



Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Iracelma Julião de Arruda

**PARÂMETROS REPRODUTIVOS E IDENTIFICAÇÃO DE IGF-II NOS
ESPERMATOZÓIDES DE CAPRINOS DA RAÇA BOER CRIADOS NO
NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Davide Rondina.

Fortaleza – Ceará

JUNHO, 2007

Universidade Estadual do Ceará
Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Título do trabalho: Parâmetros reprodutivos e identificação do IGF-II nos espermatozóides de caprinos da raça Boer criados no Nordeste do Brasil

Autor: Iracelma Julião de Arruda

Defesa em:

Conceito obtido:

Nota obtida:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Davide Rondina
Orientador

Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira
Co-orientador

Prof. Dr. Airton Alencar Araújo
(Co-orientador)

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira
(Suplente)

“Para se ter uma vida calma, tem de se fazer um sacrifício. Tem de se privar de viver a vida. Quando se vive em segurança, não há medos a dominar, obstáculos a ultrapassar ou perigos gritantes à espreita por detrás da barreira dos nossos erros”.

(Richard Bach)

"Pouco conhecimento faz com que as criaturas se tornem orgulhosas. Muito conhecimento, que se tornem humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”.

(Leonardo Da Vinci)

De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...
(Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIA

*Dedico, com muita honra e amor,
à minha mãe, Iraci de Moraes de Julião, que sempre
acompanhou-me, acreditou, investiu e confiou
em meu potencial e que em todo momento me
fez acreditar que eu seria capaz de realizar
meus sonhos a partir do momento em que eu
colocasse amor e profissionalismo em tudo que
eu fosse fazer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido coragem e sabedoria para ir em busca da realização dos meus sonhos e Nossa Senhora da Conceição por sempre ter escutado minhas preces.

A minha família, minha mãe, Iraci de Moraes de Julião, meus irmãos, Iracélia Arruda Sales, Ivane Julião de Arruda e Luis Eduardo Julião de Arruda por todo o amor a mim concedido, pelo apoio emocional e incentivo.

Aos meus avós, Francisco Julião Filho e Beatriz Ferreira Arruda, e tios, em especial, Anita Julião, por me motivarem mesmo sem muitas vezes entender os meus objetivos.

Aos meus sobrinhos, Fábio Arruda Sales, Vitor Augusto Arruda Sales e Mariana Arruda Sales por todos os momentos de descontração que me proporcionam e me fazem querer voltar a ser criança.

Aos meus cunhados, Antônio Augusto e José Flávio Sales Castro por todos os momentos de descontração e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Davide Rondina por suas orientações, profissionalismo, dedicação e confiança depositados em minha pessoa;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, por todo apoio intelectual, estrutural e emocional a mim concedido, por todas as horas de desespero e descontração antes, durante e após a realização deste experimento.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Airton Alencar, por todos os ensinamentos indispensáveis para a realização deste experimento.

Ao Prof. Dr. Manoel Adrião, por ter me acolhido em seu laboratório como um membro de sua equipe, me concedendo total liberdade para execução do experimento e ainda, por ter me transmitido seu saber, ter me dado confiança e apoio nas horas difíceis.

A toda a equipe, da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA, por ter concedido os animais experimentais e instalações para execução do experimento. Em especial, Jefferson Viana, Fabiana Fortuna, Givaldo Sabino, Semíramis Nascimento, José Valter de Souza, Marcelo Santos, Robson Cunha, Maria José e José Gilvan de Souza pela amizade e apoio.

Aos membros da pós-graduação do Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes, LANUPRUMI, Magda Rodrigues, Aline Souza, Anderson Pinto, Erika Bezerra, Micheline Oliveira, Patricy, Isadora Machado e Elizabeth Saraiva. Em especial, dentre estes, aos amigos verdadeiros conquistados para toda a vida: Aline, Anderson, Erika, Magda e Isadora.

Aos membros da Iniciação científica do LANUPRUMI, Camila Pontes, Amanda Fernandes, Célio Rocha, José Neto, Paulo Rafael e Elizabeth Brito pelo apoio, amizade e por terem me dado a oportunidade de transmitir o pouco que aprendi.

Aos membros e funcionários do laboratório de Biotécnicas aplicada à Reprodução animal da UFRPE, Prof. Ricardo Chaves, Filipe Gondim Bezerra, Cristiano Aguiar Filho, Elielete Azevedo, Joana, Alcir e D. Sônia. Em especial, aos colaboradores incondicionais, Filipe e Cristiano.

Aos membros do Laboratório Fisiologia Animal Molecular Aplicada, Glenda Luna, Érica Paes, Clarissa, Edivaldo Rosas, Artur e Diogo pelas horas de descontração e pelo apoio nas horas difíceis. Em especial, Glenda, Erica e Clarissa pela amizade e carinho.

Aos coordenadores, todos os professores e funcionários do PPGCV, em especial, Prof^a Fátima Texeira, Prof^a Lúcia Daniel, Adriana, Cristina e Fred por todos os ensinamentos, disponibilidade e colaboração.

À minha família adotiva durante minha passagem em Recife, Dr. Félix, Dra. Elielete, Luíza, Letícia, Deborah, Priscila e Piter obrigada por terem me acolhido como um membro da família.

A Roberto Teófilo da Silva por ter me ensinado o valor de um amor verdadeiro.

A José Jackson Freitas da Silva pela amizade e apoio durante toda a minha vida profissional.

Aos amigos, Ney Rômulo de Oliveira Paula, Denille Uchôa, Fabianne Gomes, Rita de Cássia Gonçalves, Francisco de Castro Júnior, Vitor Madeira, Cláudia e Jorgiana, pela amizade, palavras de conforto e momentos de descontração mesmo quando se encontram longe.

Ao meu gatinho, Leopoldo pela companhia, por sempre me escutar e nunca recriminar meus atos e palavras.

A FUNCAP pelo apoio financeiro durante todo o meu mestrado acadêmico.

