

Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen

Proteins of goat seminal plasma related with precipitation index and semen quality

Andreia Fernandes de Souza^{*†} Maria da Conceição Gomes Leitão^{II} André Mariano Batista^I
Ana Lúcia Figueiredo Porto^I José Luiz de Lima Filho^{II} Maria Madalena Pessoa Guerra^I

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar as proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana criados na região Nordeste do Brasil que estão relacionadas ao índice pluviométrico e à qualidade do sêmen. O sêmen foi obtido pelo método de vagina artificial a partir de três reprodutores e foi avaliado quanto aos parâmetros macroscópicos e microscópicos. O perfil de proteínas do plasma seminal foi realizado por eletroforese bidimensional. Os parâmetros volume do sêmen, integridade do acrossoma e proteínas totais evidenciaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os períodos de alto (1,7mL, 90,3% e 372 μ g mL⁻¹, respectivamente) e baixo (1,2mL, 80,3% e 494 μ g mL⁻¹, respectivamente) índice pluviométrico. Foram detectados, nos períodos de alto e baixo índice pluviométrico, 47 e 49 spots de proteínas com massa molecular relativa de 4 a 106kDa e de 15 a 97kDa e ponto isoelétrico de 3,00 a 8,96 e de 4,48 a 9,83, respectivamente. Apenas no período de alto índice pluviométrico foram observados os grupo de proteínas de 13kDa e 45kDa. Conclui-se que o sêmen de caprinos da raça Alpina Americana criados na região Nordeste do Brasil apresenta-se com melhor qualidade quando colhido no período de alto índice pluviométrico, o que pode ser atribuído à presença das proteínas de 13kDa e 45kDa.

Palavras-chave: *Capra hircus*, chuvas, características seminais.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify proteins in seminal plasma of goats raised in the Northeast of Brazil related with precipitation index and semen quality. Semen was obtained from three bucks and evaluated to the microscopic and macroscopic parameters. The profile of seminal plasma proteins

was performed by analysis of two-dimensional electrophoresis. Volume, acrosome integrity and total proteins had significant difference ($P < 0.05$) between the periods of high (1.7mL, 90.3% and 372 μ g mL⁻¹, respectively) and low (1.2mL, 80.3% and 494 μ g mL⁻¹, respectively) precipitation index. It was detected during high and low precipitation index, 47 and 49 spots of proteins with molecular weight of 4 to 106kDa and 15 to 97kDa, and isoelectric point of 3.00 to 8.96, and 4.48 to 9.83, respectively. Only in the period of high precipitation index were observed groups of proteins with 13kDa and 45kDa. It can be concluded that semen of Alpine American goats raised in the Northeast of Brazil has best quality when obtained in the period of high precipitation index, which can be attributed to the presence of protein with 13kDa and 45kDa.

Key words: *Capra hircus*, rain, seminal characteristics.

INTRODUÇÃO

Nas regiões tropicais e subtropicais, os caprinos se reproduzem em todas as épocas do ano, porém sofrem influência de fatores ambientais, tais como alimentação e temperatura (NUNES, 1988). O estresse provocado por temperaturas ambientais elevadas, além de interferir nos parâmetros fisiológicos (temperatura retal e frequência respiratória), afeta o desempenho reprodutivo dos animais via eixo hipotálamo-pituitária-gônada (RIVER & RIVEST, 1991). No entanto, em países de clima temperado, a estação reprodutiva determina aumento na secreção das glândulas sexuais acessórias de caprinos e,

^IPrograma de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: afsfoster@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

conseqüentemente, no volume seminal, com redução na concentração espermática (LEBOEUF, 2000).

O plasma seminal proporciona boas condições para a manutenção da motilidade, da sobrevivência e do transporte espermático, tanto no sistema reprodutor do macho, quanto da fêmea (TÖPFER-PETERSEN et al., 2004). Entretanto, estudos sobre as proteínas do plasma seminal e da membrana espermática ainda precisam definir os tipos de proteínas e os mecanismos de ação que afetam a viabilidade desses gametas (ASADPOUR et al., 2007).

