

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA DE SOBRAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA NÁGILA CARNEIRO MATOS

**EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL DE PROTEÍNAS DE
ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS DA RAÇA MOXOTÓ**

SOBRAL

2012

MARIA NÁGILA CARNEIRO MATOS

**EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL DE PROTEÍNAS DE
ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS DA RAÇA MOXOTÓ**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

SOBRAL

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- M382e Matos, Maria Nágila Carneiro.
Efeito da sazonalidade no perfil de proteínas de espermatozóides de caprinos da raça moxotó.
Maria Nágila Carneiro Matos. – 2012.
70 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2012.
- Área de Concentração: Macromoléculas.
Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.
Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.
1. Proteômica. 2. Biomarcadores. 3. Fertilidade. I. Título.

CDD 660.6

MARIA NÁGILA CARNEIRO MATOS

**EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFIL DE PROTEÍNAS DE
ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS DA RAÇA MOXOTÓ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas

Aprovada em: 28/02/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, José Osterno de Matos e Maria
de Fátima Carneiro Matos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me concedido sabedoria e forças para vencer todas as dificuldades.

Aos meus pais, razão da minha existência, pelo carinho, amor, educação e os ensinamentos que a mim foram dados.

Ao Prof. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, pela orientação, pela oportunidade de participar da sua equipe, onde adquiri novos conhecimentos e realização profissional, também agradeço pela serenidade e carinho que são comuns a todos e por deixar o ambiente de trabalho sempre harmonioso.

Ao Prof. Celso Shiniti Nagano pela orientação e confiança.

Ao Prof. Benildo Sousa Cavada, que inicialmente foi o meu Orientador, agradeço pela confiança e por continuar fazendo parte da sua equipe.

Ao Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira (*In memoriam*) pela orientação e acompanhamento dos primeiros passos dados na pesquisa científica, que DEUS o conceda junto dele.

Ao Prof. João Batista Cajazeiras pela participação como membro da banca.

Ao João Garcia Alves Filho por todo o apoio, ajuda e disponibilidade prestada na concretização desse trabalho.

Ao Raulzito e Aurea Morgana pela ajuda, dedicação e apoio que me deram durante a realização desse trabalho.

À Roberta Vianna pela realização das coletas de sêmen ao longo do ano e por todos os ensinamentos em reprodução animal.

À Profa. Ângela Eloy pelo apoio e ensinamentos.

À Embrapa Caprinos e Ovinos por ter disponibilizado os animais, ao laboratorista José Nóbrega pela contribuição na análise do sêmen, João Ricardo por toda a disponibilidade sempre prestada e a todos que colaboraram no manejo e transporte dos animais.

Ao Daniel de Brito pela amizade, companheirismo e incentivo durante esses anos.

Ao Ricardo Bastos pela amizade e contribuição na análise estatística.

À Cleane e Vitória pela ajuda e treinamento na análise dos géis bidimensionais.

À Auxiliadora, Gleiciane, Nayanne, Crislay, Aurilene, Jedson, Francisco, Amélia, Mariana, Tatiana, Flávia, Débora, Bruno e Mônica pelo apoio, amizade e pelos dias de trabalho compartilhados.

Ao Frei Juan Manuel e Frei Francisco pelo o apoio, incentivo e ensinamentos.

Ao meu namorado Daniel Silva pelo o amor, carinho, compreensão e por compartilhar todas as alegrias e dificuldades.

Aos meus irmãos queridos Antonia Lúcia, Marcleide, Reginaldo, Dágina, Daiane, Washington e Mateus pelo o afeto, unidade e companheirismo.

À minha amiga-irmã Joice que participou de toda a minha trajetória em Sobral, obrigada por todos os momentos alegres e tristes que passamos juntas, com você aprendi o verdadeiro sentido da amizade.

À Verônica, Mônica, Viviane, Telma, Joséires e Jéssica verdadeiras companheiras, amigas, irmãs, agradeço pelo afeto, amizade e o apoio incondicional que sempre me deram.

Ao Wagner e Leidy pelo carinho e amizade.

Aos colegas de mestrado Anderson, Daniele, Daniel, Ellen, Flávio, Gisvani, Gleiciane, Joséires, Juliane, Luciana, Manu, Nairley, Robério e Ronaldo por todos os momentos vividos durante esses anos.

A todos que participam do movimento dos Focolares de Sobral, obrigada pelos vários momentos de oração, unidade e fraternidade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará por contribuir na minha formação profissional.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

“Nada do que é feito por amor é pequeno”.

Chiara Lubich

RESUMO

Estudos proteômicos da célula espermática podem contribuir para a utilização do potencial biológico reprodutivo através do mapeamento de biomarcadores de fertilidade. O presente trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito da sazonalidade no perfil proteico de espermatozóides da raça caprina Moxotó, visando à identificação de marcadores de fertilidade. Foram utilizados seis reprodutores em idade reprodutiva (24 a 36 meses) para a coleta de sêmen em vaginal artificial, a qual foi realizada semanalmente durante os períodos seco e chuvoso. Após a coleta, o sêmen foi submetido à avaliação dos parâmetros espermáticos (motilidade, vigor, concentração e volume espermático). O perfil das proteínas espermáticas foi obtido através da técnica de eletroforese bidimensional (2D). A análise dos parâmetros seminais não apresentou diferenças significativas entre os períodos. Foram detectados 330 e 246 *spots* em géis 2D para os períodos chuvoso e seco, respectivamente. A distribuição dos *spots* pelo ponto isoelétrico nos dois períodos estudados, encontram-se majoritariamente concentrados na faixa de pH de 5 a 6, tanto no período seco (PS) quanto no período chuvoso (PC) essa região contém cerca de 50% do total de proteínas. Em relação à massa molecular as proteínas de 20-40 kDa apresentaram maior frequência ao longo do ano. Observou-se a presença de 56 *spots* similares e com expressão constante nos seis animais. As diferenças qualitativas e quantitativas foram observadas entre os períodos, destacando-se o *spot* 349 que esteve presente apenas no PC, enquanto que os *spots* 566 e 1115 foram diferencialmente expressos no PS. Foram identificadas ainda diferenças individuais e estas parecem estar correlacionadas com os parâmetros espermáticos avaliados. De uma forma geral observou-se maior expressão de proteínas no PC. Em conclusão, os resultados apontam influência da sazonalidade na expressão de algumas proteínas, as quais podem ser fortes candidatas a biomarcadores de fertilidade e podem estar relacionadas a várias características do espermatozóide como maturação, capacitação, reação acrossômica e interação entre os gametas.

Palavras-chave: Proteômica. Espermatozóides. Biomarcadores. Caprino. Raça Moxotó

ABSTRACT

Proteomic studies of sperm cells may contribute to the biological reproduction potential by mapping biomarkers of fertility. The present study aims to evaluate the effect of seasonality on the protein profile of sperm from Moxotó breed goats, in order to identify markers of fertility. We used six animals in reproductive age (24-36 months) for the collection of semen in artificial vagina, which was carried out weekly during the dry and rainy seasons. After collection, semen was submitted to evaluation of sperm parameters (motility, vigor, concentration and testis volume). The profile of sperm proteins was obtained using the two-dimensional electrophoresis technique. Analysis of seminal parameters showed no significant differences between periods. We detected 330 and 246 spots for 2D gels representing the rainy and dry seasons. The distribution of spots through isoelectric point in the two study periods are concentrated in the pH range 5-6, both in the dry season (PS) and in the rainy season (PC) this region contains about 50% of the total protein. Regarding the molecular weight of 20-40 kDa proteins showed greater frequency over the years. It was observed the presence of 56 spots similar and constant expression in six animals. The qualitative and quantitative differences were observed between the seasons, highlighting the 349 spot that was present only in the PC, while the 566 and 1115 spots were differentially expressed in the dry season. Individual differences have been identified yet and it seems to be correlated with sperm parameters evaluated. In general there was greater expression of proteins in the PS. In conclusion, the results show the influence of seasonality on the expression of some proteins, which may be strong candidates for biomarkers of fertility and may be related to some characteristics such as sperm maturation, capacitation, acrosome reaction and interaction between the gametes.

Keywords: Proteomics. Spermatozoa. Biomarkers. Goats. Moxotó breed

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros espermático (motilidade, vigor, concentração e volume) de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco e chuvoso	35
Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão da concentração de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtida dos seis animais nos períodos seco (PS) e chuvoso (PC).....	37
Tabela 3 - Valores de coeficiente de correlação linear entre as replicatas de géis bidimensionais obtidos dos seis animais analisados nos períodos seco e chuvoso	39

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A célula espermática	18
Gráfico 1 -	Comparação dos parâmetros espermáticos do sêmen de caprinos da raça Moxotó colhido nos períodos seco e chuvoso. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$)	34
Figura 2 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% de proteínas de espermatozoides de caprinos da raça Moxotó no período seco e chuvoso	37
Figura 3 -	Perfil bidimensional de proteínas de espermatozoides de caprinos da raça Moxotó	38
Gráfico 2 -	Gráficos de dispersão das duplicatas de géis 2D considerando o parâmetro porcentagem do volume dos <i>spots</i> nos períodos seco com um coeficiente de correlação linear de 0,988 (A); e do período chuvoso com coeficiente de correlação linear de 0,992 (B)	39
Gráfico 3 -	Número médio de <i>spots</i> por indivíduo em géis bidimensionais (pH 4-7 de 13 cm) nos períodos chuvoso e seco. As letras de A-F representam os animais utilizados nesse estudo. A diferença entre os números de <i>spots</i> entre cada indivíduo é dada em porcentagem	40
Gráfico 4 -	Distribuição do número médio de <i>spots</i> em diferentes faixas de pH nos períodos seco e chuvoso	41
Gráfico 5 -	Distribuição do número médio de <i>spots</i> em relação à massa molecular (MW) nos períodos seco e chuvoso	42
Gráfico 6 -	Distribuição das categorias funcionais nos períodos seco e chuvoso. As identificações foram feitas a partir de géis bidimensionais de referência através da comparação de pI e massa molecular no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy	43
Figura 4 -	Proteínas diferencialmente expressas nos períodos seco (PS) e chuvoso (PC). O <i>spot</i> 349 presente apenas no PC e os <i>spots</i> 566 e 1115 (representados pelo gel de referência) foram mais expressos no PS	45
Figura 5 -	Proteínas diferencialmente expressas no reprodutor C. O <i>spot</i> 534 foi mais expresso no PC enquanto que o 1217 apresentou nível de expressão maior no PS	48
Figura 6 -	No reprodutor E os <i>spots</i> 486 e 269 apresentaram maior expressão	

	no período chuvoso	50
Figura 7 -	Proteína diferencialmente expressa no reprodutor B no período	
	chuvoso	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Eletroforese Bidimensional
ADAM	Proteína Desintegrina e Metaloproteinase
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
BSPs	Proteínas ligadoras de fosfolipídeos
CBRA	Conselho Brasileiro de Reprodução Animal
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
CRISP1	Proteína secretória rica em cisteína 1
DTT	Ditiotreitol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por eletrospray
FMP	Proteína da motilidade progressiva
GSHPx	Glutathiona peroxidase
HSP70	Proteína de choque térmico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IPG	Gradiente de pH Imobilizado
kDa	Kilodalton
LMW	Marcador de baixo peso molecular
MALDI	Ionização/Dessorção a laser auxiliado por matriz

MS	Espectrometria de massa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PACAP	Peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Período chuvoso
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PKA	Proteína quinase A
PS	Período seco
RA	Reação Acrossômica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SRD	Sem raça definida
TCP 11	Proteína do complexo-T humano 11
TSPY	Proteína codificada Y específica do testículo
ZP3	Glicoproteína da zona pelúcida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Espermatogênese	17
2.2	O espermatozoide	17
2.3	Maturação Espermática	19
2.4	Capacitação Espermática	20
2.5	Reação Acrossômica	21
2.6	Plasma Seminal	23
2.7	Estacionalidade Reprodutiva	25
2.8	Proteômica	27
2.9	Proteômica da célula espermática	28
3	OBJETIVO	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivo Específico	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Animais Experimentais	31
4.2	Coleta de Sêmen	31
4.3	Avaliações espermáticas	31
4.4	Extração de Proteínas	32
4.5	Dosagem de proteínas totais	32
4.6	Eletroforese Bidimensional	32
4.7	Identificação das Proteínas	33
4.8	Análise Estatística	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Avaliação Espermática	34
5.2	Análise do perfil protéico dos espermatozoides	36
5.3	Classificação funcional das proteínas de espermatozoides	42
5.4	Proteínas diferencialmente expressas	44
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS	54
8	ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura apresenta grande potencial produtivo e contribui para o desenvolvimento socioeconômico no Brasil, sobretudo na região semi-árida do nordeste, fornecendo couro, leite e carne, sendo estas últimas fontes de proteína animal para a população. O aumento da exploração na criação de caprinos intensificou os sistemas de produção, que visa melhorar os índices de produtividade e, conseqüentemente, gerar negócios altamente lucrativos.

No nordeste brasileiro concentra-se o maior rebanho de caprinos do país, sendo o estado da Bahia o que apresenta o maior efetivo de caprinos com 2.847.148 cabeças; o Ceará ocupa a quarta posição na distribuição do rebanho caprino no nordeste e a cidade de Tauá é a que contém o maior número de cabeças (68.519) segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). Algumas raças da espécie *Capra hircus* apresentam boa adaptação às condições climáticas do semi-árido nordestino. Isso decorre da seleção natural a que foram submetidas ao longo dos anos, desde sua introdução no Brasil no período colonial (OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Nessa espécie encontram-se os animais sem raça definida (SRD), ou seja, sem padronização racial definido e ainda os que se referem aos animais padronizados, incluindo dentre outros, a raça Moxotó. Essa raça é nativa do nordeste do Brasil, originária do vale do Rio Moxotó, no estado de Pernambuco e caracteriza-se por apresentar pequeno porte, pelagem uniforme, boa prolificidade, alta rusticidade, precocidade reprodutiva e resistência às doenças, porém sem aptidão definida (SANTOS *et al.*, 2005; ELOY, 2010).

Devido o grau de adaptação das raças nativas às condições adversas do semi-árido, estas estão sendo usadas de forma desordenada como rebanho base em programas de cruzamento com raças exóticas de interesse comercial, com o intuito de melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos locais (PAIVA *et al.*, 2008). Contudo, essa atividade vem colocando em risco o padrão genético de tais raças, assim como, a perda de marcadores moleculares de interesse econômico que ainda não foram caracterizados.

Embora a raça Moxotó seja considerada um recurso biológico dotado de grande variabilidade genética, é pouco os estudos realizados sobre a fisiologia reprodutiva desses animais.

Uma série de procedimentos são utilizados atualmente para mensurar a fertilidade de animais, que vai desde medições da biometria testicular, observações de nível celular, como a motilidade, morfologia espermática, integridade/reação acrossômica, bem como, os parâmetros a nível molecular. Um exemplo é a análise proteômica que permite estudar o conjunto de proteínas expressas em uma célula, sendo que através dessa análise é possível elucidar de forma mais precisa os mecanismos envolvidos no processo de fecundação.

Assim, o estudo do proteoma da célula espermática poderá esclarecer como essa raça adquiriu adaptabilidade ao semi-árido, fornecendo um conhecimento mais detalhado das proteínas que poderão ser utilizadas na produção de animais mais especializados, bem como, para a seleção de reprodutores mais férteis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo cíclico que dá origem ao gameta masculino, formado nos túbulos seminíferos dos testículos (CHENG *et al.*, 2004), os quais são envolvidos pelas células de Sertoli que nutrem e dão suporte para as células germinativas (HESS; FRANÇA, 2005). O processo espermatogênico inclui multiplicação e diferenciação celular, onde as células-tronco (espermatogônias) sofrem diversas modificações a nível celular e molecular até a completa formação dos espermatozoides (SHIVAJI *et al.*, 1990).

A espermatogênese compreende as fases de espermatocitogênese e espermiogênese. A espermatocitogênese é uma fase em que as espermatogônias passam por várias divisões mitóticas e meióticas para gerar espermatócitos primários e secundários que, por sua vez, origina a espermatíde (EDDY, *et al.*, 1993). Cada espermatíde passa pelo fenômeno da espermiogênese, que corresponde ao processo de diferenciação celular para formação dos espermatozoides. As espermatídes sofrem uma série de modificações morfológicas para serem transformadas em espermatozoides. Incluindo condensação da cromatina nuclear, formação da cauda e o desenvolvimento do acrossomo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

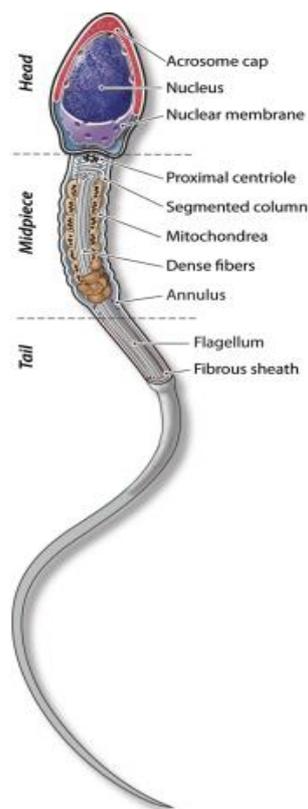
Nessa fase, a formação de novos RNAs mensageiros e a síntese de proteínas são processos celulares imprescindíveis, pois inúmeras proteínas devem ser geradas para garantir a correta organização interna dos espermatozoides e o sucesso da espermiogênese (SILVA, *et al.*, 2003). As histonas e as proteínas de transição nuclear organizam o DNA na cromatina altamente condensada e as HSP70 (Proteína de choque térmico) que surgem e protegem o espermatozoide do choque térmico, evitando patologias em animais criados em condições climáticas adversas (WARD *et al.*, 1999; YU *et al.*, 1999; EDDY, 1999; SILVA, *et al.*, 2003).