RESUMO

Em espécies domésticas, a relação entre proteínas e fatores de crescimento com a função espermática tem sido pouco esclarecida, especialmente, na espécie caprina. Por isso, em caprinos o IGF-I e IGF-II ainda não foram identificados ou correlacionados com a fertilidade e parâmetros seminais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar os parâmetros reprodutivos e identificar a expressão do IGF-II no espermatozóide de caprinos da raça Boer criados no Nordeste do Brasil. Os ejaculados foram colhidos de 6 caprinos machos com idade média de $3 \pm 1,1$ anos. Os animais foram examinados quanto à condição sanitária geral e reprodutiva, através de exames clínico e andrológico (CBRA, 1998) a cada 15 dias, além de tomada de peso. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume, aspecto, cor, motilidade, concentração, vigor e morfologia espermática. Cada amostra foi individualmente centrifugada a 15000 rpm por 15 minutos, para separação do plasma seminal e o pellet foi armazenado em tubos eppendorfs a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o início da extração. O processo de extração foi realizado utilizando-se o reagente Trizol seguindo as normas do fabricante. As amplificações por PCR foram conduzidas imediatamente após a construção do cDNA. O controle positivo utilizado foi o primer GAPDH e controles negativos consistiram da substituição de cDNA por água ultra-pura. Para determinar a presença do RNAm para IGF-II no espermatozóide caprino, amostras de sêmen foram colhidas e submetidas a RT-PCR. A sequência de primers foi baseada na sequência do gene do IGF-II bovino e as amplificações de RT-PCR revelaram um produto de 63,5 bp que está presente no espermatozóide caprino de cada indivíduo, no espermatozóide caprino capacitado e em amostras de sêmen submetidas ao pool. Os resultados encontrados permitem concluir que o IGF-II está presente no espermatozóide de caprinos da raça Boer criados no agreste da Paraíba no Nordeste do Brasil, e que, as análises de RNA no espermatozóide dessa espécie podem adicionar novos conhecimentos sobre a fertilidade do macho caprino.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Espermatogênese	14
2.2. Espermatozóide	15
2.2.1. Morfologia do espermatozóide	16
2.2.2. Exame do sêmen	18
2.3. Capacitação e fecundação	19
2.4. Produção espermática e ambiente	21
2.5. Metabolismo da espermatozóide	22
2.6. Hormônios e metabólitos envolvidos no metabolismo espermático	23
2.6.1. Insulina	24
2.6.2. IGF-II	25
2.6.3. Leptina	26
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVOS	32
5. CAPÍTULO 1	33
6. CAPÍTULO 2	43
7. CONCLUSÃO GERAL	51
8. PERSPECTIVAS	52
9. REFERÊNCIAS GERAIS	53
10. ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Análise de RT-PCR do gene do IGF-II no espermatozóide caprino. MA (marcador molecular de 50bp), C+ (controle positivo –GAPDH), S.I (amostras de sêmen por indivíduos), S.C. (espermatozóide capacitado), PO (pool de espermatozóides) e C- (controle negativo)	47
Fig. 2. Análise de RT-PCR do gene do IGF-II no espermatozóide caprino. Poços 1-8, amostras de cada indivíduos doador.	48
Fig. 3. Análise de RT-PCR do gene do IGF-II no pool de espermatozóides caprinos	48
Fig. 4. Animais experimentais (A, B e C).	64
Fig. 5. Colheita de sêmen (A) e Demonstração de libido (B).	65
Fig 6 Vagina artificial utilizada (A) e ejaculado colhido (B)	65
Fig 7 Extração de RNA (A), preparo do Mix para PCR (B), plotagem (C) e Termociclador (D).	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EMEPA	Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária
FSH	Hormônio folículo estimulante
FUNCAP	Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GH	Hormônio do crescimento
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	Proteínas ligadas ao fator de crescimento semelhante a insulina
LH	Hormônio luteinizante
Ob/ob	Knouckout
PIP-2	Fosfatidilinositol bifosfato
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNases	Ribonucleases
RT-PCR	Reverse transcriptase – Reação de polimerase em cadeia
ZP	Zona pelúcida

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Nordeste do Brasil vem consolidando a caprinocultura, caracterizando-se como um pólo produtor e gerador de tecnologias para o desenvolvimento sustentável da região. A participação do rebanho nacional de caprinos no nordeste é da ordem de 8.971.033 cabeças que corresponde a 93,75% do rebanho nacional (Anualpec, 2004).

Várias biotécnicas tem sido utilizadas para o melhoramento genético do rebanho caprino, no entanto, para a obtenção de melhores índices em programas reprodutivos, torna-se necessário aumentar o conhecimento da fisiologia reprodutiva

O IGF-II, IGF-I e a insulina promovem a diferenciação da espermatogônia a partir dos espermatócitos primários pela ligação ao receptor de IGF-I (Nakayama *et al.*, 1999). Sabendo-se ainda que a membrana plasmática e a acrossomal do espermatozóide apresentam sítios de ligação para insulina (Silvestroni *et al.*, 1992).

Em animais (Bestetti *et al.*, 1985) e humanos (Baccetti *et al.*, 2002) com deficiência de insulina foi encontrado problemas na função reprodutiva. Todavia, a existência e a contribuição da insulina e dos fatores de crescimento ligados a ela para melhorar a função reprodutiva do macho caprino ainda não é clara.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1: Espermatogênese

A espermatogênese pode ser dividida em três fases funcionais: (1) Proliferativa ou espermatogonial, na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões; (2) meiótica, em que os espermatócitos passam pela divisão meiótica na qual ocorre recombinação e segregação gênica e (3) de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides se transformam em células altamente diferenciadas e capacitadas para alcançar e fertilizar o oócrito (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994).

A espermatogênese pode ser dividida em fase espermatogonial ou proliferativa quando as células passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas, fase meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético dos espermatozóides é duplicado, recombinado e segregado; e fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as espermátides se transformam em espermatozóide que é uma célula altamente especializada. Assim, a espermatogênese pode ser dividida em fase espermatogonial ou proliferativa quando as células passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas, fase meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético dos espermatozóides é duplicado, recombinado e segregado; e fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as células diplóides, as espermátides, se transformam em espermatozóide que é uma célula altamente especializada (Setchell, 1993; Johnson et al., 2000; França & Chiarini-Garcia, 2005). O processo da espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos os quais contêm dois tipos de células somáticas: células mioídes responsáveis pela peristalse tubular, e células de sertoli responsável pela nutrição das células em desenvolvimento, provendo-as dos necessários requerimentos físicos, nutritivos e hormonais (Barth & Oko, 1989), além dos cinco tipos diferentes de células germinativas: espermatogônia, espermatócito primário, secundário, espermátide e espermatozóide (Setchell, 1993).

A duração do processo espermatogênico, iniciando na espermatogônia até a liberação do espermatozóide maduro na luz do túbulo (Ortavant et al., 1977), também é uma constante da espécie e leva cerca de 4,5 ciclos para se completar (França & Russell, 1998). No caprino, dados recentes (França et al., 1999a) mostraram que este tempo seria de 47,7 dias, o que é muito semelhante à duração observada no carneiro, cerca de 47 dias (França & Russell, 1998).