A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada espécie, podendo diferir entre os tipos e a atuação das proteínas espermáticas. O plasma seminal dos Bovídeos possui a família das proteínas designadas de BSP-A1/-A2 e BSP-A3 (15-17kDa), BSP-30 (28-30kDa) (MANJUNATH, 1984), e FMP, relacionadas à motilidade progressiva (37,5kDa). Em eqüinos, as proteínas HSP-1 (22-25kDa), HSP-2 (25kDa, pI 6,5-6,9), HSP-7 (14kDa) e HSP-12 kDa pertencem à família das espermadésinas, e a SP-1 possui correlação positiva com a fertilidade (TÖPFER-PETERSEN et al., 2004).

Em caprinos, LA FALCI et al. (2002) identificaram algumas proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina (HAPs), cuja massa molecular é de 73 a 104kDa e de 119 a 178kDa. No entanto, VILLEMURE et al. (2003) encontraram quatro bandas protéicas no plasma seminal de caprinos, denominando-as de GSP-14kDa, GSP-15kDa, GSP-20kDa e GSP-22kDa, homólogas às BSP.

O objetivo deste estudo foi identificar as proteínas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Alpina Americana criados na região Nordeste do Brasil, colhido nos períodos de baixo (BIP) e alto (AIP) índice pluviométrico, que estão relacionadas com a qualidade dos parâmetros seminais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Município de Camocim de São Felix, pertencente à região Agreste do Estado de Pernambuco (microrregião do Brejo), com altitude de 650m, 8°21', 35°45' (Lat.S, Long.W) e clima Tropical Úmido com temperatura mínima de 10°C e máxima de 26°C e umidade entre 40 e 70%. Foram utilizados três reprodutores caprinos da raça Alpina Americana, sexualmente maduros, com idade variando de 24 a 48 meses, submetidos ao regime semi-intensivo, com pastejo em capim Suázia (*Digitaria swazilandensis*), Tanzânia (*Panicum maximum*) e Braquiária (*Brachiaria humidicola*). Durante os dois períodos, os animais foram suplementados com 500g

de concentrado/dia, contendo 26% de proteína bruta e 82% de nutrientes digestíveis totais à base de milho (*Zea mays ssp*) triturado e farelo de soja (*Glycine hispida*, Maxin), além de capim Elefante (*Pennisetum purpureum*) no cocho. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

As colheitas de sêmen foram realizadas em duas épocas do ano classificadas de acordo com o índice pluviométrico (IP): alto IP (AIP), correspondendo aos meses de julho a agosto de 2005 (IP = 210mm e temperatura média de 18,8°C), e baixo IP (BIP), correspondendo ao mês de janeiro de 2006 (0mm e 22,7°C), de acordo com o Laboratório de Meteorologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP/LAMPE, 2007). Cada animal foi submetido a duas colheitas de sêmen consecutivas, por vagina artificial, com ajuda de uma fêmea como manequim e, em seguida, realizou-se o *pool* dos ejaculados, correspondendo à amostra de sêmen de cada reprodutor. Foram obtidas duas amostras de sêmen por semana, totalizando quatro amostras de cada reprodutor por período (AIP e BIP), correspondendo a 24 amostras de sêmen ao término do experimento.

Após cada colheita e formação do *pool* de dois ejaculados de cada animal, o sêmen foi submetido à avaliação macroscópica (cor, volume e aspecto) e microscópica (motilidade progressiva, vigor e concentração). A motilidade progressiva (MP; 0,0 - 100,0%) e o vigor espermático (0-5) foram avaliados de forma subjetiva, por meio da observação em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão), quando todos os ejaculados obtidos apresentavam MP e vigor mínimos de 80,0% e 3,0, respectivamente (CBRA, 1998). A concentração espermática foi realizada pela técnica de Câmara de Neubauer, e os resultados foram expressos em bilhões de espermatozóides por ejaculado (CBRA, 1998).