2.2 O espermatozoide

Os espermatozoides são células haplóides constituídas por cabeça e flagelo (cauda) e é totalmente recoberto pela membrana plasmática (Figura 1). A cabeça tem como principal característica um núcleo achatado e oval que contém cromatina altamente

condensada, constituída por DNA complexado por protaminas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A forma, tamanho e estrutura da cabeça podem variar segundo a espécie. A superfície da cabeça do espermatozóide possui diferentes regiões (subdomínios) com funções importantes e distintas no proceso de fertilização, sendo distinguidas em cume apical que reconhece e liga-se especificamente à zona pelúcida do ócito, na região pré-equatorial uma área maior da superfície da cabeça do esperma que está envolvida na reação acrossômica, liberando componentes do acrossomo como as proteínas acrosina e hialuronidase que são necessárias para a zona de penetração e o segmento equatorial da cabeça, que permanece intacta após a reação acrossômica sendo essa área específica para o reconhecimento e fusão com a membrana plasmática do oócito, o oolema (VAN GESTEL, *et al.*, 2007; YANAGIMACHI, *et al.*, 1994; FLESCH e GADELLA, 2000; VJUGINA, *et al.*, 2009).

Figura 1. A célula espermática.



Fonte: DU PLESSIS *et al.*, 2011.

A cauda é constituída por colo ou peça de conexão, peça intermediária, principal e terminal. No centro da cauda encontra-se o axonema que consiste em nove pares de microtúbulos dispostos ao redor de dois filamentos centrais (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A peça intermediária contém uma elevada quantidade de mitocôndrias, as quais são responsáveis pela

produção de energia, necessária para a motilidade espermática (BEDFORD; HOSKINS, 1990). A peça principal é composta de axonema em associação com fibras grosseiras que fornecem estabilidade aos elementos contráteis da cauda e a peça terminal que se encontra na parte final da camada de fibras e possui principalmente axonema envolvido pela membrana plasmática sendo este responsável pela motilidade do espermatozoide (HAFEZ.; HAFEZ, 2004).

O espermatozoide é considerado uma célula altamente polarizada e especializada, com morfologia, estrutura, função e composição específica, comparadas a outras células (ROUSSEAU *et al.*, 2005). Possui pouco citosol e organelas (EDDY; O'BRIEN, 1994). Segundo Boerke e colaboradores (2007), os espermatozoides não possuem retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisossomos, ribossomos e não são capazes de expressar genes, tanto a nível transcricional quanto traducional. A elevada compactação do DNA mediada por protaminas, impossibilita a ligação de fatores de transcrição e a síntese de novos RNAs (CARREL *et al.*, 2007). Assim, os espermatozoides são transcricionalmente inertes (KIERZENBAUM; TRES, 1975).

2.3 Maturação Espermática

Os espermatozoides são transportados dos túbulos seminíferos para o epidídimo, onde passam por um processo de maturação que os tornam capazes de fecundar o oócito. Nesse processo os espermatozoides adquirem novas características e aumentam progressivamente a motilidade (ZENICK *et al.*, 1994). Essas mudanças são adquiridas durante o trânsito epididimário (GATTI *et al.*, 2004).

A maturação espermática tem início na cabeça do epidídimo, passa pelo corpo e segue até a cauda, é um evento que inclui modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, como alterações na composição e propriedades da membrana (OLIVA, 2009). Incluindo modificações no teor de lipídios (RANA *et al.*, 1991), mudanças superficiais de glicoconjugados (TULSIANI *et al.*, 1998b; TULSIANI, 2003) alterações nas proteínas de membrana, estabilização da cromatina nuclear, compactação de fibras da cauda (MOORE; HIBBIT, 1976; AMANN, 1993; GATTI *et al.*, 2004; BAKER *et al.*, 2005) e obtenção de novas proteínas (DACHEUX; VOGLMAYR, 1983; HANCOCK *et al.*, 1993; MIRANDA *et al.*, 1995). Parte dessas alterações ocorridas no espermatozoide é induzida pelas proteínas do fluido epididimário (DACHEUX *et al.*, 2005).

A atividade secretória das células do epitélio epididimal é essencial no processo de maturação espermática. Essas células exibem regiões específicas para secretar proteínas com funções distintas. As proteínas secretadas pelo o corpo e cabeça do epidídimo estão envolvidas na aquisição da motilidade e na habilidade do espermatozoide de se ligar a zona pelúcida e fundir-se com o oócito, enquanto que as liberadas pela cauda são requeridas para o armazenamento dos espermatozoides e para mantê-los potencialmente viáveis e férteis (GIROUARD *et al.*, 2009).

Muitas das proteínas epididimais associadas à membrana espermática têm um papel importante na habilidade de fertilização do espermatozoide. Uma dessas proteínas é a CRISP 1 (proteína secretória rica em cisteína 1). Estudos em ratos demonstram que o envolvimento dessa proteína na maturação espermática é dependente de zinco presente no fluido epididimal (MALDERA *et al.*, 2011). Essa interação proporciona a associação dessa proteína com a superfície do espermatozoide durante o transito epididimal (COHEN *et al.*, 2011).

Proteínas pertencentes ao grupo da FMP (proteína da motilidade progressiva) induzem a motilidade espermática e eleva os níveis de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (SHIVAJI *et al.*, 1990; JAISWAL; MAJUNDER 1998). Ijiri e colaboradores (2011), estudando proteínas das diferentes regiões do epidídimo em camundongos, identificaram proteínas relacionadas ao metabolismo energético, importantes para obtenção da motilidade e proteínas estruturais oriundas da cabeça epididimal.

Baker e colaboradores (2005) sugerem que a fosforilação no resíduo serina da subunidade β da F1-ATPase mitocondrial pode contribuir para os mecanismos pelos os quais a motilidade é conferida aos espermatozoides durante a maturação espermática. Esse evento é dependente de AMPc que age sobre as proteínas quinases. Sendo, portanto, imprescindível à participação das modificações pós-traducionais para que os espermatozoides possam ser biologicamente funcionais.

Durante a maturação dos espermatozoides há ainda alterações nos níveis de AMPc, pH intracitoplasmático e cálcio que atuam como mensageiro intracelular, controlando a motilidade e metabolismo da célula espermática (JONES, 1996).

2.4 Capacitação Espermática

Ao saírem do epidídimo os espermatozoides possuem a capacidade de movimentarem-se ativamente, porém ainda não estão aptos a fecundar o oócito (MAXWELL;

JONSHON, 2000). Essa habilidade é adquirida no trato reprodutor feminino, onde os espermatozoides sofrem diversas modificações moleculares e fisiológicas (GADELLA *et al.*, 2001) que aumenta a competência de fertilização.

Durante a capacitação espermática ocorrem mudanças na membrana plasmática incluindo alteração de propriedades de membrana, como potencial e composição, mudanças na atividade enzimática, modulação na expressão de constituintes intracelulares, difusão lateral de lipídeos e proteínas, alteração no metabolismo de fosfolipídeos e redução no teor de colesterol (YANAGIMACHI, 2006). Essa diminuição de colesterol e ácidos graxos aumenta a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática favorecendo a capacitação e reação do acrossoma (YANAGIMACHI, 1994). Também ocorrem alterações das glicoproteínas periféricas e rearranjo das proteínas integrais, (BLONDIN *et al.*, 2009). Há influxo de cálcio e bicarbonato que estimula a atividade da adenilil ciclase solúvel e conseqüentemente eleva os níveis de AMPc intracelular (BAKER *et al.*, 2010). Esse aumento de AMPc está envolvido na motilidade progressiva do espermatozoide (ESPOSITO *et al.*, 2004; XIE *et al.*, 2006) e na ativação da proteína quinase A (PKA) para fosforilar certas proteínas (BREITBART, 2002). A fosforilação de resíduos de tirosina de algumas proteínas na membrana plasmática do flagelo e da cabeça espermática ajuda a aumentar a afinidade espermática com a zona pelúcida (PUKAZHENTHI *et al.*, 1998). Durante a capacitação também ocorre aumento na polimerização de actina e da fosfolipase ligada à membrana (BREITBART, 2002).

A metamorfose funcional da célula espermática durante a capacitação é acompanhada por modificações pós-traducionais, sendo que a fosforilação têm papel chave na regulação da capacitação. A atividade PKA gera um grande aumento na fosforilação de resíduos de tirosina e é dependente de AMPc (BAKER *et al.*, 2010).

2.5 Reação Acrossômica

A reação acrossômica (RA) é um processo excitatório que resulta da fusão da membrana acrossomal com a membrana plasmática do espermatozoide, isso permite a liberação de enzimas do acrossoma como a hialuronidase que medeia a interação do espermatozoide com o oócito (BALDI *et al.*, 2000) sendo que somente os espermatozoides hiperativados são capazes de sofrer RA.

Estudos têm proposto que existem várias moléculas na superfície espermática que estão envolvidas no processo de fecundação. Essas moléculas interagem com receptores da zona pelúcida, como o receptor ZP3 (BALDI *et al.*, 2000). ZP3 é uma glicoproteína presente na zona pelúcida e medeia a ligação específica - específica do espermatozoide com o oócito. Essa proteína induz a transdução de sinais internos na célula espermática através da proteína G (WARD *et al.*, 1994) resultando no aumento nos níveis de cálcio e pH intracelular, esses eventos são essenciais para dá início a reação acrossômica.

Os eventos iniciais que ocorrem no espermatozoide através dos estímulos dos receptores ZP3 são induzidos por uma cascata de via de sinalização citosólica e de membrana com o envolvimento de cálcio, fosfolipases e proteínas quinases (TESARIK; MENDOZA, 1993; BALDI *et al.*, 2000).

Fosfolipase A2 induz a síntese de lipídios como ácido araquidônico e lisofosfolipídios que são indutores da RA, participando da fusão entre os gametas (CROSS, 1994; YUAN *et al.*, 2003). Proteínas quinases estão envolvidas no aumento da atividade de adenilciclase e esta eleva os níveis de AMPc durante a RA. A ativação de proteínas quinases também tem papel importante nesse processo (DE JONGE *et al.*, 1991).

Algumas proteínas espermáticas têm sido descritas de participarem na interação espermatozoide-oócito. Uma dessas proteínas é a CRISP1, sintetizada por células epiteliais do epidídimo e localizada no segmento equatorial da cabeça espermática, participa da fusão dos gametas através da ligação em sítios específicos do oócito. Essa ligação está correlacionada com uma região conservada de 12 aminoácidos (COHEN *et al.*, 2007).

Uma proteína pertencente à superfamília de imunoglobulinas denominada IZUMO encontra-se na membrana espermática e também está envolvida no processo de fecundação. Inoue e colaboradores (2005) estudando camundongos *knockout* para essa proteína verificaram que os espermatozoides são capazes de se ligarem e penetrarem a zona pelúcida, porém não apresentaram a capacidade de fusão com o oócito.

Proteínas da família ADAM (Proteína Desintegrina e Metaloproteínase) têm sido descritas de participarem da interação entre gametas. Uma vez que essas proteínas possuam domínio desintegrina (ADAM2, ADAM3) que pode potencialmente se ligar a integrina do oócito

(PRIMAKOFF; MYLES, 2000). Estudos relatam que a utilização de anticorpos para essas proteínas reduzem a capacidade de fusão entre os gametas (CHO *et al.*, 1998).

Parte das alterações ocorridas na célula espermática está associada com proteínas do fluido seminal, que modulam papéis fundamentais nos diferentes processos da fertilização.

2.6 Plasma Seminal

O plasma seminal é um fluido complexo composto das secreções das glândulas bulbo uretrais, vesículas seminais, próstata, epidídimo e testículos (HAFEZ; HAFEZ 2004). Têm como função a de transportar os espermatozoides durante a ejaculação e auxiliar na sobrevivência espermática durante o transito no trato genital feminino (YANAGIMACHI, 1994). Também promove um meio adequado para o espermatozoide, possuindo características tamponantes (garantindo pH 7,35 – 7,5), protegendo o espermatozoide do ambiente ácido da vagina e contém altas concentrações de frutose (principal nutriente utilizado para a nutrição do gameta masculino no trato feminino), tais características garantem o sucesso da fertilização (REESE *et al.*, 2010).

Estudos relatam que proteínas secretadas no plasma seminal podem ser indicadas como marcadores do potencial reprodutivo do macho, e muitas dessas proteínas já foram descritas em ruminantes (KILLIAN *et al.*, 1993; BELLIN *et al.*, 1998; SPROTT *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2006, MOURA *et al.*, 2011).

Durante o armazenamento dos espermatozoides na cauda epididimal, essas células estão sujeitas a danos celulares provocado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (AITKEN, 1994). O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação da célula (SIKKA *et al.*, 1995; SHARMA; AGARWAL, 1996). Os espermatozoides são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo devido sua membrana plasmática conter elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e o seu citoplasma possuir baixas concentrações de enzimas com ação antioxidante (ALVAREZ; STOREY, 1995; AITKEN; FISHER, 1994).

No fluido seminal existe um grupo de proteínas que visam à proteção dos espermatozoides, como as enzimas relacionadas à proteção oxidativa. As principais enzimas produzidas no epidídimo que atuam no sistema antioxidante do espermatozoide são a glutathione S-transferase, tioredoxina peroxidase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e gama-glutamyl-transpeptidase (ALVAREZ; STOREY, 1983; JEULIN *et al.*, 1989; FOUCHÉCOURT *et al.*, 2000; DACHEUX *et al.*, 2006). A superóxido dismutase (SOD) é

uma enzima que contém metal na sua estrutura e age convertendo dois superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio que é menos tóxicos para célula. A catalase complementa a reação iniciada por SOD degradando peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e a glutatona peroxidase (GSHPx) também age na degradação do peróxido de hidrogênio (TREMELLEN, 2008).

A lactoferrina e a clusterina são exemplos de outras proteínas que estão relacionadas à proteção dos espermatozoides. A lactoferrina está associada à prevenção de formação de peróxidos lipídicos (WAKABAYASHI *et al.*, 1999), atua regulando a expressão gênica e tem ação antimicrobiana (MOURA, 2011). Uma das funções da clusterina, relacionada à proteção, é a ligação a proteínas que tenham perdido o enovelamento, assim evitando os efeitos tóxicos relacionados à precipitação destas no interior celular. Nesta função, a clusterina atua como uma chaperona que se liga aos sítios hidrofóbicos expostos das proteínas desnaturadas e resolubilizando-as (RÊGO, 2010).

O plasma seminal também está envolvido na aquisição da motilidade dos espermatozoides. Estudos relatam que as contrações do trato reprodutivo feminino, participam desse processo. O sistema enzimático Calicreína-Cininas é um dos mais estudados, a atividade desse complexo apresenta relações positivas com a motilidade espermática (SOMLEV *et al.*, 1996).

As proteínas do plasma seminal se aderem aos receptores da membrana espermática durante a ejaculação, e podem exercer papéis importantes na interação entre os gametas e na viabilidade celular (OLLERO *et al.*, 1997).

As Proteínas ligadoras de fosfolípidos (BSPs) são proteínas que estão presentes no plasma seminal e possuem importante papel na capacitação dos espermatozoides. As BSPs ligam-se à colina, um grupo de fosfolípidos de membrana e a lipoproteínas de alta densidade (HDL) de fluidos foliculares e do oviduto. Isso resulta na remoção de colesterol e fosfolípidos que promove a desestabilização da membrana celular favorecendo assim a capacitação espermática (THERIEN *et al.*, 2001; VILLEMURE *et al.*, 2003). Segundo Gwathmey e colaboradores (2003) essas proteínas permanecem ligadas à superfície espermática durante o trânsito no trato genital feminino.

As proteínas osteopontina e a prostaglandina D sintetase destacam-se por participarem da interação entre os gametas. A osteopontina é uma molécula de adesão que pode estar associada à fertilidade, devido à capacidade de mediar a ligação dos

espermatozoides ao óócito (MOURA, 2005). A prostaglandina D sintetase possivelmente transporta substâncias hidrofóbicas, como a testosterona e retinoides no trato reprodutor masculino e liga-se a fosfolipídios de membrana o que pode alterar a composição da membrana na maturação epididimal (SAMMY *et al.*, 2000; SOUZA, 2007).