No entanto, vale ressaltar que os espermatozóides liberados na luz do túbulo seminífero ainda não são capazes de fecundar, somente adquirindo esta capacidade quando alcançam o epidídimo. As modificações funcionais que ocorrem durante o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo implicam na maturação de várias e diferentes organelas celulares. Por exemplo, o desenvolvimento da capacidade da motilidade progressiva espermática reflete processos de maturação associada com modificações qualitativas e quantitativas nos padrões metabólicos do aparelho flagelar. Embora, eles demonstrem rapidamente seu caráter móvel quando retirados examinados. O processo de maturação pelo qual os espermatozóides do epidídimo atingem a capacidade de modificações progressivas na flexibilidade e nos padrões de movimento de seus flagelos. Uma rápida progressão para frente aparece primeira no meio do corpo do epidídimo em poucos espermatozóides e torna-se um padrão de motilidade predominante nos espermatozóides da cauda e vasos deferentes (Cunningham, 2004; Hafez & Hafez, 2004).

2.2 Espermatozóide

Os espermatozóides são células haplóides e por isso muito diferenciadas, possuindo propriedades únicas entre as células do organismo suas reservas energéticas são limitadas, possui pouco citoplasma, não realiza síntese protéica, possui uma membrana plasmática bastante polarizada contendo várias proteínas, e um citoesqueleto inteiramente especializado para o deslocamento (Gatti & Dacheux, 1995).

Os espermatozóides são células altamente especializadas e dotadas de movimento. Estas células são responsáveis pelo transporte da porção do material genético proveniente do macho e ainda pela determinação do sexo, pois estes, após a redução da cromatina contém um cromossomo y ou um cromossomo x. Tais variedades, não podem ser diferenciadas morfológicamente, mas podem ser separadas quando técnicas de sedimentação, citometria de fluxo ou ainda, quando sondas de DNA são empregadas. A morfologia espermática por sua vez pode ser analisada através da observação sob microscópio de lâminas a fresco utilizando-se a microscopia de interferência ou contraste de fase (Hancock, 1959), ou coradas por diversos métodos como a eosina-nigrosina (Galloway, 1974).

Entretanto, observar somente a motilidade do gameta é insuficiente para avaliar a qualidade do sêmen, pois os espermatozóides de boa motilidade podem ser encontrados como não fecundantes (Eppleston & Maxwell, 1993; Lightfoot & Restal, 1971).

2.2.1. Morfologia do Espermatozóide

O espermatozóide é dividido em três regiões fundamentais: cabeça, acrossoma e cauda, que são facilmente estudadas através da utilização de técnicas de coloração. As formas e os tamanhos variam consideravelmente segundo a espécie. O espermatozóide de pequenos ruminantes tem forma de clava e mede aproximadamente 9µm de altura por 5µm de diâmetro em sua maior circunferência (Derivaux, 1980).

A cabeça contém o núcleo na parte posterior a zona equatorial, onde está contido o material hereditário (DNA). Perto do núcleo existe ainda uma zona proximal, que esta relacionada com a divisão celular. É observada ainda, uma estrutura denominada acrossômo que é originado do complexo de Golgi da espermátide (Guiton & Hall, 1996).

O acrossoma é uma dupla membrana que cobre o terço anterior da cabeça do espermatozóide. Esta estrutura contém diversas enzimas hidrolíticas, responsáveis pela reação acrossômica durante o processo de fertilização (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

A cauda é constituída por um filamento longo, o flagelo, que é dotado de mobilidade. A peça intermediária, região mais alargada da cauda, logo após a cabeça, contém um centríolo distal longo que dá origem ao flagelo. Este segmento é composto por nove pares de microtubúlos envolvendo 2 filamentos centrais. Ao redor encontram-se as mitocôndrias que produzem energia para o movimento do flagelo (Guiton & Hall, 1996).

A presença de alterações morfológicas nos espermatozóides pode ser indicativo do seu poder fecundante. Estas alterações podem atingir diversas estruturas como o acrossômo, cabeça, peça intermediária, cauda, podendo ainda atingir simultaneamente mais de uma parte da célula (Colas, 1980). Usualmente alterações morfológicas inferiores a 20% não é indicativo de fertilidade reduzida.

A integridade acrossômica é de grande importância nos eventos que precedem, e nos que ocorrem durante os processos de interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida dos oócitos. A normalidade desta estrutura é essencial para a fecundação, pois a reação

acrossômica e a determinação da capacidade do espermatozóide de realizá-la tem provado ser um parâmetro útil na avaliação de animais inférteis. Esta reação é caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando na formação de vesículas, permitindo ainda a liberação de enzimas do conteúdo acrossômico (Sá et al., 2002). Entre as alterações morfológicas mais encontradas no acrossômo enumera-se o enrugamento, contorno defeituoso ou podendo ainda esta destacado do espermatozóide.

Os espermatozóides caprinos podem apresentar diversas alterações morfológicas na cabeça. Entre elas podem ser encontradas formas: piriformes; estreitas; pequenas; grandes; estreitas na base; globuliformes; lanciformes; com contorno anormal ou ainda células que apresentem duas cabeças. Nem todas as alterações morfológicas são consideradas como da mesma importância. Cabeças piriformes e estreitas na base podem indicar uma má distribuição do material genético durante os processos de divisão celular. Espermatozóides com cabeças duplas e contornos irregulares também são caracterizados como de baixa qualidade. O aparecimento de um grande número de formas alteradas, geralmente está relacionado aos casos de degeneração e hipoplasia testicular. (Derivaux, 1980).

As alterações da peça intermediária são em sua maior parte devido a uma distribuição irregular de uma ou mais camadas de mitocôndrias. Esta organização irregular leva a peça intermediária a apresentar-se de forma espiralada. Outra alteração geralmente encontrada é caracterizada pela presença de uma gota proximal. Esta gota deve-se também a uma distribuição anormal de camadas de mitocôndrias que impedem a liberação da gota durante os processos de maturação celular (Blom, 1971).

Assim como a cabeça à cauda espermática pode apresentar diversas alterações morfológicas. Estas alterações estão relacionadas com uma disfunção epididimária. As caudas anormais podem se apresentar dobradas, enroladas na extremidade ou ainda apresentarem gotas citoplasmáticas nas porções distal ou proximal (Derivaux, 1980). Blom (1966) relata que o forte enrolamento encontrado nas caudas dos espermatozóides é devido ao rompimento de fibrilas.