Para análise de integridade de acrossoma, foram utilizadas alíquotas (10µL) das amostras de sêmen diluídas em 1,0mL de solução Tris [3,605g de Tris (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 1,488g de frutose, 2,024g de ácido cítrico, 100mL de água bidestilada; pH 6,8] e utilizadas para confecção de esfregaços, os quais foram armazenados a 4°C, protegidos da luz e analisados pela técnica de coloração de fluoresceína isothiocianato-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA; Sigma, Saint Louis, MO, USA), de acordo com ROTH et al. (1998). Foram contados 200 espermatozóides/lâmina em microscópio de fluorescência (Olympus/Tóquio, Japão), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490nm, espelho dicromático de 510nm). Estes foram classificados em: a) acrossomas intactos, quando a região acrossomal apresentava

fluorescência verde; b) acrossomas reagidos, quando apresentavam fluorescência verde na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

Para análise do DNA, 10 μ L da amostra de sêmen foram armazenadas em 990 μ L da solução TNE [0,1576g de TRIS-HCl (0,01M), 0,877g de NaCl (0,15M), 37,2mg de EDTA.Na₂.2H₂O (1mM), q.s.p. 100mL; pH 7,4] a -196°C para posterior avaliação da integridade de DNA espermático usando o corante Laranja de Acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), segundo EVENSON et al. (2002). Duzentas células foram avaliadas em microscópio de fluorescência utilizando o filtro de fluoresceína (450 – 490nm, espelho dicromático de 510nm). As células coradas de verde fluorescente foram classificadas como portadoras de DNA íntegros, enquanto aquelas que emitiram fluorescência vermelha, laranja ou amarela foram classificadas como portadoras de DNA danificado.

Para dosagem das proteínas totais pelo método de BRADFORD (1976) e eletroforese bidimensional do plasma seminal, 1,0mL da amostra de sêmen foi centrifugado (600 x g) durante 10 minutos para separação dos espermatozoides do plasma seminal.

Durante a realização da eletroforese em SDS-PAGE de duas dimensões (2-D), a focalização isoeétrica (FI) foi realizada segundo BERKELMAN & STENSTEDT (2004) em fitas Immobiline Drystrip (7cm; pH de 3,0-10,0; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido), em duplicata para cada amostra analisada dos períodos de AIP e BIP. Antes da FI, as fitas foram reidratadas durante 15 horas a 28°C, em solução tampão contendo uréia (9M; Chemical, TK, Japão), CHAPS {3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanesulfonato} a 2%, Ditiotreitól (DDT) a 1%, gradientes imobilizados de pH -IPG (pH 3-10) a 2% e azul de bromofenol a 0,002%, contendo 60 μ g de plasma seminal. Para máxima reprodutibilidade, as focalizações foram conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1Vh, 200Vh, 2.800Vh, 3.500Vh, 4.200Vh e 3.500Vh durante 3h30min (voltagem total aplicada \approx 8,5kVh), utilizando o sistema de eletroforese Multiphor II (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A segunda dimensão em gel de poliacrilamida a 12,5% (2DE SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) foi conduzida em corrente constante de 15mA por gel, utilizando o sistema vertical (BIO-RAD). Os géis foram corados com prata. As análises dos géis 2-D foram realizadas com o programa Image Máster™ (2-D Platinum software; Amersham Biociences, England).

O experimento foi analisado em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, com 48 repetições. Para análise dos dados,