Vale salientar que a composição do plasma seminal e do espermatozoide de pequenos ruminantes pode ser influenciado por variações sazonais. A compressão dessas variações são fundamentais para escolher métodos e estratégias que viabilizem o potencial reprodutivo dos rebanhos.

2.7 Estacionalidade Reprodutiva

A eficiência reprodutiva de pequenos ruminantes pode ser influenciada pela interação com o meio ambiente (SANTOS; SIMPLÍCIO, 2000). Em regiões tropicais, onde não há variação da luminosidade diária, as diferenças qualitativas e quantitativas do sêmen estão ligadas à temperatura ambiente (MACHADO *et al.*, 2000), nutrição e umidade (SANTOS *et al.*, 2002; CHEMINEAU, 2004).

Segundo Maia (2011) no nordeste brasileiro a oferta de forragens nativas nas épocas seca e chuvosa e as elevadas temperaturas no período de baixo índice pluviométrico são os principais fatores que acometem as variações da qualidade seminal. Os fatores como raça, idade, período do ano, perímetro escrotal e sanidade do animal (CHEMINEAU, 2004; SANTOS; SIMPLÍCIO, 2000) também interferem na função reprodutiva do macho.

Estudos em ruminantes, têm revelado que altas temperaturas ambientais influenciam negativamente a qualidade espermática, afetando a motilidade, vigor e a morfologia dos espermatozoides (VALLE *et al.*, 2005). Essas alterações pode está relacionada ao desequilíbrio na espermatogênese.

A região nordeste é caracterizada por um período seco e chuvoso, apresentando elevadas temperaturas ao longo do ano e com pouca variação da luminosidade, em vista disso os animais criados nessas regiões não apresentam estacionalidade reprodutiva, porém estão sujeitos ao estresse térmico, um dos principais fatores que comprometem a fertilidade do sêmen caprino (NUNES *et al.*, 1988; COELHO *et al.*, 2006). Segundo Baeta (1997), a faixa de conforto dos caprinos está entre 20 a 30°C.

É relatado que o estresse térmico pode causar desequilíbrio na espermatogênese e consequentemente diminuir a capacidade fecundante da célula espermática (MEYERHOEFFER *et al.*, 1985). O processo espermatogênico é controlado pelo sistema neuroendócrino e a termorregulação escroto-testicular têm influência direta nesse processo (COUROT e ORTAVANT, 1981). Segundo Waites e Setcheel (1990) os espermátócitos primários possuem uma maior sensibilidade as temperaturas elevadas do que os espermátócitos secundários e as espermatogônias sendo estas mais resistentes.

Segundo Joca e colaboradores (2003), o estresse causado por condições ambientais adversas pode afetar a produção nos mais variados níveis. Assim, justifica-se a crescente preocupação com o conforto dos animais, já que o Ceará é um Estado do Brasil predominantemente de clima tropical/semiárido, com altas temperaturas médias durante o ano o que provoca o estresse térmico. Além disso, os meses de Agosto a Dezembro possuem as maiores médias de temperatura anuais, menor pluviosidade, grande insolação e pasto seco, formando um conjunto de condições desfavoráveis à fisiologia do animal.

Pesquisa conduzida por Santos (2006) mostrou que reprodutores caprinos da raça Saanen e Alpina foram sensíveis as diferenças sazonais durante o ano apresentando variações no comportamento sexual, perímetro escrotal e nos parâmetros quali e quantitativos do sêmen. A frequência respiratória e a temperatura retal dos animais também se elevam mediante aumento da temperatura (SOUZA, 2005).

Reprodutores da raça Moxotó criados em confinamento no semi-árido nordestino e submetidos ao estresse térmico e a diferentes níveis de suplementação apresentaram temperatura retal dentro dos limites normais, entretanto tiveram aumento da frequência respiratória e batimentos cardíacos elevados (GOMES *et al.*, 2008).

A temperatura ambiente também interfere na temperatura testicular, bem como a morfologia escrotal. De acordo com a intensidade e o tempo de exposição dos animais à altas temperaturas, poderá causar degeneração testicular, redução da motilidade espermática, aumento de espermatozóides morfologicamente anormais e alterações no fluido seminal (SANTOS; SIMPLÍCIO, 2000). A bipartição escrotal é uma adaptação morfológica encontrada em grandes proporções em caprinos do nordeste brasileiro, essa característica mantém a temperatura dos testículos adequada para o seu funcionamento e isso é devido ao aumento da superfície de evaporação (NUNES *et al.*, 1983). Vieira e colaboradores (2008) analisaram a influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Piauí, os autores determinaram que no período seco a

divisão externa deve ser superior a 50% do comprimento para que se mantenha a qualidade reprodutiva.

Souza e colaboradores (2009) estudando proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana no nordeste brasileiro verificou que o sêmen apresentou melhor qualidade quando colhido no período de alto índice pluviométrico.

Essas variações sazonais na composição molecular do sêmen possivelmente estejam relacionadas a expressão de genes e proteínas ao longo do ano. Estudos proteômicos do plasma seminal e dos espermatozoides podem elucidar os impactos das adversidades causadas na fisiologia reprodutiva do animal.

2.8 Proteômica

A proteômica é o estudo do conjunto de proteínas expressas (proteoma) em um material biológico. O proteoma, ao contrário do genoma, não é estático e está sob contínua mudança dependendo de estímulos interno ou externo que está exposto, ou seja, o proteoma é altamente dinâmico (PATERSON; AEBERSOLD, 2003).

Devido ao papel central das proteínas e das interações proteína-proteína na célula, a proteômica tornou-se uma das principais tecnologias disponíveis na era pós-genômica (COX; MANN, 2007). Estudos proteômicos permitem caracterizar perfis proteicos, comparar a expressão de proteínas de órgão e tecidos, localizar e identificar modificações pós-traducionais, estudar as interações e translocações que ocorrem nas proteínas (DU PLESSIS *et al.*, 2011).

Embora a proteômica seja uma área recente, surgida nos anos 90, utiliza técnicas já desenvolvidas a um certo tempo como a eletroforese bidimensional (2D) e a espectrometria de massas (MS).

A eletroforese bidimensional foi proposta por O'Farrel e Klose (1975) e é uma ferramenta bastante utilizada para o estudo do proteoma e, consiste na separação de proteínas pelo seu ponto isoelétrico na primeira dimensão (focalização isoelétrica) e por sua massa molecular na segunda dimensão em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) (LIEBLER, 2002).

O avanço de novas tecnologias como o desenvolvimento de géis na forma de tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG) possibilitou o aumento da reprodutibilidade dos géis, que inicialmente era uma grande limitação da técnica (GÖRG *et al.*, 1985). Atualmente, a 2D

é um procedimento mais direto de separar, detectar e quantificar proteínas presentes em amostras complexas, bem como, reduzir a complexidade do material proteico facilitando assim sua identificação (MATTHIESEN, 2007).

A espectrometria de massas é uma técnica que permite a identificação de proteínas em larga escala, identifica proteínas ou peptídeos mensurando as massas moleculares através da razão massa/carga dos íons (DU PLESSIS *et al.*, 2011). Atualmente a ionização por eletrospray (ESI) e a ionização/dessorção a laser auxiliado por matriz (MALDI) são as fontes de ionização de proteínas e peptídeos mais comumente utilizadas.

As ferramentas da bioinformática têm contribuindo bastante para compreender uma vasta gama de dados obtidos da análise proteômica. Através de banco de dados é possível à identificação de várias proteínas separadas através de géis bidimensionais.

2.9 Proteômica da célula espermática

A eficiência reprodutiva constitui um fator essencial para o aumento da produtividade e conseqüentemente para gerar lucro, sendo, portanto, um dos principais parâmetros de seleção utilizado nos atuais sistemas de reprodução animal (MATOS *et al.*, 1992). Assim, a compreensão dos processos de formação dos gametas masculinos e a busca por marcadores para fertilidade é um dos grandes desafios da moderna pecuária e, estudos proteômicos podem fornecer e revelar respostas para tais questões (BREWIS; GADELLA, 2010; PEDDINTI *et al.*, 2008).

A análise proteômica da célula espermática tem propiciado uma melhor compreensão sobre os processos espermáticos como motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização, através das técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, que permitem a caracterização e identificação de proteínas específicas do espermatozoide (DU PLESSIS *et al.*, 2011).

Devido à aparente ausência da transcrição gênica, a funcionalidade da célula espermática é em grande parte dependente das modificações pós-traducionais, sendo estas evidenciadas nos processos de maturação epididimal e capacitação (AITKEN; BAKER, 2008). As modificações via glicosilação, metilação ou fosforilação nas proteínas dos espermatozoides e do plasma seminal são fundamentais para conferir a capacidade fecundante da célula espermática (DU PLESSIS *et al.*, 2011).

Os mecanismos moleculares dos processos espermáticos ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, os novos avanços da proteômica poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens de regulação da fertilidade, assim como, compreender as causas da infertilidade masculina e também viabilizar biotécnicas como a fertilização *in vitro* em mamíferos (AITKEN; BAKER, 2008).

Estudos proteômicos têm descrito várias proteínas *housekeeping* do espermatozoide envolvidas em processos como a fosforilação oxidativa e glicólise. Pesquisas também mostram o papel essencial da enzima NADPH oxidase na capacitação espermática que ajuda a conduzir a fosforilação tirosina dependente de AMPc, bem como, inibidores da PKA que resulta na diminuição da hiperativação da motilidade espermática, que compromete a funcionalidade do espermatozoide (DU PLESSIS *et al.*, 2011). Análises comparativas empregando técnicas de proteômica também têm permitindo identificar proteínas de interesse em reprodutores férteis em comparação com os inférteis.

Peddinti e colaboradores (2008) compararam os perfis proteicos de espermatozoides de bovinos de alta e baixa fertilidade. Os autores encontraram 2051 proteínas específicas dos indivíduos de alta fertilidade e 2281 para os de baixa, 125 proteínas demonstraram bom potencial para serem utilizadas como biomarcadores. Já ZHAO e colaboradores (2007) analisaram amostras de homens astenozoospermicos e normozoospermicos e verificaram que 10 das 17 proteínas identificadas foram relacionadas com o aumento ou diminuição do grupo com astenozoospermia. Sendo que essas proteínas estão envolvidas no metabolismo dos espermatozoides.

Os avanços dos métodos de pré-fracionamento de proteínas têm melhorado com os equipamentos de espectrometria de massas de alta velocidade, sensibilidade e resolução e os *softwares* de bioinformática, que permitem analisar a composição proteica da célula espermática, sendo possível comparar perfis proteômicos em diferentes estados funcionais, como por exemplo, maturo versus imaturo, capacitado versus incapacitado e normal versus defeituoso (AITKEN; BAKER, 2008). Assim, o estudo do proteoma do espermatozoide é fundamental para identificação, quantificação e caracterização de proteínas expressas nas células, bem como, a função dessas moléculas na fisiologia reprodutiva animal.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da sazonalidade no perfil de proteínas de espermatozoides de caprinos da raça Moxotó, visando a identificação de biomarcadores de fertilidade.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a qualidade dos espermatozoides de caprinos da raça Moxotó utilizando critérios morfofisiológicos;

- Estabelecer protocolo experimental para extração de proteínas de espermatozoides compatíveis com a eletroforese bidimensional.

- Obter géis bidimensionais de qualidade e com reprodutibilidade

- Eleger possíveis candidatos a biomarcadores de sazonalidade relacionado à fertilidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados seis reprodutores caprinos (*Capra hircus*) da raça moxotó, clinicamente sadios, pesando $38,3 \pm 6,0$ kg, com idade variando de 24 a 36 meses, oriundos da fazenda experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos da cidade de Sobral – Ceará, região semi-árida do Nordeste, localizada à 03°44' de latitude Sul e 40°20' de longitude Oeste, e com altitude de 109,62 metros, apresentando temperatura média anual de 27,7°C, com médias máxima e mínima de 34,8°C e 23 °C, respectivamente, e umidade relativa do ar de 66%, dados obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2010).

Durante o experimento os animais foram submetidos ao regime de sistema intensivo, recebendo capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) e com suplementação de 300g de concentrado por dia, contendo 70% de milho, 27% de farelo de soja, 2% de calcário e 1% de sal mineral.

4.2 Coleta de Sêmen

A coleta de sêmen foi realizada semanalmente, entre julho (2010) a março (2011), através do método de vaginal artificial utilizando uma fêmea estrognada (Cipionato de estradiol) como manequim. As amostras foram selecionadas de acordo com o índice pluviométrico, os meses que corresponderam ao período seco foi setembro, outubro e novembro e o chuvoso fevereiro e março.

4.3 Avaliações espermáticas

Após a coleta as amostras foram imediatamente mantidas em banho-maria a 37°C para avaliar os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade progressiva individual (0-100%) e vigor (escala de 0-5), avaliados de forma subjetiva em microscópio óptico; volume

do ejaculado (mL); concentração espermática ($\times 10^6$ /espermatozoides/mL) avaliado através de espectrofotômetro (CBRA, 1998).

4.4 Extração de Proteínas

O sêmen obtido foi centrifugado a $1.500 \times g$ por 30 minutos a 5°C para separar os espermatozoides do plasma seminal. O *pellet* de células foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4, e centrifugado a $4.000 \times g$ por 10 minutos por três vezes. As proteínas foram extraídas em tampão de lise de reidratação (CHAPS 4%, uréia 7M, tiouréia 2M, DTT 20 mM) seguida de agitação por 2 horas em gelo. As amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 20 minutos para remover debris celulares. E o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi coletado e estocado à -20°C (NOVAK *et al.*, 2010). Para a análise em eletroforese bidimensional foi feito um pool de amostras por período para cada animal.

4.5 Dosagem de proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas pelo o método de Bradford (1976) e a qualidade do perfil proteico foi analisada por SDS-PAGE.

4.6 Eletroforese Bidimensional

As proteínas dos espermatozoides (250 μg) foram solubilizadas em tampão de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 1% p/v, *anfólitos* 0,5% v/v e traços de azul de bromofenol). A solução foi reidratada em canaletas do IPGBox (GE Healthcare) e incubadas em tiras de gradiente de pH imobilizado (*IPG Strip*) de 13 cm, com faixa de pH linear de 4-7 por 16 horas.

A focalização isoeétrica foi conduzida no equipamento *Ettan™ IPGPhor III™* (GE-Healthcare) nas seguintes condições: etapa1 (500 V por 30 minutos); etapa 2 (4000 V por 2:30 horas) e etapa 3 (8000 V até atingir 18.000 V horas totais). E em seguida as tiras foram armazenadas em freezer a -80°C para procedimentos posteriores. As tiras foram equilibradas em solução de equilíbrio (tris 50 mM, glicerol 30%, uréia 6M, SDS 2% e traços

de azul de bromofenol) com DTT (1% p/v) por 15 minutos e mais 15 minutos em solução de equilíbrio acrescentando iodoacetamida (3% p/v). Em seguida, as proteínas foram separadas na segunda dimensão em géis de poliacrilamida a 12,5 % na presença de SDS. A corrida foi realizada sob as seguintes condições: 15 mA/gel por 15 minutos e 25 mA/gel por 6-8 horas. Foi utilizado marcador de peso molecular entre 14 e 97 kDa.

Os géis foram fixados em mistura de etanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v/v), durante 15 minutos e posteriormente corados com solução de Coomassie G 250 (*Blue Silver*) (CANDIANO, 2004) durante vinte e quatro horas e armazenados em solução de ácido acético 5%. Para digitalização dos géis utilizou-se o equipamento *ImageScanner III* gerenciados pelo programa *LabScan 6.0* (ambos da *GE Healthcare*). As imagens obtidas foram analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (*GE Healthcare*).

4.7 Identificação das Proteínas

As proteínas foram identificadas com base na comparação de pI e massa molecular no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy.