Os espermatozóides com formações teratológicas, possuindo duas ou mais caudas também podem ser encontrados.

2.2.2 Exame do sêmen

A composição do sêmen é extremamente variável, não somente entre as espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie. Estas características podem ser avaliadas por diferentes métodos que se completam, tais como:

- O exame macroscópico onde são observados o volume, a viscosidade e o aspecto - que pode variar de marmóreo, leitoso, opaco e até aquoso (Zemjanis, 1970);
- As provas bioquímicas que são capazes de fornecer dados sobre o metabolismo espermático; provas de resistência frente às modificações de temperatura, diluição, pH e condutividade elétrica;
- Exame microscópico onde é avaliada a motilidade total (Blom, 1950), individual (Mies Filho, 1975) e a porcentagem de vivos e mortos através da utilização de corantes vitais como a eosina-nigrosina (Galloway, 1974). Na análise microscópica também é verificada a existência de células anormais.

No exame microscópico do sêmen são observados parâmetros como o movimento em massa e a vigor dos espermatozoides, a concentração seguida do estudo morfológico destas células. As técnicas empregadas neste exame são de fácil realização. O sêmen deve ser analisado o mais breve possível a uma temperatura próxima a corpórea a fim de evitar choques térmicos.

A motilidade massal pode ser analisada quando o sêmen é observado sob um pequeno aumento (100x). Utiliza-se uma pequena quantidade de sêmen sem diluição, onde são observados os movimentos ondulares provocados pelo deslocamento dos espermatozoides. O sêmen é classificado em graus que vão de um a cinco onde: 5 = deslocamento intenso com ondas espessas; 4 = ondas com rápidos movimentos; 3 = ondas aparentes com movimentos moderados; 2 = ondas em movimentos pouco perceptíveis; 1 = sem ondas (Blom 1950). Este exame apenas dá idéia da porcentagem de espermatozoides móveis sendo necessária à observação da mobilidade individual para um índice mais acurado.

A motilidade progressiva individual ou vigor do espermatozoide é dado em uma escala de zero a cinco, que representa a intensidade de deslocamento da célula no campo do microscópio. O número representa a totalidade dos espermatozoides em movimento progressivo retilíneo, com a nota de cinco a um, onde cinco - representa o deslocamento

máximo e um – quando a amostra está com todas as células imóveis. A nota zero é atribuída à ausência de espermatozóides (WALTON, 1933).

A avaliação da concentração espermática é necessária para julgar a qualidade do sêmen, e exprime o número de espermatozóides por milímetro cúbico. Este parâmetro pode ser definido utilizando-se técnicas como a contagem direta onde são utilizadas câmaras para contagem de células ou através da determinação da densidade óptica, onde a quantidade de luz absorvida ou transmitida pela amostra seminal, no comprimento de onda na faixa dos 550nm, é medida com o auxílio de um espectrofotômetro (Foote et al., 1978).

A avaliação dos elementos figurados do sêmen é igualmente importante para a determinação da qualidade deste. Para tanto devem ser montadas lâminas contendo esfregaços delgados de sêmen. Estas lâminas são então coradas com preparações apropriadas como eosina-nigrosina (Galloway, 1974). Os esfregaços devem ser realizados utilizando-se uma quantidade mínima de sêmen, que é depositado sobre uma extremidade da lâmina, sendo em seguida espalhado por toda sua extensão utilizando-se uma outra lâmina com uma inclinação de 45°).

Lâminas úmidas podem ser utilizadas para avaliar a morfologia seminal através da microscopia de contraste de fase (Hancock, 1959). Nesta técnica, após homogeneização, uma gota da solução de formol-salina/sêmen é colocada entre lâmina e lamínula (preparação úmida), sendo observados 200 espermatozóides com um aumento de 400 a 600 vezes.

2.3: Capacitação e fecundação:

Durante o percurso no trato reprodutivo feminino, as células espermáticas sofrem um serie de complexas transformações que envolvem mudanças iônicas, metabólicas e na membrana que são coletivamente chamadas de capacitação. Este processo depende da temperatura e influencia na ligação do espermatozóide a zona pelúcida que fica ao redor do oócito e induzido a reação acrossômica. A reação acrossômica é um evento excitótico pela ação de enzimas proteolíticas (acrosina e hialuronidase) que são liberadas para que o espermatozóide possa penetrar na zona pelúcida e se fusione ao oócito. A capacitação espermática ocorre no trato genital feminino, mas pode também ocorre in vitro, no entanto,

esse mecanismo complexo têm sido pouco estudado. Dentre os eventos iniciais da capacitação podemos citar influxo de cálcio, mudança de pH, um aumento intracelular de AMPc e liberação em níveis controlados de O₂ (Flaherty et al., 2006).

Os componentes da superfície espermática podem ser modificados ou removidos pelas secreções do trato genital, provocando a desestabilização da bicamada fosfolipídica, permitindo a ativação acrossômica. Tais modificações podem incluir depleção do colesterol espermático da superfície, alterações nas glicosaminoglicanas e modificações iônicas à medida que os espermatozóides atravessam o trato genital. A capacitação acarreta modificações no acrossomo necessárias para a penetração do espermatozóide no óvulo. Por este motivo, as funções da capacitação previnem a ativação prematura da acrossomo até que o espermatozóide atinja o local da fertilização entrando em contato com o óvulo. A verdadeira reação do acrossomo envolve a fusão da membrana plasmática espermática com a membrana externa do acrossoma seguida por uma extensa vesiculação sobre o segmento anterior do acrossomo. Isto difere da falsa reação do acrossoma que ocorre durante a senescência ou degeneração dos espermatozóides.(Cunningham, 2004; Hafez & Hafez, 2004; Flaherty et al., 2006; Elder & Dale, 2000).

