.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R.; DIAS, J. C.; NOGUEIRA, L. A. G. Relationship between andrologic profile and semen freezing in twoyear-old Nelore bulls, pre-select by breeding soundness evaluation (BSE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 60, 2008.
- SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.159-167, 2008.
- SANTOS, E. A.; TEIXEIRA, D. I. A.; LOPES JUNIOR, E. S.; CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, I. B.; PAULA, N. R. O.; PIMENTEL, N. C.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Características seminais, perímetro escrotal e comportamento sexual de bodes Saanen explorados em região litorânea do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p.218-219, 2001.
- SAS 9.2.SAS Institute Inc. SAS Online Doc. 9.2. Cary, NC: **SAS Institute Inc.** 2009.
- SILVA, T.A.S.N. **Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos**. 2014.102 f. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília. 2014.
- SILVA, N. M.M. **Proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Ceará. 2010.
- SILVA, T. A. S. N. **Proteínas do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação espermática em ovinos**. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, p. 102, 2014.

SOUZA, C.E.; MOURA, A.; OLIVEIRA, J.T.; RADIS-BAPTISTA, G.; ARAUJO, A.; LIMA, A. Seminal plasma proteins, testis development and sêmen criteria in the ram. In: Annual Meeting of the American Society of Andrology, 29., 2004, Baltimore, Maryland. Proceedings... Baltimore: **American Society of Andrology**, p. 91, 2004.

SOUZA, C. E.; MOURA, A. A.; MONACO, E.; KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins BSP A1/A2, BSP 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 72-89, 2008.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; LIMA, A. C. B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, p. 196-199, 2001.

SOUZA, A. F.; LEITÃO, M. C. G.; BATISTA, A. M.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L.; GUERRA, M. M. P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v. 39, p.1155-1161, 2009.

SOUZA, J. A. T.; COSTA, F. A. L. Características do sêmen e correlação com outros parâmetros reprodutivos em ovinos deslanados. In: SIMPOSIO EM CIENCIAS AGRARIAS – Pesquisas com caprinos e ovinos no CAA, Teresina, **Anais...** Teresina:UFPI, 1992. p. 80-86, 1992.

SUNDAMARAN, M. N.; EDWIN, M. J. Cryopreservation of Boer goat spermatozoa during cryopreservation cycle. **Online Journal of Veterinary Research**, v.10, n.21, p.117-124, 2006.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349-360, 2015.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology and Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

TULI, R. K., HOLTZ, W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, v. 43, p. 1359- 1363, 1995.

UNIPROT. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 07 junh 2018.

URADE, Y., HAYAISHI, O. Prostaglandin D synthase: structure and function. **Vitamins and Hormones**, Amsterdam v.58, p.89-120, 2000.

UYSAL, O.; BUCAK M. N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 76, p. 383– 390, 2007.

VASCONCELOS, C. **A proteômica na seleção de reprodutores ovinos (Ovis aries) da raça Morada Nova**. 2017. 63f. Dissertação (Zootecnia) Universidade Estadual Vale do Acaraú. 2017.

VIERULA, M.; RAJANIEMI, H. Effect of seminal plasma and calcium on the stability of the surface protein composition of ejaculated bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 3, p. 435-445, 1983.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 481-492, 2000.

WINDSOR, D. P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 21-29, 1996.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v. 19, n. 3, p. 135-138, 1997.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. 2nd ed. New York, NY: Raven Press, p. 189-317, 1994.

YARNEY, T.A.; SANFORD, L.M.; PALMER, W.M. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of post-pubertal reproductive function. **Canadian Journal of Animal Science**, vol. 70, p. 139, 1990.

YUAN, Y. Y.; CHEN, W. Y.; SHI, Q.; ROLDAN, E. R. S. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 904-913, 2003.