4.8 Análise Estatística

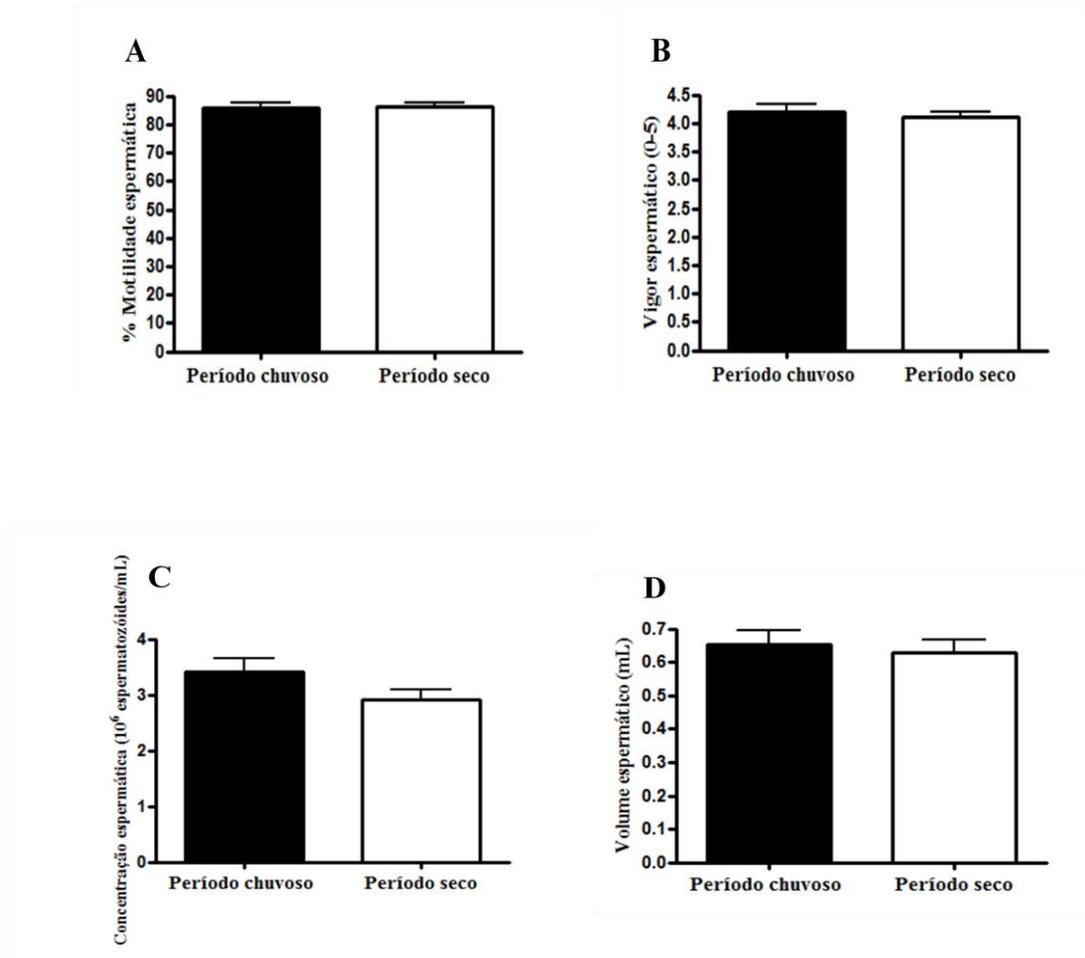
Para a análise dos parâmetros espermáticos foram utilizados, os teste t pareado para motilidade e vigor e wilcoxon para concentração e volume espermático. Todos os pré-requisitos de normalidade foram respeitados, avaliando-se os dados através do teste de K-S e Lilliefors, considerando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação Espermática

A análise do sêmen de caprinos da raça Moxotó não evidenciou diferenças significativas nos parâmetros espermáticos, a saber: motilidade, vigor, concentração e volume, entre os períodos seco e chuvoso ($p < 0,05$) (Gráfico 1 e Tabela 1). Esses resultados corroboram parcialmente com os dados obtidos por Teixeira e colaboradores (2009) que estudando as características seminais de caprinos da raça Anglo-Nubiano na região semi-árida do Ceará não observaram influência do período do ano na motilidade progressiva e no vigor espermático. Contudo, os autores relatam que a concentração e volume seminal apresentaram diferenças significativas nos períodos avaliados.

Gráfico 1. Comparação dos parâmetros espermáticos do sêmen de caprinos da raça Moxotó colhido nos períodos seco e chuvoso.



A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$). **A:** Motilidade espermática (%), **B:** Vigor espermático (0-5), **C:** Concentração espermática (10^6 espermatozoides/mL), **D:** Volume espermático (mL).

Tabela1. Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros espermático (motilidade, vigor, concentração e volume) de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco e chuvoso.

Parâmetros Espermáticos	Período seco	Período chuvoso
Motilidade	86,3±6,9	85,8 ±8,81
Vigor	4,1±0,49	4,2±0,66
Concentração	3,2±0,84	3,42±1,2
Volume	0,63±0,3	0,65±0,29

Estudo realizado com caprinos mestiços (Anglo-Nubiano x SRD) criados no semi-árido paraibano também não evidenciou efeito da sazonalidade nos aspectos espermáticos como motilidade e vigor, sendo que a concentração foi reduzida na época mais quente do ano ($1,80 \times 10^6$ espermatozoides/mL) (SILVA *et al.*, 2005). Este último parâmetro mostra-se bastante inferior ao que foi encontrado na raça Moxotó, a qual apresentou concentração espermática de $3,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL no período seco, fato que pode ser justificado pela alta rusticidade da raça Moxotó no semi-árido nordestino. Outro estudo da qualidade do sêmen realizado com caprinos SRD, criados no estado do Piauí, não foi possível identificar diferenças significativas para o volume entre os animais nas épocas seca e chuvosa, sendo que o vigor apresentou diferença entre os períodos (VIEIRA *et al.*, 2008). Souza e colaboradores (2009) avaliando a relação do índice pluviométrico na qualidade seminal de caprinos da raça Alpina Americana na região Agreste do estado do Pernambuco não encontraram diferenças significativas na concentração, motilidade e vigor do ejaculado, contudo, o volume sofreu alteração nos diferentes períodos. Os dados mostrados por esses autores para motilidade foi de 79,8% e 81,3% nos períodos de alto e baixo índice pluviométrico, respectivamente. Vale ressaltar que a raça Moxotó apresentou valores superiores para os parâmetros de motilidade

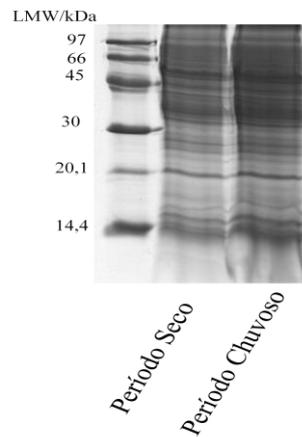
(86,3% e 85,8%) nos períodos seco e chuvoso respectivamente, quando comparados aos da raça exótica Alpina Americana.

Nossos dados evidenciam que os animais do presente estudo apresentaram-se bem adaptados às condições climáticas da região, pois não sofreram influência significativa da sazonalidade na qualidade seminal. Vale salientar que os dados obtidos sobre motilidade, concentração e vigor espermático estão dentro dos padrões de referência do Conselho Brasileiro de Reprodução Animal para espécie *Capra hircus* (1998). Esses resultados podem refletir a influência das proteínas da célula espermática na manutenção da qualidade seminal durante as diferentes épocas do ano. Além disso, os melhores índices obtidos pela raça Moxotó tornam-na atrativa para a realização de estudos moleculares que contribuam para a elucidação dos processos de fertilidade e para a melhoria da reprodução animal. Assim, podemos pressupor que a raça Moxotó é um importante modelo para caracterizar as proteínas que atuam na modulação da qualidade espermática, pois a alta qualidade do ejaculado e a inexistência de variação ao longo dos períodos do ano demonstram a importância do *background* genético e do portfólio de proteínas desta raça.

5.2 Análise do perfil protéico dos espermatozoides

O método de extração de proteínas utilizado foi eficiente nos aspectos qualitativos e quantitativos. O valor médio da concentração de proteínas totais obtidas de espermatozoides da raça caprina Moxotó foi de $25,4\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 5,4$ e $24,6\ \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 6,2$ para os períodos seco e chuvoso, respectivamente (Tabela 2). Esses resultados não evidenciaram diferença significativa entre os períodos avaliados ($p < 0,05$). Com relação a qualidade do perfil proteico, podemos perceber bandas proteicas sem índice de degradação no SDS-PAGE (Figura 2).

Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% de proteínas de espermatozoides de caprinos da raça Moxotó no período seco e chuvoso.



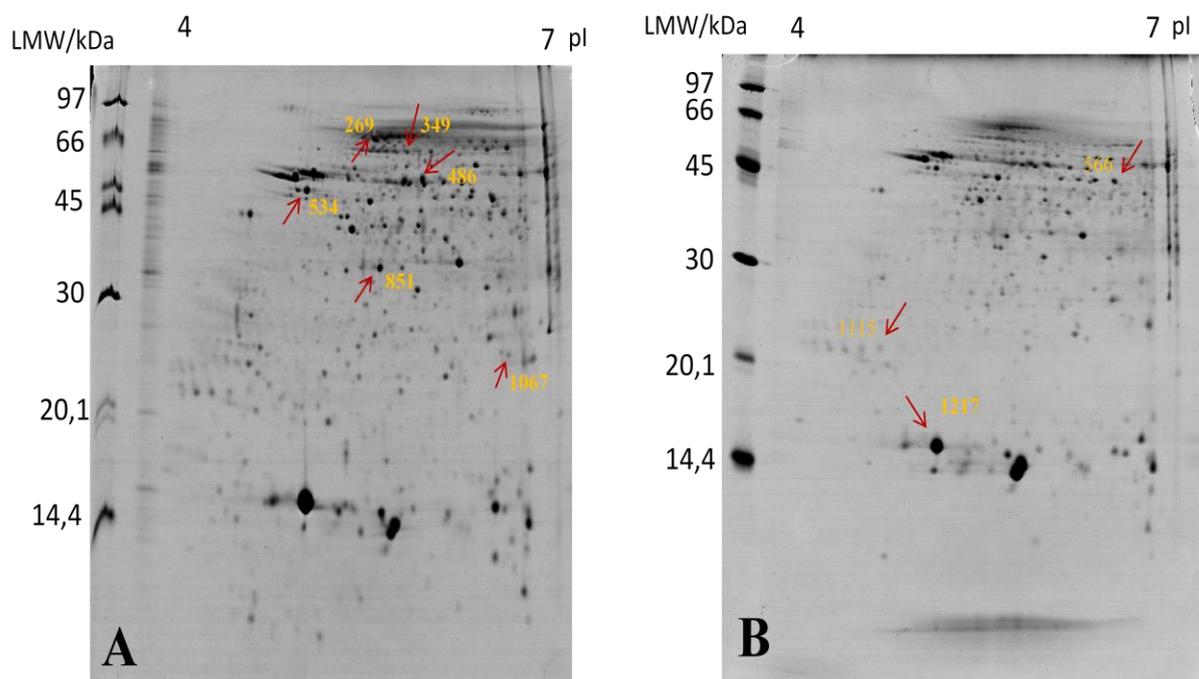
As proteínas foram extraídas em tampão de lise de reidratação (CHAPS 4%, Uréia 7M, Tiouréia 2M, DTT 20 mM) e o gel corado com Comassie G-250. A esquerda o marcador de baixo peso molecular, variando de 14,4 a 97 KDa.

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão da concentração de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtida dos seis animais nos períodos seco (PS) e chuvoso (PC).

Animais	Proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) PS	Proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) PC
A	28,5\pm1,6	27,85\pm0,9
B	23,6\pm2,4	26,6\pm6,6
C	29,5\pm7,5	17,25\pm8,4
D	25,0\pm2,0	26,8\pm2,0
E	17,8\pm4,4	27,9\pm9,0
F	28,0\pm4,6	21,0\pm4,6

O mapeamento protéico de espermatozoides de caprinos nos períodos chuvoso e seco, foi resolvido em géis bidimensionais em faixa de pH 4-7 e pesos moleculares de 14,4 a 97 kDa, podemos visualizar estes resultados nos géis de referência obtido para cada período (Figura 3).

Figura 3. Perfil bidimensional de proteínas de espermatozóides de caprinos da raça Moxotó.



As proteínas foram extraídas em tampão de lise de reidratação (CHAPS 4%, ureia 7M, tiouréia 2M, DTT 20 mM) e 250 µg da amostra proteica foi aplicada em tiras IPG com faixa de pH linear de 4-7 de 13cm, e o gel corado com Comassie G-250. A esquerda o marcador de baixo peso molecular (LMW), variando de 14,4 a 97 kDa. As setas em vermelho indicam as proteínas diferencialmente expressas. **A:** Gel de referência do **Período Chuvoso**. **B:** Gel de referência do **Período Seco**.

A reprodutibilidade dos géis foi conferida através de gráficos de dispersão, considerando a porcentagem do volume dos *spots* entre as replicatas (% Vol), sendo que todas as repetições apresentaram coeficiente de correlação linear acima de 0,90 (Gráfico 2 e Tabela 2). Assim, demonstramos a confiabilidade dos dados obtidos, pois o valor mínimo aceito para a comparação de replicatas através de gráficos de dispersão é de 0,85 (VIEIRA, 1980).

Gráfico 2. Gráficos de dispersão das duplicatas de géis 2D considerando o parâmetro porcentagem do volume (%Vol) dos *spots* no período seco com um coeficiente de correlação linear de 0,988 (A); e do período chuvoso com coeficiente de correlação linear de 0.992 (B).

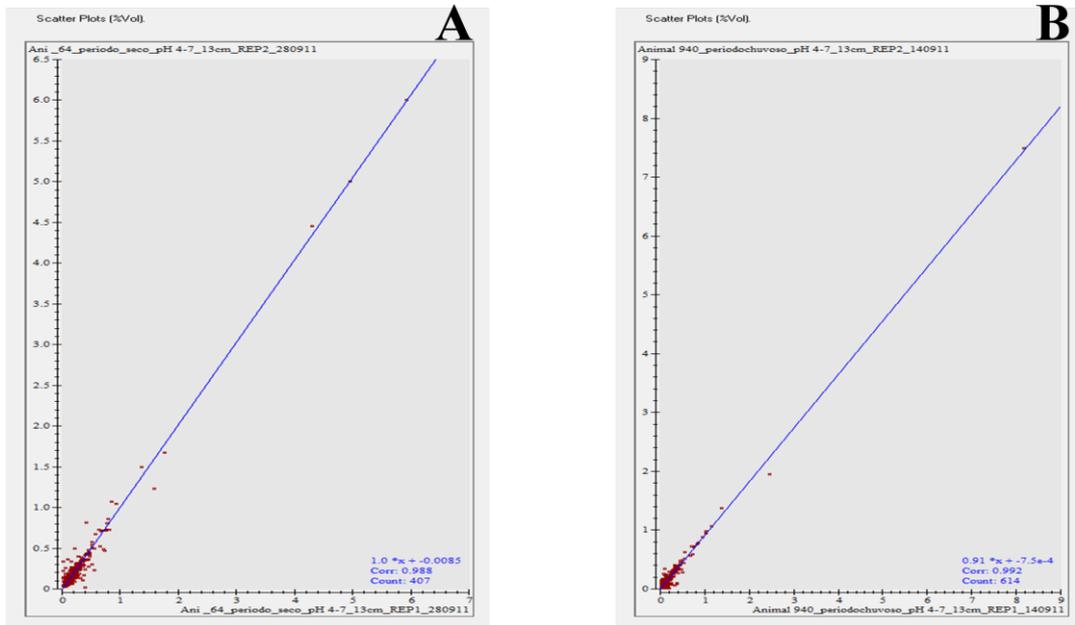


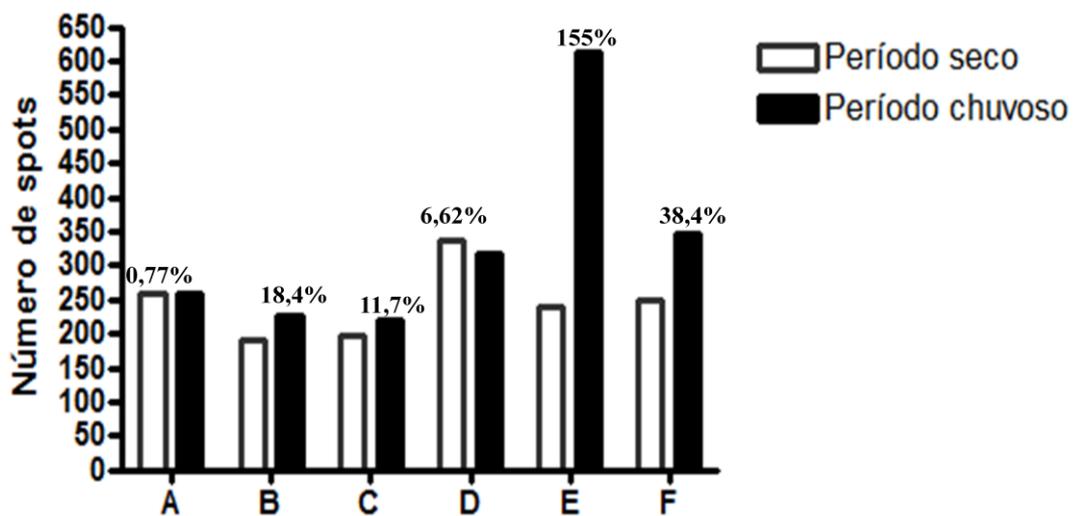
Tabela 3. Valores de coeficiente de correlação linear entre as replicatas de géis bidimensionais obtidos dos seis animais analisados nos períodos seco (PS) e chuvoso (PC).

ANIMAIS	Coeficiente de correlação linear PS	Coeficiente de correlação linear PC
A	0,970	0,939
B	0,993	0,994
C	0,993	0,994
D	0,988	0,963
E	0,989	0,992
F	0,989	0,995

A análise dos géis pelo software *Imagemaster* (GE Healthcare) revelou uma média de 246 e 330 *spots* para o período seco (PS) e chuvoso (PC), respectivamente. Vale salientar que o animal E apresentou a maior variação individual de *spots* proteicos entre os períodos do ano analisados, sendo identificados 155% a mais de *spots*.