A ligação do espermatozóide ao oócito é mediada por receptores espermáticos espécie-específicos presentes na zona pelúcida. As glicoproteínas constituintes da zona pelúcida são denominadas ZP 1 , ZP 2 e ZP 3 que apresentam importantes funções na fecundação. A ZP 1 tem, basicamente, papel estrutural, enquanto tem sido atribuída a função receptor secundário à ZP 2 e receptor primário à ZP 3, sendo que a ZP 3 tem sido responsabilizada pela reação do acrossomo. O espermatozóide penetra na zona pelúcida pelas ações enzimáticas e mecânicas. A reação do acrossomo permite a liberação de enzimas que digerem a matriz da zona pelúcida e expõem o *perforatorium* para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida auxiliada pela sua motilidade. A fusão do oócito com o espermatozóide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o segmento equatorial do espermatozóide e a membrana plasmática do oócito. A membrana vitelina participa ativamente nesse processo e, dessa forma, o espermatozóide é incorporado pelo ooplasma. O oócito ativado pelo espermatozóide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP 2), aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais,

aumento do pH intracelular e da síntese protéica (Cunningham, 2004; Hafez & Hafez, 2004;)

2.4: Produção espermática e ambiente:

Segundo Chemineau *et al.* (1991), em animais criados em latitudes acima de 35 C N ou 35 C S, atividade espermatogênica não para, mas o número de espermatozóides produzidos pelos testículos diminui em certas estações do ano. No bode, nenhuma variação estacional sobre a porcentagem de espermatozóides anormais foi observada. Entretanto, observaram-se variações na motilidade espermática associada com uma grande diminuição da capacidade fecundante. Em rebanhos de reprodução estacional, o volume do ejaculado é o máximo na estação sexual e diminui durante a primavera / verão, alcançando o mínimo na estação não-sexual. Tais fatores refletem as variações estacionais na produção e liberação do plasma seminal pelas glândulas acessórias as quais estão ativadas quando os níveis de testosterona estão altos na estação sexual e quiescentes quando os níveis de testosterona estão baixos durante a estação não-sexual. Essas variações estão também associadas com a diminuição do comportamento sexual durante a primavera. Por outro lado, bodes de rebanhos tropicais e subtropicais, quando alimentados adequadamente, não apresentam variações estacionais quanto à espermatogênese ou ao comportamento sexual. Em certos casos, entretanto, a situação pode ser complicada pelo fato de que, em países tropicais e subtropicais, as altas temperaturas de verão induzem ao aparecimento de espermatozóides mortos e /ou anormais. Em rebanhos originários de áreas com latitudes acima de 35 N ou 35 S, o principal fator que controla a estacionalidade reprodutiva de pequenos ruminantes é o fotoperíodo. A atividade gonadal e o comportamento sexual variam de acordo com a duração das horas de luz. Outros fatores ambientais, como a temperatura, regime alimentar ou fatores sociais atuam como moduladores da atividade reprodutiva. Em latitudes tropical e subtropical, rebanhos locais de caprinos parecem ser menos sensíveis à redução das horas de luz existentes nessas zonas, enquanto que outros fatores possuem uma influência maior (Chemineau *et al.*, 1991).

Vários estudos indicam que altas temperaturas afetam a qualidade seminal com diminuição da motilidade espermática e da porcentagem de espermatozóides móveis, e um

incremento na porcentagem de alterações morfológicas espermáticas. O efeito deletério das altas temperaturas na produção espermática ocorre principalmente como resultado de um aumento na temperatura testicular que provoca degenerações específicas com o surgimento de alterações espermáticas em momentos críticos e precisos do ciclo espermato gênico. A temperatura ambiental acima da qual os espermatozoides caprinos são afetados situa-se ao redor de 29 – 30 °C. Mas a sensibilidade dos bodes à temperatura ambiental varia de acordo com a raça e o local de criação. Existe uma variabilidade intra-raacial quanto ao estresse térmico, sugerindo uma possível origem genética (Chemineau *et al.*, 1991).

2.5: Metabolismo do espermatozóide:

O caráter móvel dos espermatozoides propicia um método bastante fácil de avaliar o seu estado fisiológico. A motilidade, porém, por si própria não é um método seguro de prever a sua capacidade fertilizante potencial. A energia requerida para a motilidade deriva aparentemente de depósitos intracelulares de adenosina trifosfato (ATP). O uso do ATP parece ser regulado pelo nível endógeno de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc não apenas regula a degradação do ATP, mas tem também um efeito direto sobre a motilidade espermática. Este efeito complexo do AMPc sobre a motilidade espermática foi demonstrado *in vitro* pela adição aos espermatozoides de dibutilil AMPc ou inibidores como as metilxantinas que bloqueia a degradação intracelular normal do AMPc (Hafez & Hafez, 2004)

Os espermatozoides utilizam-se de uma variedade de substratos na presença de oxigênio. A atividade respiratória propicia o meio de utilizar o lactato ou o piruvato resultante da frutólise de açúcares para fornecer dióxido de carbono e água. Esta via oxidativa, localizada nas mitocôndrias, é consideravelmente mais eficiente na produção de energia do que frutólise. Usando estes processos catabólicos, os espermatozoides convertem a maior parte de energia em ATP. Embora muito do ATP seja utilizado no processo de consumo de energia para a motilidade, algum é usado para manter a integridade dos processos de transporte ativo das membranas espermáticas. Estes processos de transporte ativos das membranas espermáticas. Estes processos e transportes ativos impedem a perda de componentes iônicos vitais das células espermáticas. Na ausência de

substrato exógeno, os espermatozóides utilizam seus depósitos intracelulares de plasmalogeno para fornecer energia por um curto período de tempo (Hafez & Hafez, 2004)

2.6: Hormônios e metabólitos envolvidos no metabolismo espermático:

O sistema reprodutivo de mamíferos machos é regulado por complexos mecanismos de feedback envolvendo o hipotálamo, a hipófise anterior e os testículos. O hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio decapeptídeo liberador de gonadotrofina (GnRH). Secretado de forma pulsátil, o GnRH atua diretamente nas células gonadotróficas da hipófise anterior. Sob estímulo do GnRH, esse gonadotrofos sintetizam e secretam gonadotrofinas: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o Hormônios luteinizante (LH). Ambos são glicoproteínas heterodímeras constituídas por dois polipeptídios ligados de modo não covalente. A subunidade protéica α é comum tanto para o FSH quanto para o LH, enquanto a subunidade protéica β é específica para cada um. Gonadotrofos individuais tem a capacidade de sintetizar e secretar FSH, LH ou ambos. A liberação de FSH e LH é dependente do padrão pulsátil da secreção de GnRH. Os pulsos de GnRH irregulares e de baixa amplitude resultam em liberação de LH (Cunningham, 2004).

A estereodoigênese e espermatogênese, componentes da função reprodutiva do macho são controladas por fatores regulatórios endócrinos e locais. O controle endócrino é essencial para a função reprodutiva do macho, já que machos inférteis ou que perdem a fertilidade demonstram anormalidades endócrinas, mas esses parâmetros endócrinos isolados nem sempre explicam anormalidades na produção espermática ou infertilidade (Macpherson *et al.*, 2002).