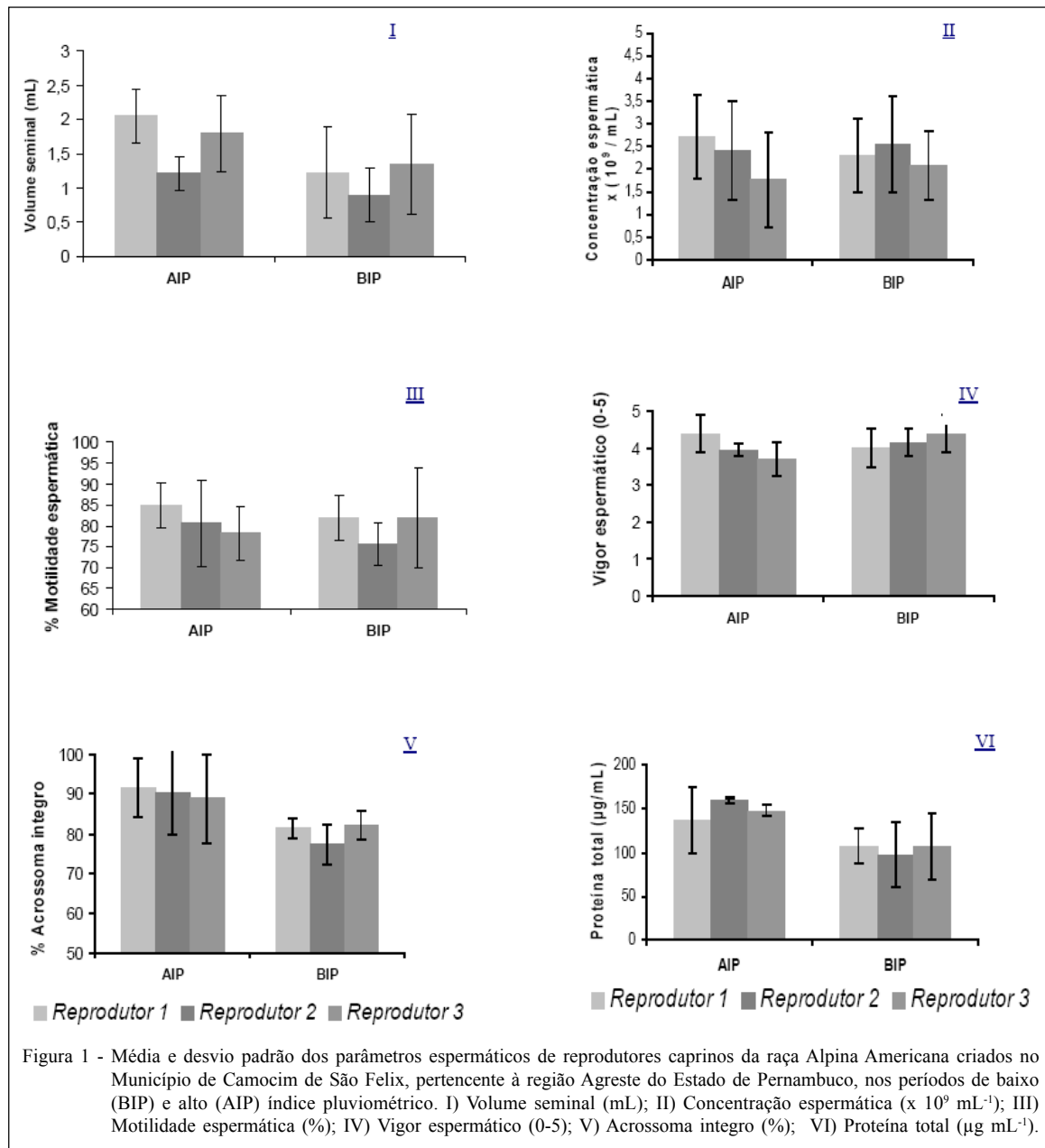
a média e o desvio padrão foram obtidos. Além disso, foram utilizados os testes estatísticos: F (ANOVA) para dois fatores e para um fator com comparações de Tukey, teste t-Student com variâncias iguais ou desiguais, teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de estatística inferencial). A verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada pelo teste F de Levene. Foi utilizado o nível de significância de 5%. Os dados foram processados e analisados pelo programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O volume seminal dos três reprodutores no período AIP (2,1; 1,2 e 1,8mL, respectivamente) foi maior ($P < 0,05$) do que no BIP (1,2; 0,9 e 1,4mL, respectivamente) está descrito na figura 1-I. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de maior disponibilidade de forragem verde e menor ocorrência de temperaturas elevadas no período chuvoso (AIP) ter determinado melhoria geral das condições corporais dos animais e maior volume seminal, o que corrobora com os resultados de NUNES (1988), ao relatar que na época de chuvas o sêmen de caprinos da raça Anglo-Nubiana apresenta melhores parâmetros quantitativos do que no período de seca, provavelmente devido à maior temperatura no período seco. A redução do volume seminal indica menos secreção das glândulas acessórias, determinando ausência ou diminuição de alguns constituintes, como proteínas do plasma seminal (SANTOS & SIMPLÍCIO, 2000).