Observou-se também que esse aumento do número de *spots* no PC é verificado na maioria dos animais analisados (Gráfico 3).

Gráfico 3. Número médio de *spots* por indivíduo em géis bidimensionais (pH 4-7 de 13 cm) nos períodos seco e chuvoso.

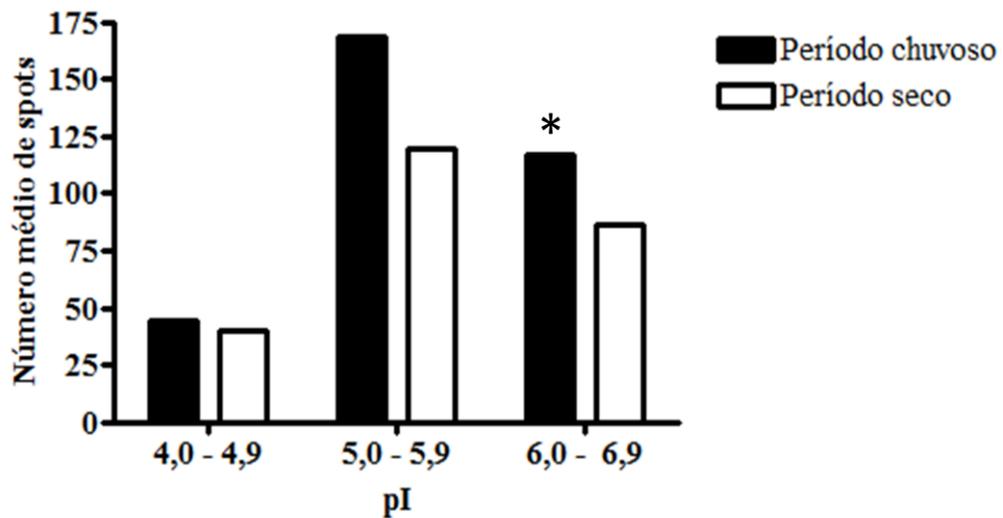


As letras de A-F representam os animais utilizados nesse estudo. A diferença entre os números de *spots* entre cada indivíduo é dada em porcentagem.

A distribuição dos *spots* pelo ponto isoelétrico nos dois períodos estudados, demonstram que as proteínas encontram-se majoritariamente concentradas na faixa de pH de 5 a 5,9 (Gráfico 4), sendo que tanto no PC quanto no PS essa região contem cerca 50% do total de proteínas. Nossos resultados são semelhantes aos de Souza (2008), que estudando as proteínas de membrana de espermatozoides de caprinos nos períodos de alto e baixo índice pluviométrico também evidenciou que os *spots* estão em sua maioria na faixa de pH ácido.

Cardozo e colaboradores (2006) estudando as variações mensais de proteínas do plasma seminal de ovinos também relataram que a maioria apresentaram pH ácido.

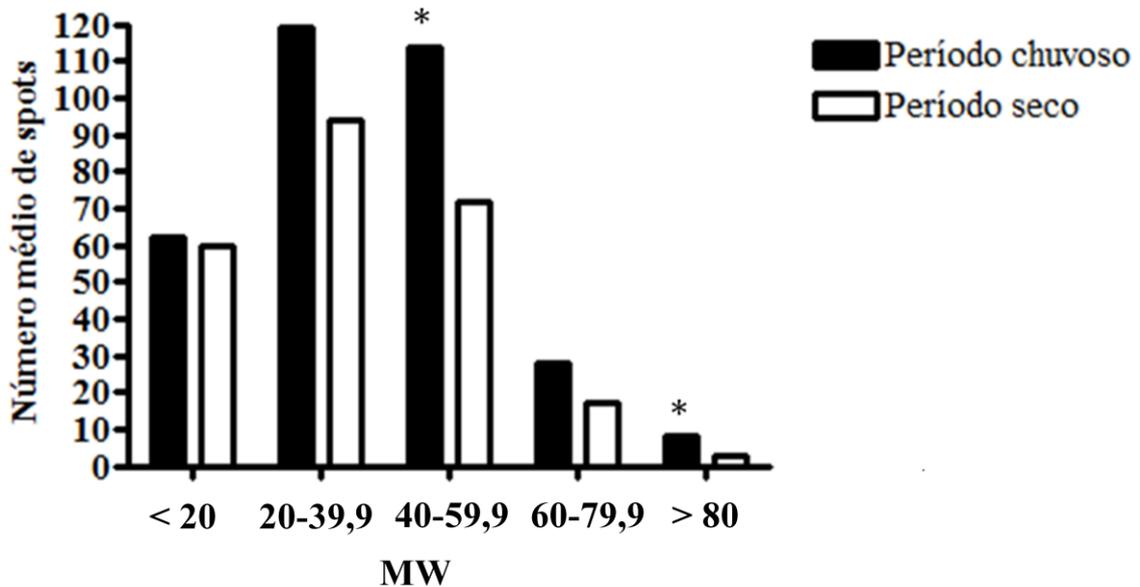
Gráfico 4. Distribuição do número médio de *spots* em diferentes faixas de pH nos períodos chuvoso e seco.



O teste estatístico utilizado foi Wilcoxon. Asterico(*) indica diferença significativa $p < 0,05$.

Em relação à massa molecular, as proteínas de 20 a 40 kDa são as mais frequentes ao longo do ano e em seguida as de 40 a 60 kDa, contudo essas proteínas apresentaram maior distribuição no período chuvoso (Gráfico 5).

Gráfico 5. Distribuição do número médio de *spots* em relação à massa molecular (MW) nos períodos chuvoso e seco.



O teste estatístico utilizado foi Wilcoxon. Asterico (*) indica diferença significativa $p < 0,05$.

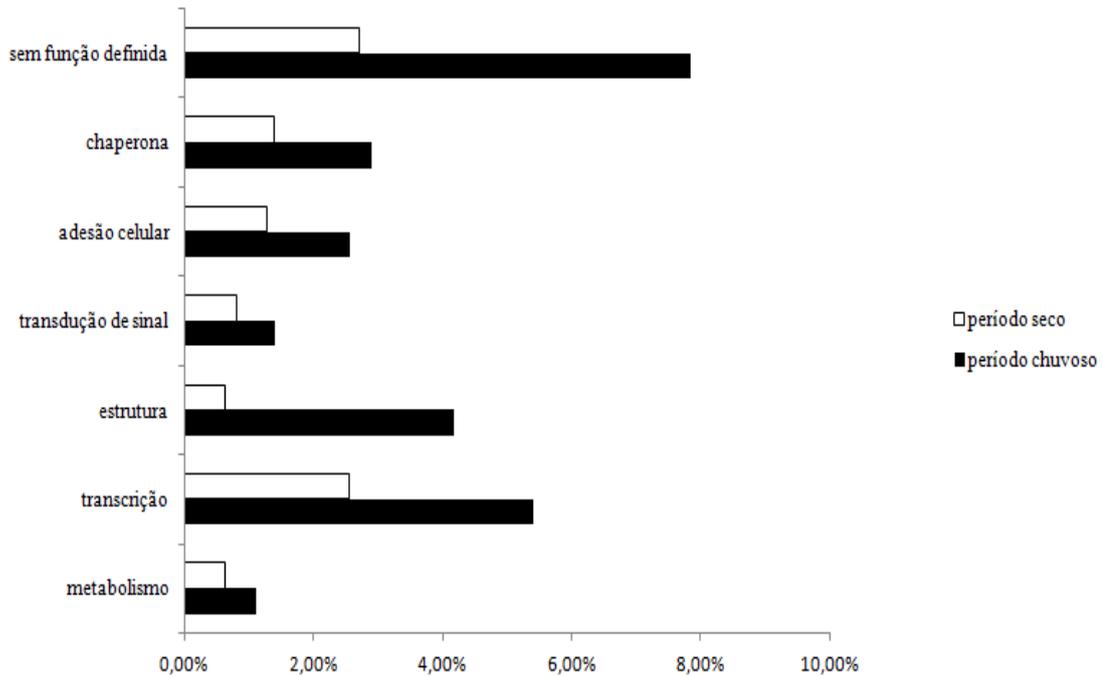
Entre os períodos analisados foram identificados 56 *spots* com nível de expressão constante nos seis animais. Possivelmente essas proteínas não sofrem influência das alterações climáticas da região. Sugerimos que esses *spots* podem ser proteínas *housekeeping* para a raça caprina em estudo. Na literatura já tem sido descrito proteínas *housekeeping* em espermatozoides, envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa e glicólise (DU PLESSIS *et al.*, 2011).

5.3 Classificação funcional das proteínas de espermatozóides

Os mapas proteicos de referência do PS e PC foram identificados no banco de dados Uniprot através da comparação por pI e massa molecular e, foram classificadas em sete categorias funcionais a saber: chaperona, adesão celular, transdução de sinal, estrutura, transcrição, metabolismo e sem função definida.

A distribuição funcional das proteínas identificadas é mostrada no Gráfico 6. As categorias mais abundantes no PC e PS correspondem às proteínas envolvidas no processo de transcrição (5 e 2,5%, respectivamente).

Gráfico 6. Distribuição das categorias funcionais nos períodos seco e chuvoso.



As identificações foram feitas a partir de géis bidimensionais de referência, através da comparação de pI e massa molecular no banco de dados UniProt, utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy.

Esses dados são semelhantes com os de Martinez-Heredia e colaboradores (2006) que estudando o perfil proteico de espermatozoides de humanos identificou, por espectrometria de massas, que 23% das proteínas analisadas eram relacionadas a transcrição. Esses dados são surpreendentes uma vez que a célula espermática é considerada transcricionalmente inerte. Contudo, Gur e Braitbart (2006) demonstraram, através da incorporação de aminoácidos radioativos, a existência de síntese de proteínas durante a capacitação de espermatozoides de humanos, de bovinos, de camundongo e de rato, e que esta síntese também é dependente dos mecanismos traducionais da mitocôndria (GUR; BRAITBART, 2006).

Martinez-Heredia e colaboradores (2006) sugerem que essas proteínas presente nos espermatozoides podem ser resqúcios dos processos de espermatogênese ou ainda podem ter papel importante na fisiologia normal da célula espermática, bem como, podem desempenhar funções na fertilização e nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Outra categoria abundante no período chuvoso são as proteínas estruturais que estão envolvidas na forma altamente especializada da célula espermática (MARTINEZ-HEREDIA *et al.*, 2006). Vale salientar a presença das proteínas que estão no grupo das chaperonas dentre elas a proteína de 70 kDa que possivelmente seja a HSP70 (proteína de choque térmico), esta possui um papel crítico na divisão celular, especificamente na meiose durante a diferenciação da célula germinativa masculina (GOVIN *et al.*, 2006) e têm sido reportado que esta proteína está presente no estresse térmico evitando defeitos espermáticos em animais criados em clima tropical (EDDY, 1999).

Dentre outras proteínas identificadas destacam-se: peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária (PACAP) que é um neuropeptídeo pleiotropico e está presente nos testículos e tem papel fisiológico na espermatogênese atuando como regulador da função gonadal, estudos *in vitro* em ratos tem demonstrado que PACAP estimula a liberação de testosterona a partir das células de Leydig (ROMANELLI *et al.* 1997; ROSSATO *et al.* 1997; EL-GEHANI *et al.* 1998), outra proteína é a RNA helicase dependente de ATP DDX25, uma proteína multifuncional que têm papel como regulador da espermatogênese e está envolvida como regulador pós-transcricional de genes durante o desenvolvimento das células germinativas (TSAI-MORRIS *et al.*, 2010).

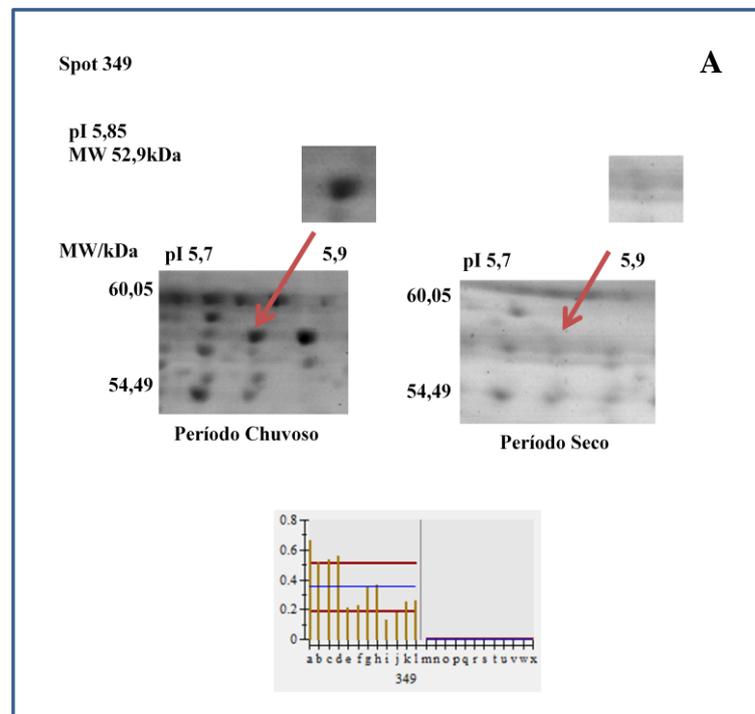
Análises posteriores por espectrometria de massas podem identificar as proteínas com maior precisão podendo também identificar modificações pós-traducionais e descobrir novas proteínas através do sequenciamento *de novo*.

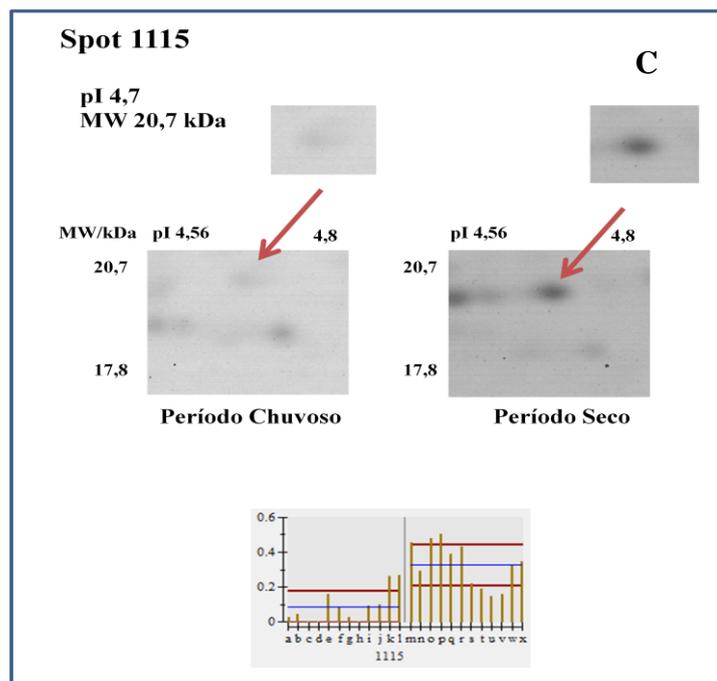
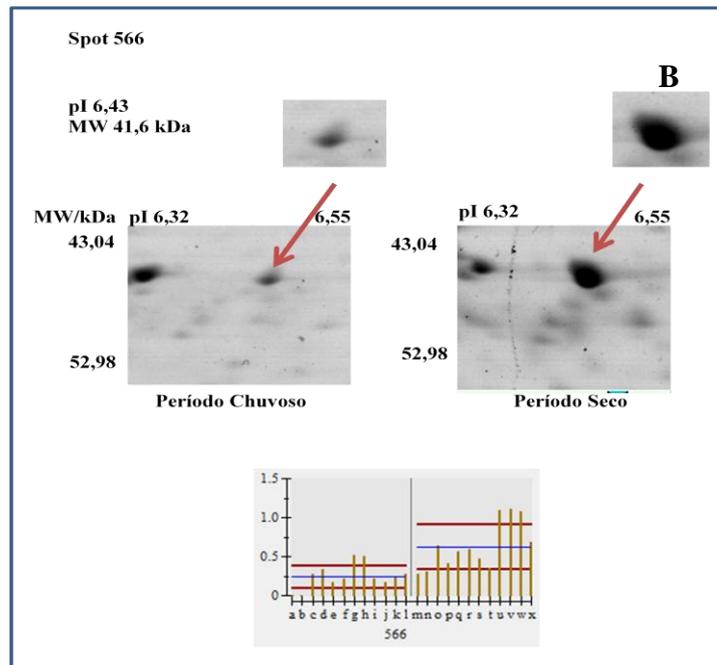
5.4 Proteínas diferencialmente expressas

Observou-se a presença de proteínas que foram diferencialmente expressas entre os períodos, dentre elas o *spot* 349 (pI 5,85, MM 52,9kDa, Figura 4) que esteve presente apenas no período chuvoso. De acordo com a comparação de pI e massa molecular no banco de dados Uniprot essa proteína é a GASZ. A GASZ desempenha papel central durante a espermatogênese reprimindo elementos transponíveis e impedindo sua mobilização, garantindo a integridade da linhagem germinativa. Além disso, essa proteína atua nas interações proteína-proteína durante a maturação espermática (MA *et al.*, 2009).