Pesquisas recentes têm demonstrado que os fatores de crescimento biologicamente ativos regulam alguns processos reprodutivos e estão presentes no plasma seminal. Os fatores de crescimento, que são polipeptídios, obtêm respostas celulares pela ligação a receptores na superfície de células específicas em tecidos-alvo. Estes fatores de crescimento regulam a proliferação de muitos tipos celulares, influenciando assim o crescimento do trato reprodutivo. O crescimento celular e a diferenciação são regulados por interações fisiológicas entre hormônios (FSH / LH, estrógenos, progestinas) e por fatores bioativos de crescimento (Macpherson *et al.*, 2002).

Sabe-se que os hormônios do plasma seminal, as citocinas e os fatores de crescimento afetam a motilidade espermática e fertilização (Aitken, 1994). Em humanos (Glander *et al.*, 1996) e bovinos (Henricks *et al.*,1998), o IGF-I tem sido mensurado e correlacionado com a qualidade do sêmen. O IGF-I tem sido associado com o início da puberdade, fertilização e desenvolvimento embrionário (Spiteri-Grech & Nieschlang, 1992). Estudos em camundongos Knockout indicam que a leptina também está envolvida na regulação desses eventos fisiológicos (Kiess *et al.*,1998).

A ação do hormônio do crescimento (GH) é mediada em parte pela produção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e ambos hormônios tem apresentado uma função sobre o trato reprodutivo masculino (Breier *et al.*,1996). Uma concentração aumentada de IGF-I foi encontrada em humanos (Copeland *et al.*,1980; Ovesen *et al.*, 1996)e camundongos (Breier *et al.*,1996). , tanto no plasma sanguíneo quanto no plasma seminal, após administração de GH. Sabe-se ainda que a motilidade do espermatozóide humano aumenta significativamente quando pacientes azospérmicos e oligospérmicos são tratados com GH (Ovesen *et al.*, 1996).

2.6.1 Insulina

A insulina é importante para promover e regular o crescimento, diferenciação e metabolismo. Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão gênica da insulina extrapancreática é detectada no saco vitelínico e cérebro de roedores. Em mamíferos adultos, a insulina é produzida somente nas células β do pâncreas. Além disso, a insulina apresenta um papel principal na regulação da função gonadal. Entretanto, o papel da insulina na fertilidade do macho não é completamente elucidado. Sendo registrado que IGF-II, IGF-I e insulina promovem a diferenciação da espermatogônia a partir das espermatócitos primários pela ligação ao receptor de IGF-I. Sabe-se ainda que ambas membranas plasmáticas e acrossomal do espermatozóide apresentam sítios de ligação para insulina. Em homens com diabetes insulina-dependentes, os espermatozóides apresentam defeitos estruturais, motilidade significativamente mais baixa e pouca habilidade para penetra oócitos (Aquila *et al.*, 2005b).

Em células β do pâncreas mudanças na liberação de insulina são acompanhadas por mudanças no metabolismo da glicose. Alguma mudança na liberação de insulina tem sido relacionada a diferentes condições fisiológicas, semelhantes ao espermatozóide de acordo com o estado capacitado e não capacitado. Similarmente, sob condições basais bem com estimulados, as secreções de insulina pelas células do pâncreas adquirem uma forma pulsátil e o padrão oscilatório melhora, o controle da liberação e aumenta a ação hormonal. A glicose é o principal mediador da insulina nas células β do pâncreas e acredita-se que a secreção de insulina pelo espermatozóide é também responsiva a glicose (Aquila *et al.*, 2005b).

Além disso, novos resultados indicam que a insulina exerce um efeito fisiológico estimulatório autócrino sobre a glicose induzindo a liberação de insulina. Especificamente, o bloqueio da liberação de insulina, ou bloqueio da atividade mensageiro de insulina intracelular provoca um decréscimo significativo na secreção de insulina ($\cong 50\%$) em capacitados e não-capacitados. Esses dados sugerem uma regulação autócrina da insulina sobre sua própria secreção no espermatozóide, que esta de acordo com o que ocorre nas células β do pâncreas, nas quais a insulina secretada tem um efeito positivo sobre a exocitose de insulina (Borelli *et al.*, 2004).

Nas ilhotas pancreáticas, a liberação requer metabolismo das hexoses mediado pela glicoquinase, que também tem sido identificada nos espermatozóides (Travis *et al.*, 1998). A secreção de insulina é provocada pelo ATP gerado na rota do metabolismo da glicose que despolariza as membranas das células β e aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico (De Fronzo, 1997). Vale salientar, que esses eventos também são importantes no início da capacitação (Visconti *et al.*, 1998), porém somente quando o efluxo de insulina foi detectado.

2.6.2. IGF-II

No trato reprodutivo masculino, o IGF-I tem sido encontrado no testículo (Hess *et al.*, 2001; Handelsman *et al.*, 1985; Zhou & Bondy, 1993), onde é secretado pelas células de Leydig e Sertoli (Handelsman *et al.*, 1985; Vanelli *et al.*, 1988; Roser, 2001). Receptores para IGF-I foram identificados nas células de sertoli (Borland *et al.*, 1984), leydig (Smith *et*

al., 1987), espermátocitos secundários, espermátides (Borland *et al.*, 1984) e espermatozóides (Henricks *et al.*, 1998). Entretanto, o IGF-I está inicialmente envolvido na espermatogênese (Tsutura & O'Brien, 1995) e esteroidogênese (Saez, 1994). O papel das proteínas IGF-I como reguladores da função reprodutiva tem sido pesquisado. IGF-I, IGF-II, IGFBP-I, IGFBP-2, IGFBP-4 e fragmentos de IGFBP-3 bem como a atividade protéica foram identificadas no plasma seminal humano (Plymate *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1997). A concentração de IGF-I no plasma seminal humano foi correlacionada ($r = 0,748 / p = 0,00001$) com a concentração espermática e morfologia em um estudo (Glander *et al.*, 1996). A relação entre proteínas IGF e a função espermática em espécies domésticas tem sido pouco esclarecida. Henricks e colaboradores (1998) identificaram IGF-I no plasma seminal de touros e receptores de IGF-I nas células espermáticas bovinas, além disso, o receptor de IGF-I foi encontrado no espermatozóide humano (Naz & Padman, 1999).