Concentração, motilidade progressiva e vigor espermático não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre reprodutores e entre os períodos AIP ($2,3 \times 10^9$ mL⁻¹, 79,8%, 4,2) e BIP ($2,3 \times 10^9$ mL⁻¹, 81,3%, 4,0), respectivamente (Figura 1 - II, III e IV). Esses dados corroboram parcialmente com os resultados de SILVA et al. (2005), ao relatarem que os caprinos mestiços F1 (Anglo-Nubiana x SRD) encontram-se bem adaptados às condições climáticas do Semi-Árido paraibano, não apresentando alteração na motilidade e no vigor espermático durante o ano. Todavia, segundo esses autores, a concentração espermática apresentou-se reduzida no período mais quente do ano, diferindo dos resultados obtidos neste estudo.

A dosagem das proteínas totais apresentou maior concentração ($P < 0,05$) no período AIP (147,9 μ g mL⁻¹) do que no BIP (103,8 μ g mL⁻¹) de acordo com a figura 1 - IV, corroborando com outros estudos que evidenciam influência da estação do ano na composição do plasma seminal e nos índices de proteínas do sêmen



ovino (SMITH et al., 1999), do caprino (La FALCI et al., 2002) e do bovino (RONCOLETTA et al., 1999). A análise do perfil das proteínas do plasma seminal realizada com SDS-PAGE bidimensional nos períodos AIP e BIP detectou 96 *spots* de proteínas, sendo 47 *spots* com massa molecular relativa de 4 a 106kDa e pI de 3,00 a 8,96 no período AIP e 49 *spots* no período BIP, apresentando massa molecular relativa de 15 a 97kDa, com pI de 4,48 a 9,83. A maior diversidade de proteínas obtidas por meio da técnica de eletroforese foi encontrada no período BIP (49 *spots*), quando foi verificada ausência de proteínas de baixa massa

molecular (<15kDa), as quais, segundo JOBIM et al. (2003), encontram-se envolvidas na manutenção da motilidade espermática.

No período AIP, 76,6% dos *spots* de proteínas apresentaram pontos isoeletricos na faixa de pH ácido (3,0 a 6,8) e 23,4% em pH básico (7,1 a 9,1). Da mesma forma, no período BIP, 77,6% dos *spots* encontravam-se na faixa de pH ácido (4,6 a 6,9) e 22,5% de pH básico (7,6 a 9,6). Ao serem comparados os períodos AIP e BIP, foi verificada a presença de 22 *spots* de proteínas comuns, com 45,8% de similaridade entre as massas moleculares relativas dessas proteínas,

sendo 15 *spots* de proteínas entre 40 e 106kDa, correspondendo a 68,2% dos *spots* de proteínas similares e sete *spots* de proteínas com massas moleculares relativas entre 10 e 39kDa, correspondendo a 31,8% das proteínas similares.

Vários componentes do plasma seminal estimulam o metabolismo dos espermatozoides, atuando na manutenção da motilidade e na proteção espermática pela redução de peróxidos, como as proteínas ácidas do fluido seminal (aSFP; 13kDa) e a enzima desidrogenase láctica C4 (SILVA et al., 2003). Neste estudo, um grupo de proteínas de 13kDa (pI 8,96 a 5,73) foi identificado nas amostras do período AIP, sendo observados 90,3% de espermatozoides com acrossomas íntegros, sugerindo que essas proteínas auxiliam na preservação da integridade das membranas espermáticas (SILVA et al., 2003). Apenas no período AIP foram focalizadas proteínas com massa molecular relativa inferior a 15kDa, correspondendo a 22 *spots* de proteínas (46,8%) encontrados no gel de eletroforese.

Nos bovinos, as aSFP (15–16kDa e pI de 4,7-5,2; 11-12kDa e pI de 4,8-4,9; 13-14kDa e pI de 6,0-6,5; 18-20kDa e pI de 4,8-5,2) atuam como antioxidante na prevenção da peroxidação lipídica da membrana espermática, contrapondo o efeito deletério da elevada produção e liberação de peróxido das membranas de células mortas, com o objetivo de preservar a viabilidade dos espermatozoides vivos (JOBIM et al., 2003). Neste estudo, os resultados das análises das imagens dos géis pelo programa Image Máster apresentaram 10 *spots* de proteínas com menos de 18kDa, tanto no AIP (13kDa, pI 5,73-6,30; 12kDa, pI 9,14; 11kDa, pI 7,55; 10kDa, pI 7,73), quanto no BIP (17kDa, pI 6,08-6,44; 16kDa, pI 9,07; 15kDa, pI 7,58-7,59).