Os *spots* proteicos 566 e 1115 (pI 6,43, MW 41,6; pI 4,7, MW 20,7, Figura 4) foram mais expressos no período seco. A identificação do peptídeo 566 através do Uniprot revelou que esse *spot* é a proteína de ligação responsiva ao AMPc que atua como ativador transcricional durante a espermiogênese (NAGAMORI *et al.*, 2006). Enquanto que o *spot* 1115 não foi identificado pelo banco de dados Uniprot. Assim, podemos supor que essa proteína seja uma forte candidata a biomarcadora de fertilidade.

Figura 4 - Proteínas diferencialmente expressas nos períodos chuvoso (PC) e seco (PS).



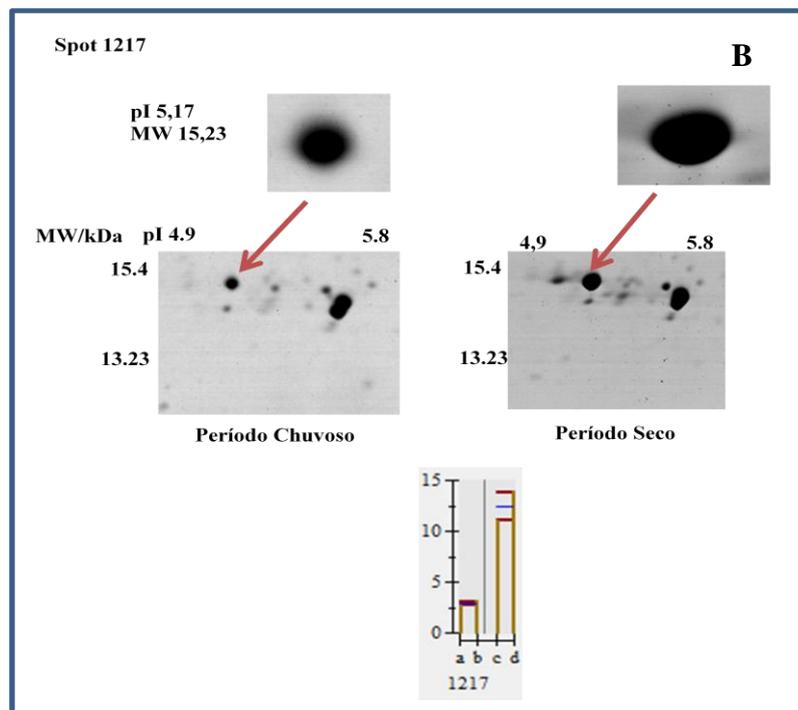
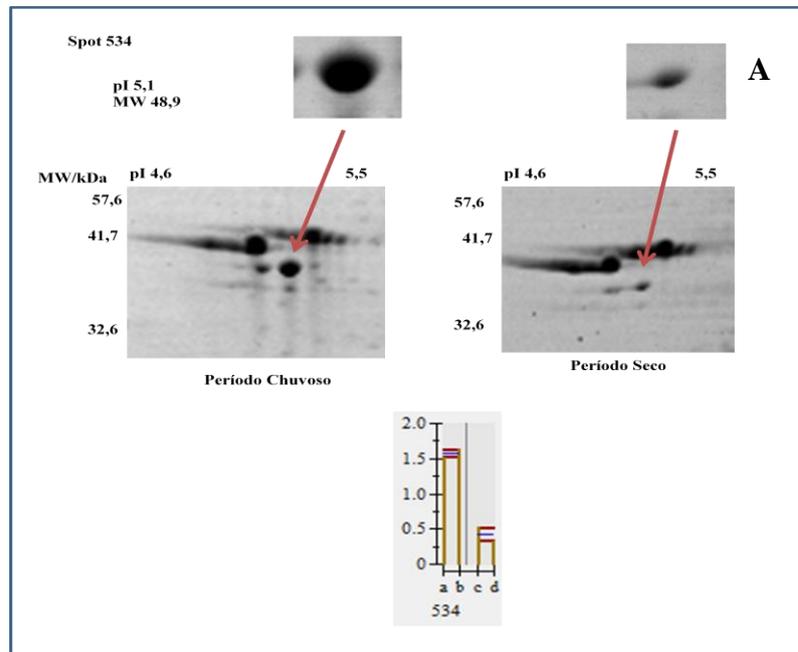


A: O *spot* 349 (representado pelo gel de referência) esteve presente apenas no PC. **B e C:** os *spots* 566 e 1115 (representados pelo gel de referência) foram mais expressos no PS. Análise foi realizada pelo software *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (GE-Healthcare) considerando a porcentagem do volume dos *spots*. Nos histogramas as barras vermelhas mostram o desvio padrão das médias da intensidade do volume e a azul indica a média aritmética. As letras de a-l representam as replicatas dos seis animais estudados no período chuvoso e m-x as replicatas do período seco.

As diferenças qualitativas e quantitativas também foram observadas a nível de indivíduo, ou seja, houve uma variação na distribuição dos *spots* entre os animais, apesar de pertencerem a mesma raça e serem criados no mesmo sistema de manejo. Segundo Nunes e colaboradores (1988), o potencial reprodutivo do rebanho caprino está diretamente relacionado com a carga genética, meio ambiente e sistema de manejo, sendo que a relação entre essas variáveis interferem nas características fenotípicas proporcionando melhor adaptação e produtividade, assim a fertilidade dos animais pode ser dependente dessas variáveis que podem interferir e modificar o comportamento produtivo e reprodutivo.

A análise das diferenças quantitativas no período seco e chuvoso no reprodutor C mostrou que os *spots* 534 (pI 5,1 e MW 48,9 kDa), 851 (pI 5,6 e MW 36,46 kDa) apresentaram maior expressão no PC, enquanto que *spot* proteico 1217 (pI 5,17 e peso molecular de 15,23 kDa) foi mais expresso no PS (Figura 5).

Figura 5. Proteínas diferencialmente expressas no reprodutor C



A: O *spot* 534 foi mais expresso no PC enquanto que o 1217 apresentou nível de expressão maior no PS
B. Análise foi realizada pelo software *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (GE-Healthcare) considerando a porcentagem do volume dos *spots*. Nos histogramas as barras vermelhas mostram o desvio padrão das médias da intensidade do volume e a azul indica a média aritmética.

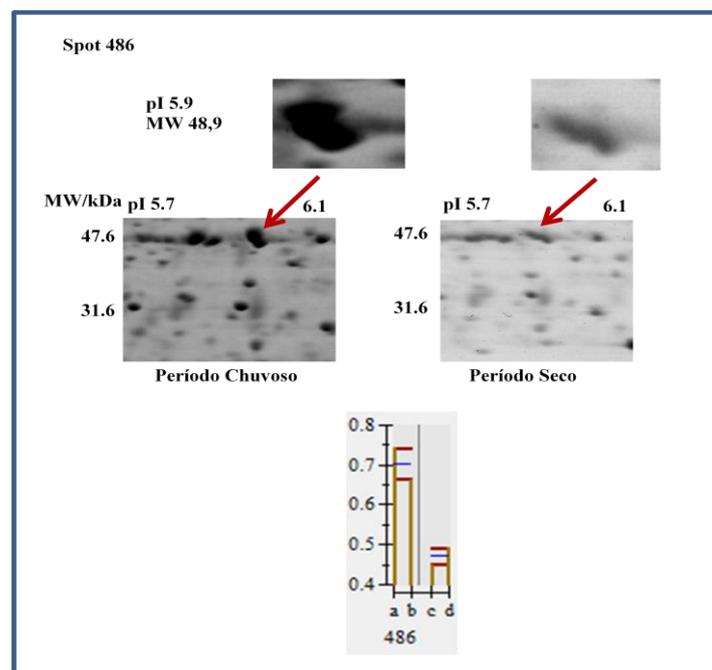
O *spot* 534 é semelhante à TCP 11 (Proteína do complexo-T 11), a qual desempenha papel importante na espermatogênese e na função espermática. Liu e colaboradores (2011) sugerem que, em humanos, TCP 11 pode ser responsável pela morfologia da cauda espermática e na motilidade flagelar. Essa proteína também foi encontrada na superfície de espermatozoide epididimal maturo e foi relacionada à estimulação da capacitação e na inibição da reação acrossômica espontânea (FRASER *et al.*, 1997). O *spot* 851 foi identificado como a TSPY (Proteína encoded-Y testículo-específica). A TSPY é expressa nos testículos e em células epiteliais da próstata, porém com menos expressão nessa glândula. A TSPY está envolvida na proliferação espermatogonial e/ou na diferenciação celular (SCHUBERT; SCHMIDTKE, 2010). A identificação e caracterização de TSPY foi descrita primeiramente em humanos, mas já existem relatos de genes para essa proteína em bovinos, assim como em outros mamíferos placentários (VERKAAR *et al.*, 2004). Embora não se tenha evidenciado diferenças estatísticas nos parâmetros morfofisiológicos, esse reprodutor teve uma tendência de aumentar os parâmetros espermáticos de motilidade, vigor e concentração no período chuvoso. Sugerimos, então, que os *spots* 534 e 851 são fortes candidatos a biomarcadores, uma vez que sua expressão parece está relacionada a esses parâmetros e que existem relatos do papel destas proteínas na motilidade espermática.

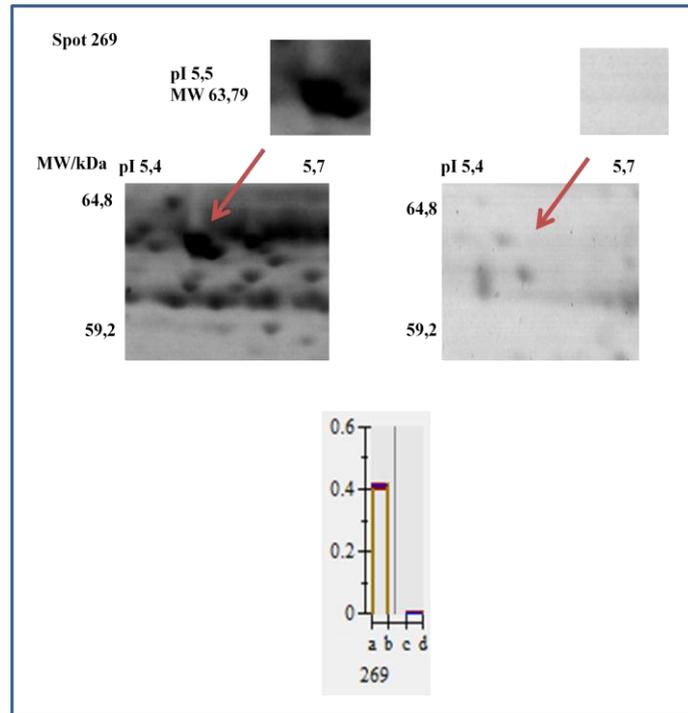
O *spot* proteico 1217, que fora mais expresso no PS, foi identificado como a Spergen-1. Segundo Doiguchi e colaboradores (2002), Spergen-1 pode ser uma molécula de adesão associada com a mitocôndria na peça intermediária do espermatozoide durante a espermiogênese. A comparação dos dados de expressão dessa proteína com os parâmetros morfofisiológicos analisados não nos permitiu afirmar o possível papel dessa proteína. Contudo, podemos pressupor que o aumento da expressão dessa proteína pode ter colaborado com a manutenção da qualidade espermática entres o PS e o PC.

Conforme previamente descrito, o reprodutor E apresentou o maior número de proteínas expressas no período chuvoso. Podemos perceber que no PC também houve aumento na motilidade progressiva, vigor e concentração espermática. Assim, podemos pressupor que o aumento qualitativo e quantitativo de proteínas parece estar relacionado com os parâmetros supracitados.

A grande variação observada para o reprodutor E nos direcionou a eleger alguns *spots* para a discussão mais detalhada. Dentre eles o *spot* proteico 486 (pI 5,9 e MM 46,4 kDa, Figura 6) é a proteína de canal de cálcio associada ao espermatozoide, que está envolvida com o processo de fertilização. Segundo Baker (2010), quando o espermatozoide se encontra no interior do trato feminino, ocorre imediato influxo de cálcio, bicarbonato e aumento no nível de AMPc, processo que aumenta a motilidade espermática. Ren e colaboradores (2001) também demonstraram que essa proteína está envolvida no aumento da motilidade e na interação do espermatozoide com o oócito. Outra proteína que também teve maior expressão no PC foi o *spot* proteico 269 (pI 5,5, MM 63,79, figura 6), possivelmente essa proteína seja a ADAM 24, uma protease ancorada a membrana plasmática do espermatozoide maturo com função na maturação epididimal (ZHU *et al.*, 2001).

Figura 6. No reprodutor E os *spots* 486 e 269 apresentaram maior expressão no período chuvoso.

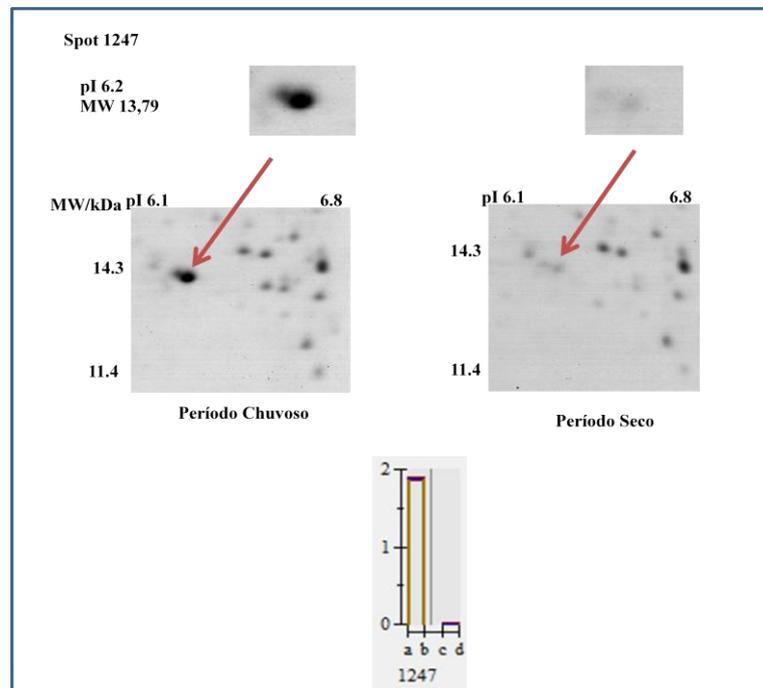




Análise foi realizada pelo software *ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare)* considerando a porcentagem do volume dos *spots*. Nos histogramas as barras vermelhas mostram o desvio padrão das médias da intensidade do volume e a azul indica a média aritmética.

Observou-se a presença do *spot* 1247 (pI 6,2, MW 13,79, Figura 7) nos reprodutores A, B, E e F no PC, contudo essa proteína apresentou maior expressão no reprodutor B e esse *spot* corresponde ao Elemento modulador de AMPc que atua como regulador transcricional e possui importante papel na espermatogênese e na maturação da espermátide (PATI, 1999). Vale salientar que a alteração na sua expressão está associada à infertilidade em humanos e equinos (BLÖCHER *et al.*, 2003).

Figura 7. Proteína diferencialmente expressa no reprodutor B no período chuvoso.



Análise foi realizada pelo software *ImageMaster 2D Platinum 6.0* (GE-Healthcare) considerando a porcentagem do volume dos *spots*. Nos histogramas as barras vermelhas mostram o desvio padrão das médias da intensidade do volume e a azul indica a média aritmética.

6 CONCLUSÃO

Os parâmetros seminais não foram afetados pelo o efeito da sazonalidade, o que evidencia o papel das proteínas na manutenção da qualidade espermática. Contudo, os nossos resultados apontam para a influência da sazonalidade na expressão de algumas proteínas, as quais podem ser fortes candidatas a biomarcadores de fertilidade e podem estar relacionadas a várias características do espermatozoide como maturação, capacitação, reação acrossômica e interação entre os gametas. Sendo que de uma forma geral verificou-se uma tendência das proteínas aumentarem o nível de expressão no período chuvoso. Além disso, nós descrevemos pela primeira vez o perfil protéico de espermatozoides da raça caprina Moxotó. E diante dos resultados obtidos pela raça Moxotó tornam-na atrativa para a realização de estudos moleculares que contribuam para a elucidação dos processos de fertilidade e para a melhoria da reprodução animal.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.
- AITKEN, R.J, BAKER, M.A. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. **International Journal of Andrology**, v. 31, 295 – 302, 2008.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 334-346, 1995.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 28, p. 1129-1136, 1983.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.14, p.397-406, 1993.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.14, p.397-406, 1993.
- BAKER, M. A.; WITHERDIN, R.; HETHERINGTON, L.; CUNNINGHAM-SMITH, K.; AITKEN, R. J. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1003–1012, 2005.
- BAKER, M.A.; REEVES, G.; HETHERINGTON, L.; AITKEN, R. J. Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip pre-fractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis. **Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 482-495, 2010.
- BALDI, E. LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MURATORI, M.; FORTI, G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.110-123, 2000.
- BAO, S.; BAO, S.; MILLER, D.J.; MA, Z.; WOHLTMANN, M.; ENG, G.; RAMANADHAM, S.; MOLEY, K.; TURK, J. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 38194-38200, 2004.
- BEDFORD, J. M.; HOSKINS, D. D. **The mammalian spermatozoon : morphology, biochemistry and physiology**. In: Marshall's physiology of reproduction II. Reproduction in the male. (ed.G. E. Lamming). UK : Longman, 1990, p. 379 -568.
- BELLIN, M.E.; BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E.; ZHANG, H.; SMITH R. G.; FORREST, D. W.; SPROTT, L. R.; AX, R. L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.76, p.2032-2039, 1998.