O tratamento do espermatozóide bovino *in vitro* com IGF-I resultou no aumento da motilidade espermática progressiva e total quando comparada com espermatozóides não tratados. Entretanto, em caprinos, o IGF-I e IGF-II ainda não foi correlacionado com a fertilidade, puberdade ou parâmetros seminais.

2.6.3 Leptina

A hipótese que a leptina pode exercer um importante papel na base da reprodução surgiu a partir de estudos realizados em camundongos Ob/Ob (Knockout), sem o gene da leptina, nos quais observou-se infertilidade e órgãos reprodutivos atrofiados. A secreção de gonadotrofinas é muito sensível ao feedback negativo pelos esteróides gonadais, como em animais pré-puberes, tem sido, atualmente, visto que o tratamento com leptina pode recuperar o sistema reprodutor em camundongos Ob/Ob por promover o desenvolvimento e função dos órgãos reprodutivos e fertilidade pela secreção de gonadotrofinas (Hileman *et al.*, 2002). Entretanto, a contribuição da leptina para melhorar a função reprodutiva do macho é pendente.

A leptina, em essência, é uma citocina secretada pelos adipócitos que exerce um importante papel sobre o controle da reprodução pela ação sobre o hipotálamo e pituitária

(Barb & Kraeling, 2004). E que também pode agir nas gônadas porque seus receptores tem sido encontrados também nestas células.

Observações recentes sugerem que a leptina exerce um importante papel no estabelecimento do efeito do estado energético sobre a reprodução; no entanto, os mecanismos moleculares que envolvem os efeitos da leptina neste contexto ainda permanecem não elucidados (Barash *et al.*, 1996). Várias evidências apontam para o papel direto da leptina no controle da função testicular (Tena-Sempere & Barreiro, 2002). Entretanto, ao contrário tem sido bem provado os efeitos na fertilidade da fêmea, o atual papel do hormônio na regulação controlando a função reprodutiva do macho tem sido alvo de debate.

O camundongo Ob/Ob (sem leptina funcional) ou Ob-R / Ob-R (sem receptores para leptina funcional) são inférteis e falham na maturação sexual normal. A fertilidade de camundongos Ob/Ob é cessada pela leptina e não pela simples redução do peso corporal, indicando um efeito do hormônio sobre a função reprodutiva (Hileman *et al.*, 2002). Particularmente, o camundongo macho Ob/Ob apresentou testículos pequenos, azoospermia e espermátides multinucleadas. Em estudos experimentais em humanos, a ausência de leptina endógena é associada com hipogonadismo e ausência de desenvolvimento puberal (Wauters *et al.*, 2000).

A leptina é expressa nos túbulos seminíferos e no plasma seminal (Glander *et al.*, 2002), porém a origem celular desta secreção não é exatamente definida. Muitos estudos relatam o papel da leptina plasmática na regulação da função gonadal no homem (Steinman *et al.*, 2001), indiretamente via sistema neuroendócrino central e diretamente via receptores de membrana de tecidos periféricos (Tena-Sempere *et al.*, 1999). Além disso, evidências indicam que a regulação funcional de leptina do eixo gonadal masculino parece ter uma ação rigorosamente regulada, realizada a diferentes níveis do sistema hipotalâmico-pituitário testicular, envolvendo não somente efeitos estimulatórios como também inibitórios. Recentemente (Caprio, 2001), sugeriu-se que o efeito da leptina sobre a função reprodutiva do macho pode depender dos níveis circulantes da molécula. Entretanto, os efeitos estimulatórios predominantes, primariamente até o hipotálamo, são observados.

A leptina desempenha diferentes papéis em diferentes tipos de células, mas o principal papel é o lipostático, sinalizando a outros sistemas as reservas energéticas viáveis

para o corpo, estimulando sua utilização, e conseqüentemente gasto energético. Recentemente, uma nova função para a leptina no trato genital masculino foi evidenciada pela presença de receptores para leptina no espermatozóide humano (Glander *et al.*, 2002). Além disso, também tem sido relatado que os espermatozoides capacitados exibem um aumento na taxa metabólica e gasto de energia total, presume-se afetar as mudanças na sinalização e função espermática durante a capacitação (Visconti *et al.*, 1998). Entretanto, a relação entre os eventos que sinalizam a capacitação e as mudanças no metabolismo energético do espermatozóide não é bem conhecida. Existindo uma escassez de informações a respeito do espermatozóide mamífero e seu estado energético. Em células somáticas, ambas leptina e insulina exercem um papel principal na regulação da homeostase energética. Particularmente, evidências *in vivo* e *in vitro* sugerem que a leptina pode mimetizar a ação da insulina sobre a síntese de glicogênio. O metabolismo de glicogênio do espermatozóide parece ser regulado pela modulação da glicogênio-sintetase de um modo similar ao observado em outros tecidos (Ballester *et al.*, 2000).

O espermatozóide ejaculado requer uma maturação extratesticular, a capacitação (Visconti *et al.*, 1998),^{8ª}

al., 2001). Além disso, os níveis de leptina no plasma seminal foram significativamente baixos em pacientes com parâmetros espermáticos normais, comparados com amostras de sêmen patológicas e apresentou uma correlação negativa com a motilidade espermática, em humanos (Glander *et al.*, 2002).

Admiti-se que a capacitação espermática aumenta o metabolismo, presumindo-se que afeta as mudanças nas sinalização e função espermática durante a capacitação (Travis *et al.*, 2003). A relação entre os eventos de sinalização associados com a capacitação e mudanças no metabolismo energético do espermatozóide são pouco conhecidas.

A leptina em espermatozóides capacitados está envolvida no acúmulo de substratos energéticos, que podem ser gastos durante a capacitação. Durante a penetração na zona pelúcida e fusão do oócito com o espermatozóide, a glicose é requerida pelo espermatozóide para garantir a fosforilação da tirosina que ocorre durante a capacitação (Williams & Ford., 2001). A glicose é fornecida ao espermatozóide pelo trato reprodutivo das fêmeas *in vivo* ou pelo meio de cultivo *in vitro*, além disso, muitos estudos indicam que reservas de glicogênio são oriundas da glicose endógena do espermatozóide para suportar condições de hipoglicemia (Albarracin *et al.*, 2004).

A secreção de leptina no espermatozóide sugere que este tem a habilidade de modular seu metabolismo, independente da leptina sistêmica. Portanto, o espermatozóide parece possuir um mecanismo de proteção para garantir o acúmulo de substrato energético visando manter a capacidade fecundante do gameta.