Em bovinos, algumas proteínas atuam na indução da motilidade progressiva, juntamente com o cAMP, tais como quatro a cinco proteínas com 37,5kDa (SHIVAJI et al., 1990) e proteínas BSP-A1/-A2 e BSP-A3, com massas moleculares relativas de 15-17kDa e 30kDa, respectivamente, e BSP-30, com massa molecular do 28-30kDa (MANJUNATH, 1984). Em caprinos essas proteínas estão presentes nas amostras de sêmen *in natura* e são denominadas de proteína seminal caprina (GSP; 14-15kDa). Segundo CARDOZO et al. (2006), essas proteínas estão relacionadas com a família das BSP e se ligam à membrana espermática durante o trânsito epididimário, atuando na capacitação espermática (VILLEMURE et al., 2003). Neste estudo, o grupo de proteínas com 14-15kDa esteve presente no plasma seminal em ambos os períodos avaliados (AIP e BIP), juntamente com outro grupo de proteínas com massas moleculares de 38-39kDa e pI de 5,21-5,42, onde foram observados valores de motilidade

progressiva iguais a 81,3 e 79,8%, respectivamente, corroborando as afirmações de VILLEMURE et al. (2003) e CARDOZO et al. (2006).

Em búfalos, ASADPOUR et al. (2007) afirmaram que o surgimento de uma proteína de 45kDa no plasma seminal é responsável pelo maior número de células espermáticas danificadas pós-descongelamento. Neste estudo, uma proteína com massa molecular relativa de 45kDa e pI 5,5 também foi identificada nas amostras de sêmen colhidas no período AIP. No entanto, as análises evidenciaram, neste período, maior porcentual ($P < 0,05$) de células com acrossomas íntegros (90,3%), em comparação com o BIP (80,3%), onde não foi identificada a presença desta proteína (Figura 1 - V). A perda da integridade da membrana espermática é um fator que contribui para o declínio da motilidade (ALMEIDA, 2006). No entanto, neste estudo foi observado maior porcentual ($P < 0,05$) de células com acrossomas íntegros no período AIP, mas não se constatou diferença significativa ($P > 0,05$) na motilidade progressiva nos períodos AIP e BIP, quando todos os ejaculados obtidos dos animais apresentavam valores de MP maior que 70,0%, considerados mínimos aceitáveis para um caprino reprodutor com potencial satisfatório (PUGH et al., 2006). Assim, sugere-se que esta proteína (45kDa e pI de 5,5) no plasma seminal de caprinos possui a função apenas de proteger a célula espermática de danos no acrossoma.

Determinadas proteínas do plasma seminal se aderem aos espermatozoides no trânsito epididimário ou durante a ejaculação, podendo retardar a capacitação e, conseqüentemente, a reação acrossômica (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002). Essas proteínas são denominadas de decapacitantes e são removidas ou modificadas pelos fluidos do sistema reprodutor feminino durante a capacitação espermática e a fecundação (FRAZER et al., 1996). As caltrinas, denominação dada às proteínas decapacitantes, são proteínas do plasma seminal que possuem baixa massa molecular (5 a 10kDa) e previnem o aumento da concentração de Ca^{2+} nos espermatozoides, evitando a capacitação espermática precoce provocada pelo processo de criopreservação (FLESCHE & GADELLA, 2000). Neste estudo, proteínas com massas moleculares relativas de 4 a 10kDa foram identificadas no período AIP, quando foi observado maior porcentual de células vivas com acrossomas íntegros.