BLÖCHER, S.; BEHR, R.; WEINBAUER, G.F.; BERGMANN, M.; STEGER, K. Different CREM-isoform gene expression between equine and human normal and impaired spermatogenesis **Theriogenology**, v.60, p.1357-1369, 2003.

BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; MADAN, L. P.; KING, W. A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v. 68S, p. 147-155, 2007.

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

BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 187, p. 139-144, 2002.

BREWIS, I. A.; GADELLA, B. M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, v.16, n.2, p. 68 – 79, 2010.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

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

CARRELL, D.T.; EMERY, B.R.; HAMMOUD, S. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. **International Journal of Andrology**, v.31, 537–545, 2007.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 1998. p. 10.

CHACUR, M.G.M.; CASTILLO, A.M.N.; GODOY, G.B.; GANDOLFO, V.S.; MACHADO NETO, N.B.; KRONKA, S.N.; GUABERTO, M.L. Influência da estação sobre as proteínas do plasma seminal na raça tabapuã (bos taurus indicus), **Archivos de Zootecnia**, v. 60. n.230, p. 301-304, 2011.

CHEMINEAU, P. **Medio ambiente y reproducción animal**. 2004, Disponível em: <http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/WAR/warall/v1650b/v1650b04.htm>. Acesso: 20/12/2011.

CHENG, F. P.; WU, J.T.; CHAN, J. P. W.; WANG, J.S.; FUNG, H.P.; COLENBRANDER, B.; TUNG, K.C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v. 61, p. 1605-1616, 2004.

CHO, C.; BUNCH, D. O.; FAURE, J. E.; GOULDING, E. H.; EDDY, E. M.; PRIMAKOFF, P.; AND MYLES, D. G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. **Science**, v. 281, 1857–1859, 1998.

COELHO, L.A.; SASA, A.; NADER, C.E.; CELEGUINI, E.C.C. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.544-549, 2006.

COELHO, L.A.; SASA, A.; NADER, C.E.; CELEGUINI, E.C.C. Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.544-549, 2006.

COHEN, D. J.; DA ROS, V.G.; BUSSO, D.; ELLERMAN, D.A.; MALDERA, J.A.; GOLDWEIC, N.; CUASNICÚ, P. S. Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p. 528–532, 2007.

COHEN, D.J.; MALDERA, J.A.; VASEN, G.; ERNESTO, J.I.; MUÑOZ, M.W.; BATTISTONE, M.A.; CUASNICÚ, P.S. Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. **Journal of Andrology**, 2011. Disponível em: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/rapidpdf/jandrol.110.012922v1.pdf>. Acesso em: 29 dezembro, 2011.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, v. 130, p.395 – 398, 2007.

CROSS, N.L. Phosphatidylcholine enhances the acrosomal responsiveness of human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 484-488, 1994.

DACHEUX, J.L.; BELGHAZI, M.; LANSON, Y.; DACHEUX, F. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 250, p. 36-42, 2006.

DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.; LUC, J.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v.63, p.319-341, 2005.

DACHEUX, J.L.; VOGLMAYR, J.K. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. **Biology of Reproduction**, v.29, p. 1033-1046, 1983.

DE JONGE, C. J.; HAN, H.-L.; LAWRIE, H.; MACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. D. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effector of adenylate cyclase/cyclic AMP second messenger pathway. **Journal of Experimental Zoology**, v. 258, p.113-125, 1991.

DE JONGE, C. J.; HAN, H.L.; LAWRIE, H.; MACK, S.R.; ZANEVELD, L. J.; DOIGUCHI, M.; YUKI MORI, T.; TOSHIMORI, K.; SHIBATA, Y.; IIDA, H. Spergen-1 Might Be an Adhesive Molecule Associated with Mitochondria in the Middle Piece of Spermatozoa, **Developmental Biology**. v. 252, n.1, p. 127-137, 2002.

DU PLESSIS, S.S.; KASHOU, A.H.; BENJAMIN, D.J.; YADA, S.P.; AGARWAL, A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p.36, 2011.

DUDLEY, R. K. TCP-11, the product of a mouse *t*-complex gene, plays a role in stimulation of capacitation and inhibition of the spontaneous acrosome reaction, **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, p. 375–382, 1997.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. **The Spermatozoon**. In Knobil E, Neill JD (eds). The physiology of reproduction. 2 ed. New York: Raven Press Ltd, 1994. p. 29 – 78.

EDDY, E.M.; WELCH, J.E.; O'BRIEN, D.A. Gene expression during spermatogenesis. In de Kretser, D.M. (ed.), **Cellular and Molecular Mechanisms in Male Reproduction**. Academic Press, London, UK, p. 181-232, 1993.

EDDY, M. Spermatogenesis and HSP70 chaperones. **Biology Reproduction, Encyclopedia of Reproduction**, v.2, p.1-17, 1999.

ELOY, A. M. X. **Estudo da biodiversidade na região semiárida raça Moxotó**. Portal do Agronegócio. Seção Artigos, 15 dez., 2010. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=48035>.

EL-GEHANI, F.; ZHANG, F.-P.; PAKARINEN, P.; RANNIKKO, A.; HUHTANIEMI, L. Gonadotropin-Independent Regulation of Steroidogenesis in the Fetal Rat Testis. **Biology of Reproduction**, v.58, p.116-123, 1998.

ESPOSITO, G.; JAISWAL, B.S.; XIE, F.; KRAJNC-FRANKEN, M. A. M.; ROBBEN T. J. A. A.; STRIK, A.M.; KUIL, C.; PHILIPSEN, R. L. A.; DUIN, M.V.; CONTI, M.; GOSSEN, J. A. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.101, p.2993– 2998, 2004.

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

FOUCHÉCOURT, S.; MÉTAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, Madison, v.62, p.1790-1803, 2000.

FRASER, L. R.; HOSSEINI, R.; HANYALOGOU, A.; TALMOR, A.; DUDLEY, R. K. TCP-11, the product of a mouse *t*-complex gene, plays a role in stimulation of capacitation and inhibition of the spontaneous acrosome reaction. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, n.3, p.375-382, 1997.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, 68, 249-65, 2001.

GATTI, J.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.321-339, 2004.

GATTI, J.-L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 965–972, 2009.

GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 965–972, 2009.

GOMES, C. A. V.; FURTADO, D. A.; MEDEIROS, A.N.; SILVA, D.S.; PIMENTA FILHO, E.C.; DE LIMA JÚNIOR, V. Efeito do ambiente térmico e níveis de suplementação nos parâmetros fisiológicos de caprinos Moxotó. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande-PB, v.12, n.2, p.213–219, 2008.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S.; WESER, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. **Electrophoresis**, v. 6, p.599-604, 1985.

GOVIN, J.; CARON, C.; ESCOFFIER, E.; FERRO, M.; KUHN, L.; ROUSSEAU, S.; EDDY, E.M.; GARIN, J.; KHOCHBIN, S. Post-meiotic Shifts in HSPA2/HSP70.2 Chaperone Activity during Mouse Spermatogenesis, **The journal of biological chemistry**, v.281, n. 49, p. 37888 -37892, 2006.

GUR, Y.; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes & Development**, v. 20, p.411–416, 2006.

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, p.809-815, 2003.

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

HANCOCK, L.W.; RAAB, L.S.; ARONSON, N.N. Synthesis and processing of rat sperm-associated alpha-L-fucosidase. **Biology of Reproduction**, v.48, n. 6, p.1228-38, 1993.

HESS, R.A.; FRANÇA L.R. **Structure of the Sertoli cell**. In: Skinner M.K., Giswold M.D. (Eds). Sertoli cell biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005:19-40p.

HO, H.C.; SUAREZ, S.S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122 p.519–526, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Senso Agropecuário, 2010 Disponível em: www.ibge.gov.br.

IJIRI, T.W.; MERDIUSHEV, T.; CAO, W.; GERTON, G. Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation. **Proteomics**, v. 11, p. 4047–4062, 2011.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia, 2010. Disponível em: www.inmet.gov.br.

INOUE, N.; IKAWA, M.; ISOTANI, A.; OKABE M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, v. 434, p. 234-8, 2005.

JAISWAL, B.S.; MAJUNDER, G.C. Biochemical parameters regulating forward motility “in vitro” in goat immature epididymal spermatozoa. **Reproduction Fertility Development**, v.10, p.299-307, 1998.

JEULIN, C.; SOUFIR, J.C.; WEBER, P.; LAVAL-MARTIN, P.; CALVAYRAC, V. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, Malden, v. 24, p. 185-196, 1989.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Stress depression and the hippocampus. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p 46-51, 2003.

JOHN, A.; BAKER, M.A. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *International Journal of Andrology*, v. 31, p. 295–302, 2008.

JONES, R.C.; MURDOCH, R.N. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, n.4, p. 553 – 568, 1996.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L.L. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. **The journal of cell biology**, v. 65, n. 2, p. 258-270, 1975.

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

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

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tools for the new biology**. Totowa: Humana Press, 2002.

LIU, Y.; JIANG, M.; LI, C.; YANG, P.; SUN, H.; TAO, D.; ZHANG, S.; MA, Y. Human t-Complex Protein 11 (TCP11), a Testis-Specific Gene Product, Is a Potencial Determinant of the Sperm Morphology, **The Tohoku Journal of Experimental Medicine** v. 224, p. 111-117, 2011.

MA, L.; BUCHOLD, G.M.; GREENBAUM, M.P.; ROY, A.; BURNS, K. H.; ZHU, H.; HAN, D. Y.; HARRIS, R.A.; COARFA, C.; GUNARATNE, P. H.; YAN, W.; MATZUK, M.M. GASZ Is Essential for Male Meiosis and Suppression of Retrotransposon Expression in the Male Germline. **PLoS genetics**, v.5, n.9, p.1-15, 2009.

MACHADO, R.; FREITAS, A. R.; SIMPLÍCIO, A. A. **Flutuações sazonais e efeitos de raça no sêmen caprino**. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37., 2000, MG. Resumos dos trabalhos apresentados. Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia. p.176, 2000.

MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.175-179, abr./jun. 2011.

MALDERA, J.A.; VASEN, G.; ERNESTO, J.; WEIGEL-MUÑOZ, M.; COHEN, D.J.; CUASNICU, P. Evidence for the Involvement of Zinc in the Association of CRISP1 with Sperm During Epididymal Maturation in Rats. **Biology of Reproduction**, 2011.

MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P.S.; FAN, J.; WRIGHT, M.W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 80, p.394-397, 2009.

MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCÀ, J.L.; OLIVA, R. Proteomic identification of human sperm proteins. **Proteomics**, v.6, p.4356-4369, 2006.

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

MATTHIESEN, R. **Mass spectrometry data analysis in proteomics**. Totowa: Humana Press, 2007.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1273-1280, 2000.

MEYERHOEFFER, D. C.; WETTERMANN, R. P.; COLEMAN, S. W. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 4, p. 352, 1985.

MIRANDA, P.V.; BRANDELLI, A.; TEZON, J.G. Caracerization of beta-N-acetylglucosaminidase from human epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 18, p. 263-270, 1995

MOORE, H. D. M.; HIBBITT, K. G. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 46, p.71-76, 1976.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v.74, p.214-222, 2006b.

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

MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A.; RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.A.M.; OLIVEIRA, R.V.; MENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.

NAGAMORI, I.; YOMOGIDA, K.; ADAMS, P.D.; SASSONE-CORSI, P.; NOJIMA, H. Transcription Factors, cAMP-responsive Element Modulator (CREM) and Tisp40, Act in Concert in Postmeiotic Transcriptional Regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.15073-15081, 2006.

NOVAK, S.; SMITHA, T.A.; PARADISA, F.; BURWASHB, L.; DYCKA, M.L.; FOXCROFT, G.R.; DIXONA, W.T. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**. v. 74, p.956–967, 2010.

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

NUNES, J.F.; RIERA, G.S.; SILVA, A. E. F.; LEÓN, B. F. A. P.; LIMA, F. A. M. **Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. Sobral: EMBRAPA/CNPCAPRINOS, 1983. 11p.

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

OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUUMP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, p.419-425, 2009.

OLIVEIRA, J.C.V.; DE, L.L.; DA ROCHA, M.N.; RIBEIRO, E.M.A.; GOMES, FILHO. Caracterização e perfil genético visível de caprinos nativos no estado de Pernambuco. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 55, n 209, p. 63-73, 2006.

OLLERO, M.; GARCÍA-LÓPEZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Surface changes of RAM spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two- phases system. **Reproduction Fertility Deveolpment**, v. 9, p. 81-390, 1997.

PAIVA, S.R.; BARRETO, G.B.; FARIA, D.A.; DA SILVA, F.L.R.; FACÓ, O.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S; ARAÚJO, A.M. Uso de haplótipos de mtDNA na conservação das raças caprinas (*Capra hircus*) moxotó e caniné no nordeste do Brasil. In: RESUMOS DO 54º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. Disponível: http://web2.sbg.org.br/Downloads/Pdf_premiopainel/54CBG/ResumosPremiados/IniciacaoCi entifica/GA/oral/3_lugar.pdf.

PALERMO, G.D.; COLOMBERO, L.T.; ROSENWAKS, Z. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. **Reproduction**, v.1, n.2, p.19-27, 1997.

PATERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature**, v. 33, p. 311-323, 2003.

PATI, D. ; MEISTRICH, M. L. ; PLO, S. E. Human Cdc34 and Rad6B Ubiquitin-Conjugating Enzymes Target Repressors of Cyclic AMP-Induced Transcription for Proteolysis. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 5001-5013, 1999.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J.M.; BURGESS, S.C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v.2, p.19, 2008.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends in Genetics*, v. 16, p. 83-87, 2000.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.; Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, 49, 48-57, 1998.

RANA, A.P.; MAJUMDER, G.C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1061, p.185 -196, 1991.

REESE, K.L.; ARAVINDAN, R.G.; GRIFFITHS, G.S.; SHAO, M.; WANG, Y.; GALILEO, D.S.; ATMURI, V.; TRIGGS-RAINE, B.L.; MARTIN-DELEON, P.A. Acidic Hyaluronidase Activity Is Present in Mouse Sperm and Is Reduced in the Absence of SPAM1: Evidence for a Role for Hyaluronidase 3 in Mouse and Human Sperm. **Molecular Reproduction & Development**, v. 77, p. 759-772, 2010.

RÊGO, J.P.A. **Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

REN, D.; NAVARRO, B.; PEREZ, G.; JACKSON, A.C.; HSU, S.; SHI, Q.; TILLY, J.L.; CLAPHAM, D.E. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. **Nature**, v.413, p. 603-609, 2001.

ROMANELLI, F.; FILLO, S.; ISIDORI, A.; CONTE, D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro. **Neuropeptides**, v.31, n.4, p.311-31, 1997.

ROSSATO, M.; NOGARA, A.; GOTTARDELLO, F.; BORDON, P.; FORESTA, C. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Stimulates Rat Leydig Cell Steroidogenesis Through a Novel Transduction Pathway. **Endocrinology**, v.138, n.8, p. 3228-3235, 1997.

ROUSSEAU, S.; CARON, C.; GOVIN, J.; LESTRAT, C.; FAURE, A.-K.; S. Establishment of male-specific epigenetic information. **Gene**. v. 345, p.139-153, 2005.

SAMY, E.T.; LI, J.C.H.; GRIMA, J.; LEE, W. M.; SILVESTRINI, B.; CHENG, C.Y. Sertoli Cell Prostaglandin D2 Synthetase Is a Multifunctional Molecule: Its Expression and Regulation. **Endocrinology**, v. 141, p. 710-721, 2000.

SÁNCHEZ-LUENGO, S.; AUMÜLLER, G.; ALBRECHT, M.; SEN, P.C.; RÖHM, K.; WILHELM, B. Interaction of PDC-109, the Major Secretory Protein From Bull Seminal Vesicles, With Bovine Sperm Membrane Ca²⁺-ATPase. **Journal of Andrology**, American Society of Andrology, v. 25, p.234-244, 2004.

SANTOS, A.D. F.; TORRES, C. A.A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A.M.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; ROVAY, H. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 35, n. 5, 2006.

SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1835-41, 2000.

SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos a insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 9, p.1835-1841, 2000.

SANTOS, D.O., 2005. Estudo do perfil protéico nas membranas de espermatozóides congelados de caprinos. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina e Zootecnia – UNESP – Botucatu-SP, 62p.

SANTOS, E. D.G.; PAULINO, M.F.; LANA, R.P.; VALADARES, S.C.; QUEIROZ, D.S. Influência da Suplementação com concentrados nas características de carcaça de bovinos limousin, nelore, não castrados, durante a seca, em pastagens de braquiária decumbens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1823-1832, 2002.

SANTOS, F.C.B.; SOUZA, B.B.C.; ALFARO, E.P.; FONTES, M.C.; PIMENTA FILHO, E.C.; ACOSTA, ALFONSO, A.A.; SANTOS, J. R.S. Adaptabilidade de Caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 142-149, jan./fev. 2005.

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

SCHUBERT, S.; SCHMIDTKE, J. Transgenic Mouse Studies to Understand the Regulation, Expression and Function of the Testis-Specific Protein Y-Encoded (TSPY) Gene. **Genes**, v.1 ,n. 2, p. 244-262, 2010.

SEGUI, M.S.; TURRA, T.A.; FALEIROS, E.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; SANTOS, I.W. Correlação entre a biometria testicular, a idade e as características reprodutivas de touros da raça nelore, **Archives of Veterinary Science**. v.16, n.1, p.1-6, 2011.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p.835-850, 1996.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990, 526p.

SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v. 16, p.464-468, 1995.

SILVA, A.E.D.F; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; JÚNIOR, C.B. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1890-1900, 2003.

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

SOMLEV, B.; HELILI, K.; KARCHEVA, V. Tissue kallikrein activity in seminal plasma of bovine ejaculates with different quality. **Theriogenology**, v.45, p.471-475, 1996.

SOUZA, C. E. A. **Análise proteômica do plasma seminal e secreções do epidídimo em ruminantes: potenciais associações com o desenvolvimento sexual, parâmetros seminais e função espermática**. 2007. 161f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, 2007.

SOUZA, A. F. **Perfil das proteínas do sêmen de caprinos da raça Alpina Americana nas estações seca e chuvosa**. 2008. 107f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PB, 2008.

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**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1166-1172, jul, 2009.

SOUZA, E. D.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H. Determinação dos parâmetros fisiológicos e gradiente térmico de diferentes grupos genéticos de caprinos no Semi-Árido. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.177-184. 2005.

SPROTT, L. R.; HARRIS, M. D.; FORREST, D. W.; YOUNG, J.; ZHANG, H. M.; OYARZO, J. N.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, v.78, p.795-798, 2000.

TEIXEIRA, A.V.C. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Animal Reproduction**, v.6, n.4, p.516-525, 2009.

TESARIK, J.; MENDOZA, C. Insights into the function of sperm surface progesterone receptor: Evidence of ligand induced receptor aggregation and implication of proteolysis. **Experimental Cell Research**, v. 205, p. 111-117, 1993.

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

THIMON, V.; DACHEUX, J.-L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.321-339, 2004.

TOMINAGA, A.; WARA, H.S.; FUTAGAWA, T.; INOUE, K.; SASAKI, K.; MINAMINO, N.; HATAKEYAMA, M.; HANDA, H.; MIYATA, A. Characterization of the testis-specific promoter region in the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. **Genes to Cells**, v.15, p.595–606, 2010.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility: A clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14, p.243-58, 2008.

TSAI-MORRIS, C.H.; SHENG, Y.; GUTTI, R.K.; TANG, P.Z.; DUFAU, M.L. Gonadotropin-Regulated Testicular RNA Helicase (GRTH/DDX25): A Multifunctional Protein Essential for Spermatogenesis. **Journal of Andrology**, v.31, n.1, 2010.

TULSIANI, D.R.; ORGEBIN-CRIST, M.C.; SKUDLAREK, M.D. Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v.53, p.85-97, 1998b.

TULSIANI, D.R.P. Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: Are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 18-27, 2003.

URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p.17–26, 2003.

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

VAN GESTEL, R.A.; BREWIS, I.A.; ASHTON, P.R.; BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. **Molecular Human Reproduction**, 2007; 13:445 – 454.

VERKAAR, E.L.; ZIJLSTRA, C.; VAN 'T VELD, E.M.; BOUTAGA, K.; VAN BOXTEL, D.C; LENSTRA, J.A. Organization and concerted evolution of the ampliconic Y-chromosomal TSPY genes from cattle. **Genomics**, v.84, n.3, p.468-474, 2004.

VIEIRA, R.J.; CARDOSO, F.T. S.; AZEVEDO, L.M.; CUNHA, L.A. L.; SALVIANO, M. B. Influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, p. 376-380, 2008.

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

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

VJUGINA, U.; ZHU, X.; OH, E.; BRACERO, N.J.; EVANS, J.P. Reduction of mouse egg surface integrin alpha9 subunit (ITGA9) reduces the egg's ability to support sperm-egg binding and fusion. **Biology of Reproduction**, v. 80, p.833 – 841, 2009.

WAKABAYASHI, H.; MATSUMOTO, H.; HASHIMOTO, K.; TERAGUCHI, S.; TAKASE, M.; HAYASAWA, H. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.63, p.955-957, 1999.

WARD, C.R.; STOREY, B.T.; KOPF, G.S.; Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13254-58, 1994.

WARD, W.S.; McCARTHY, S.; KLAUS, A. et al. The function of higher order sperm chromatin structures. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.84, 1999.

XIE, F.; GARCIA, M.A.; CARLSON, A.E.; SCHUH, S.M.; BABCOCK, D.F.; JAISWAL, B.S.; GOSSEN, J.A.; ESPOSITO, G.; VAN DUIN, M.; CONTI, M Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. **Developmental Biology**, v. 296, p.353-362, 2006.

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**. In: Knobil E., Neil J.D. (Eds). The physiology of reproduction. 3ed. Vol. 1, San Diego: Elsevier Academic Press: 55-112p, 2006.

YANAGIMACHI, R.; KNOBIL. E.; NEILL, J.D. **Mammalian Fertilization**. In Knobil E, Neill JD (eds). The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press Ltd, 1994, p. 189 – 317.

YU, Y.E.; UNNI, E.; ZHANG, Y. et al. Spermatogenesis in mice lacking transition nuclear proteins in condensing spermatids. **Biology of Reproduction**, v.60, Suppl. 1, p.76, 1999.

YUAN,Y.Y. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.68, p.904-913, 2003.

ZENICK, H.; CLEGG, E.D.; PERREAULT, S.D.; KLINEFELTER, G.R.; GRAY, L.E.; Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press; 1994.

ZHOU, C.; HUO, R.; WANG, F.-Q.; LIN, M.; ZHOU, Z.M.; SHA, J.H. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. **Fertility and Sterility**, v. 87, p.436-438, 2007.

ZHU, G.Z.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. Testase 1 (ADAM 24) a plasma membrane-anchored sperm protease implicated in sperm function during epididymal maturation or fertilization. **Journal of Cell Science**, v.114, p.1787-1794, 2001.

ANEXO

Tabela 4. Proteínas similares nos períodos chuvoso e seco de amostras de espermatozoides de caprinos da raça moxotó, identificadas através do banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy.

Proteína	pI		Massa molecular		Nº de acesso	Organismo
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental		
RNA helicase dependente de ATP DDX25	6,00	6,03	54619	53806	Q2TBP1	<i>Bos taurus</i>
Calreticulina-3	5,66	5,64	42463	42501	Q2TBR8	<i>Bos taurus</i>
Modulador de elemento responsivo ao cAMP	5,44	5,54	29656	31150	Q03060-12	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 3 de canal de cátion associado ao esperma	6,21	6,21	45487	45256	Q80W99	<i>Mus musculus</i>
Proteína 4 de canal de cátion associado ao esperma	4,86	4,86	44229	43763	Q7RTX7-2	<i>Homo sapiens</i>
Molécula de adesão celular 1	4,95	5,05	48664	49839	Q8R5M8-2	<i>Mus musculus</i>
Clusterina cadeia alfa	4,90	4,83	25194	21317	P05371	<i>Rattus norvegicus</i>
Clusterina cadeia beta	6,44	6,54	23900	23812	P05371	<i>Rattus norvegicus</i>
Clusterina	5,47	5,5	49077	50122	P05371	<i>Rattus norvegicus</i>
Proteína 3-like protein 4 de ligação a elemento responsivo ao AMP cíclico	6,24	6,24	41025	41218	Q9D2A5	<i>Mus musculus</i>
Ciclina-A1	5,47	5,47	47772	48171	Q61456	<i>Mus musculus</i>
Proteína 24 contendo-domínio Desintegrina e Metalloproteinase	5,45	5,46	62254	62359	Q9R160	<i>Mus musculus</i>
Proteína 25 contendo-domínio Desintegrina e Metalloproteinase	6,07	6,16	61720	60101	Q9R159	<i>Mus musculus</i>
Proteína 26 A contendo-domínio Desintegrina e Metalloproteinase	5,75	5,74	57541	57925.0	Q9R158	<i>Mus musculus</i>
E3 ubiquitina-proteína ligase SIAH1	6,13	6,23	21215	21640	Q8IUQ4-3	<i>Homo sapiens</i>
E3 ubiquitina-proteína ligase SIAH1A	6,35	6,36	31137	31719	P61092	<i>Mus musculus</i>

Tabela 4. Proteínas similares nos períodos chuvoso e seco de amostras de espermatozoides de caprinos da raça moxotó, identificadas através do banco dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy.

(continua)

Proteína	pI		Massa molecular		Nº de acesso	Organismo
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental		
Proteína 1 de ligação à gametogenetina	5,94	6,01	40505	41104	Q6K1E7	<i>Mus musculus</i>
Proteína 2 de ligação à <i>gametogenetina</i>	6,37	6,42	32735	34198	Q9H3C7-2	<i>Homo sapiens</i>
Proteína-like 1 Germ cell-less	6,44	6,43	59654	59931	Q920G9	<i>Mus musculus</i>
Proteína 2 de choque térmico 70 kDa	5,50	5,49	69642	68987	P14659	<i>Rattus norvegicus</i>
Chaperona de histona ASF1B	4,46	4,47	22434	25151	Q9NVP2	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 1 contendo domínio HORMA	6,10	6,11	44785	45385	Q2KIY6	<i>Bos taurus</i>
Isoforma 3 de Tesmin OS	4,62	4,62	26737	25531	Q9Y4I5-3	<i>Homo sapiens</i>
Isoforma 3 da Tubulina cadeia delta	5,39	5,39	22381	22981	Q9UJT1-3	<i>Homo sapiens</i>
Antígeno 1 enhanced-masculino	4,13	4,14	19905	21259	Q16626	<i>Homo sapiens</i>
Proteína associada à MYCBP	6,49	6,51	47045	48720	Q5SUV2-2	<i>Mus musculus</i>
Receptor nuclear da subfamília 2 do grupo C do membro 2	5,89	5,85	65415	65255	P49116	<i>Homo sapiens</i>
Receptor nuclear da subfamília 6 do grupo A do membro 1	5,85	5,86	55976	56625	Q64249	<i>Mus musculus</i>
Nucleosídeo difosfato quinase homólogo 5	5,89	5,88	24236	28288	P56597	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 2 de fibra densa externa	6,13	6,29	88579	88783	Q5BJF6-2	<i>Homo sapiens</i>
Homólogo da proteína 2 paquitenos checkpoint	4,68	4,69	22084	20856	Q15645-2	<i>Homo sapiens</i>
Pituitária adenilato ciclase ativando polipeptídeo do receptor tipo I	5,96	5,94	54517	53806	P70205	<i>Mus musculus</i>
Pituitária adenilato ciclase ativando polipeptídeo do receptor tipo I A	6,27	6,28	57662	56948	P32215	<i>Rattus norvegicus</i>
Provável proteína ligase HERC4 à ubiquitina E3	6,19	6,16	25123	24008	Q6PAV2-3	<i>Mus musculus</i>

Tabela 4. Proteínas similares nos períodos chuvoso e seco de amostras de espermatozoides de caprinos da raça moxotó, identificadas através do banco dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy.

(continuação)

Proteína	pI		Massa molecular		Nº de acesso	Organismo
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental		
Pro-MCH	6,19	6,16	16332	16140	P20382	<i>Homo sapiens</i>
Protamina-3	4,57	4,56	11232	11538	Q9NNZ6	<i>Homo sapiens</i>
Complexo ativador do proteassoma subunidade 4	6,70	6,72	24699	23457	Q14997-4	<i>Homo sapiens</i>
Proteína boule-like	6,6	6,66	37541	39476	Q8N9W6-2	<i>Homo sapiens</i>
Proteína dissulfeto-isomerase-like proteína dos testículos	5,69	5,7	65606	65255	Q9DAN1	<i>Mus musculus</i>
Homólogo 1 da proteína Hook	5,09	5,09	84648	88391	Q9UJC3	<i>Homo sapiens</i>
Proteína SPATIAL	6,33	6,35	43842	43642	Q7TSD4	<i>Mus musculus</i>
RNA helicase putativa dependente de ATP TDRD9	5,75	5,76	62518	62183	Q3MHU3-2	<i>Rattus norvegicus</i>
Proteína putativa 1 de ligação a gametogenetina	5,30	5,34	12309	11189	Q5YKI7	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 114 RING finger	6,65	6,63	25746	27942	Q9ET26	<i>Mus musculus</i>
Carreadora de soluto família 22 membro 16	6,16	6,26	64355	62537	Q17QN9	<i>Bos taurus</i>
Proteína 1 contendo hélice básica-hélice-loop espermatogenesis e oogenesis-específica	4,59	4,57	40662	40591	Q5JUK2-2	<i>Homo sapiens</i>
Protein 19 associada à espermatogenesis, mitocondrial	5,20	5,38	15242	17757	Q920Q3	<i>Rattus norvegicus</i>
Proteína 20 associada à espermatogenesis	6,55	6,51	88191	86074	Q6T393	<i>Rattus norvegicus</i>
Proteína 9 associada à espermatogenesis	5,97	5,99	20172	18051	Q9BWV2-2	<i>Homo sapiens</i>
Espermidina sintase	5,3	5,36	33825	33398	P19623	<i>Homo sapiens</i>
Homólogo da proteína 11 do complexo-T	5,20	5,15	49501	48998	Q8WWU5-3	<i>Homo sapiens</i>

Tabela 4. Proteínas similares nos períodos chuvoso e seco de amostras de espermatozoides de caprinos da raça moxotó, identificadas através do banco dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent do ExPASy.

(conclusão)

Proteína	pI		Massa molecular		Nº de acesso	Organismo
	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental		
Proteína 11 do complexo-T	6,08	6,08	61971	62359	Q01755	<i>Mus musculus</i>
Tesmin	5,50	5,49	55025	56465	Q9Y4I5	<i>Homo sapiens</i>
Serina testículo específico /treonina-proteína quinase 3	6,26	6,23	30102	30506	Q96PN8	<i>Homo sapiens</i>
Proteína codificada Y específica do testículo 1	5,26	5,56	36619	36462	O19110	<i>Bos taurus</i>
Proteína codificada Y específica do testículo 2	5,3	5,27	35100	35214	A6NKD2	<i>Homo sapiens</i>
Proteína codificada Y específica do testículo 3	5,23	5,23	35101	36564	P0CV98	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 2 contendo domínio Tiorredoxina	5,34	5,34	57767	58090	Q6P902	<i>Mus musculus</i>
Proteína 5 fator de transcrição-like	6,44	6,4	52697	53301	Q9UL49	<i>Homo sapiens</i>
Fator de iniciação de transcrição TFIID subunidade 7-like	5,09	5,1	43461	43885	Q9D3R9-2	<i>Mus musculus</i>
Proteína YY1 do repressor transcricional	5,8	5,76	44713	43885	P25490	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 1 associada à translina interagindo com fator X	4,61	4,66	42299	42978	Q2TAA8-2	<i>Homo sapiens</i>
Proteína X associada à translina	6,11	6,19	33113	33351	Q99598	<i>Homo sapiens</i>
Tubulina cadeia delta	6,63	6,66	51023	49137.0	Q9R1K7	<i>Mus musculus</i>
Proteína 1 contendo domínio Tudor	5,16	5,28	79171	79483.0	Q9BXT4-4	<i>Homo sapiens</i>
Proteína 7 contendo domínio Tudor	6,32	6,3	47539	48171	Q8NHU6-3	<i>Homo sapiens</i>
Homólogo C da proteína 14 associada ao RNA nucleolar pequeno U3	6,7	6,61	87188	87612.0	Q5TAP6	<i>Homo sapiens</i>
Proteína C11 ou f20(+5) não caracterizada	5,8	5,83	22839	21758	Q9NTU4	<i>Homo sapiens</i>
Homólogo da proteína C11 ou f20(+5) não caracterizada	6,41	6,54	22741	19385	Q9CQP8	<i>Mus musculus</i>