Nas amostras do plasma seminal de caprinos colhidas nos períodos AIP e BIP, submetidas à eletroforese bidimensional, foram focalizadas proteínas com massas moleculares entre 78 e 106kDa (AIP) e 74 a 97kDa (BIP). Essas proteínas também foram denominadas por La FALCI et al. (2002) como proteínas

com afinidade à heparina (HAPs), com massa molecular de 73 a 104kDa e 119 a 178kDa, cuja presença pode ser responsável pela redução da motilidade espermática e da integridade do acrossoma. Os resultados deste estudo não corroboram com La FALCI et al. (2002), em virtude de a motilidade progressiva não ter demonstrado diferença significativa ($P>0,05$) entre períodos (AIP e BIP), enquanto o porcentual de espermatozoides com acrossomas íntegros foi maior ($P<0,05$) no período AIP do que no BIP, apesar desses parâmetros (motilidade e acrossomas íntegros) estarem dentro dos padrões estabelecidos para o sêmen caprino. Ressalta-se ainda que a análise do porcentual de espermatozoides com DNA íntegros nos períodos AIP e BIP demonstrou que os valores foram iguais ou próximos a 100,0%, sem evidenciar diferença ($P>0,05$) entre reprodutores, períodos ou interação reprodutor X período.

Com base nos resultados de volume seminal, porcentual de espermatozoides com acrossomas íntegros, assim como proteínas totais e perfil protéico do plasma seminal, é possível concluir que o sêmen de caprinos da raça Alpina Americana criados na região Nordeste do Brasil apresenta-se com melhor qualidade quando colhido no período de alto índice pluviométrico, o que pode ser atribuído à presença das proteínas de 13kDa e 45kDa.

AGRADECIMENTOS

Ao proprietário do Sítio da Aratanha, por ceder os animais para este experimento; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), pela oportunidade de realização das dosagens de proteínas; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.

ASADPOUR, S.M. et al. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.308-313, 2007. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T43-4N6FFRP-3&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=67fa5dc4deb19a19d022e4f69ff5fb9d. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.03.003.

BERKELMAN, T., STENSTEDT, T. **2D electrophoresis: principles and methods**. Uppsala: Amersham Pharmacia Biotechnology, 2004. 162p.

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

CARDOZO, J.A. et al. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, n.4, p.841-850, 2006. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCM-4JFHDVT-2&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=7dc4f7721b855d0e0da8aaa0d1108bec. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.058.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

EVENSON, D.P. et al. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v.23, n.1, p.25-43, 2002.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v.1469, p.197-235, 2000. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T22-41J60H2-4&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=75be9620af8c9a6d022979905b8dd57. Doi: 10.1016/S0304-4157(00)00018-6.

FRAZER, G.S. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-millilitre straws. **Theriogenology**, v.46, p.1103-1115, 1996.

JOBIM, M.I.M. et al. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

La FALCI, V.S.N. et al. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v.57, p.1035-1048, 2002. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCM-44YF8PM-2&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=d065c7b4d8c18b4cbabf8f2c4fd912f3. Doi: 10.1016/S0093-691X(01)00714-2.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html>. Doi: 10.1038/227680a0.

LEBOEUF, B. et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/>

science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T43-40TXY4W-6&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=124ffb60c770964dd29c4bc2f944b55b. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00156-1.

MANJUNATH, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in Bull seminal plasma. In: SAIRAM, M.R.; ATKINSON, L.E. (Eds.) **Gonadal proteins and peptides and their biological significance**. Singapore: World Scientific, 1984. p.49-61.

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

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

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513p.

RIVER, C.; RIVEST, S. Effect of stress of the activity of the hypothalamic-pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.45, p.523-532, 1991.

RONCOLETTA, M. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal, e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça GIR. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.2, 1999.

ROTH, T.L. et al. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v.58, p.475-482, 1998.

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.1835-1841, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X200000900016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Doi: 10.1590/S0100-204X200000900016.

SHIVAJI, S. et al. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley and Sons, 1990. 526p.

SILVA, A.E.D.F. et al. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1890-1900, 2003.

SILVA, G.A. et al. 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.

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

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.159-170, 2004. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T43-4GY891R-1&_user=687358&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037899&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687358&md5=301590b3f18f92bdce498384b99dacf. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.06.018.

VILLEMURE, M. et al. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.39, 2003.