3. JUSTIFICATIVA

Conforme pode ser constatado na revisão de literatura, o uso de biotécnicas implica no conhecimento específico de diferentes etapas da fisiologia reprodutiva destes animais. Dentro deste contexto, torna-se necessário o melhor entendimento do metabolismo espermático caprino e demais fatores que encontram-se diretamente envolvidos nas etapas que vão desde a espermatogênese até a capacitação espermática na espécie caprina.

Recentemente, trabalhos com diferentes espécies têm demonstrado a presença de leptina e IGF-I, no plasma seminal, ligadas à fertilidade.

Portanto, o espermatozóide parece ser um local ativo da expressão de proteínas e fatores de crescimento que podem representar um mecanismo de proteção na reprodução do macho para garantir o acúmulo de substratos energéticos e manter a capacidade fertilizante do gameta masculino (Aquila *et al.*, 2005).

Em espécies domésticas, a relação entre proteínas e fatores de crescimento com a função espermática tem sido pouco esclarecida, especialmente, na espécie caprina. Entretanto, em caprinos o IGF-I e IGF-II ainda não foi identificado ou correlacionado com a fertilidade e parâmetros seminais.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar os parâmetros reprodutivos e identificar a expressão do IGF-II no espermatozóide de caprinos da raça Boer criados no Nordeste do Brasil.

Objetivos Específicos

- Analisar os parâmetros seminais (volume, aspecto, cor, motilidade, concentração espermática, vigor e morfologia) e performance reprodutiva de machos caprinos da raça Boer submetidos a sucessivas colheitas e após mudança de estímulo da fêmea;
- Verificar a presença de IGF-II no espermatozóide de caprino individualmente, capacitado e em pool de amostras;

5. CAPÍTULO 1

PARÂMETROS SEMINAIS E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE CAPRINOS MACHOS DA RAÇA BOER CRIADOS NO NORDESTE DO BRASIL APÓS MUDANÇA NO ESTÍMULO DA FÊMEA

*(Semen parameters and reproductive performance of Boer goat bucks raised in
Northeast of Brasil after changing female stimulus)*

South African Journal of Animal Science

(submetido em 20/ 06/2007)

(aceito em)

**PARÂMETROS SEMINAIS E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE CAPRINOS
MACHOS DA RAÇA BOER CRIADOS NO NORDESTE DO BRASIL APÓS
MUDANÇA NO ESTÍMULO DA FÊMEA**

Arruda I.J.¹, Bezerra, F.Q.G.², Aguiar-filho, C.R.², Oliveira, M.A.L.², Rondina, D.^{#1}

¹Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes, UECE/FAVET

²Laboratório de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária, UFRPE

Resumo

O objetivo deste experimento foi analisar os parâmetros seminais e desempenho reprodutivo de machos caprinos da raça Boer criados no agreste da Paraíba submetidos a sucessivas colheitas e após mudança de estímulo da fêmea. Foram utilizados seis machos adultos da raça Boer que foram submetidos a colheita de sêmen com auxílio da vagina artificial, produzindo um total de 10 colheitas de sêmen para cada bode, em duas sessões. Na primeira sessão os animais foram expostos a uma fêmea com idade de 2 anos apresentando estro natural e posteriormente na segunda sessão a uma fêmea com estro induzido com cipionato de estradiol na dose única de 1 mL por via intra-muscular dois dias antes da colheita de sêmen. Foram registrados, tempo de reação, qualidade da libido e parâmetros seminais. As características seminais foram influenciadas pela mudança de estímulo da fêmea. Os resultados do presente trabalho evidenciaram que a raça Boer nas condições do Nordeste Brasileiro mantêm um desempenho reprodutivo dentro os padrões de raça e de forma geral comparáveis ao de outras raças caprinas. Entretanto, houve uma significativa diminuição na qualidade espermática e no comportamento sexual quando estes foram submetidos à colheita utilizando uma fêmea com estro induzido hormonalmente, mostrando nestes animais uma sensibilidade a mudança do estímulo feminino.

Palavras-chave: Sêmen; desempenho reprodutivo; Boer; Brasil; Nordeste;

Semen parameters and reproductive performance of Boer goat bucks raised in Northeast of Brazil after changing female stimulus

Arruda I.J.¹, Bezerra, F.Q.G.², Aguiar-filho, C.R.², Oliveira, M.A.L.², Rondina, D.^{#1}

¹Laboratory of Nutrition and Production of Ruminants (*Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes*), UECE/FAVET

²Reproduction Laboratory – College of Veterinary Medicine (*Laboratório de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária*), UFRPE

The objective of this experiment was to analyze the seminal parameters and reproductive performance of Boer goat bucks raised in the interior of the Northeast of Brazil submitted to successive semen collections and after changing female stimulus. Six adult male Boer goats were used in the experiment. During a two-month period, each goat participated in two 15-day semen collection sessions by means of the artificial vagina method, producing a total of 10 semen collections for each goat. In the first session, the animals were exposed first to female in natural estrus and subsequently, in the second session, to a female in estrus induced. The reaction time was recorded, as well as the quality of the libido. Each ejaculate was analyzed macroscopic and microscopic. The seminal characteristics were influenced by the female stimulus change. The sperm concentration was positively correlated to the volume, motility and percentage of live sperm when the female with natural estrus was utilized. The results of the present work have shown that Boer goats—under the climatic conditions of the Northeast of Brazil—maintain a reproductive performance within the breed standards and generally comparable to those of other caprine breeds. However, there was a significant reduction in sperm quality and sexual behavior when the Boer bucks were submitted to semen collection utilizing a female with hormonally induced estrus.

Keywords: Semen; reproductive performance; Boer; Brazil; Northeast;

#Corresponding author. E-mail address: davide@uece.br

Introduction

In the Northeast region of Brazil, goat-raising is no longer just a subsistence activity; importation of specialized breeds has intensified in recent years aimed at increasing productivity (Santos et al., 2005). One of the most outstanding among such breeds is the Boer goat, which is considered easily adaptable and highly resistant to different climatic conditions, varying from Mediterranean climates to semi-desert climates. The Boer breed has been steadily rising in number in the Northeast of Brazil due to the absence of any other superior breed of meat goat in Brazil. However, there are still very few scientific studies on the adaptation and utilization of this breed in reproduction programs.

The vast majority of breeding systems of the Northeast use the studs/sires natural mating programs, nearly always at pasture. Semen analysis is the most widely-used method for estimating the fertility potential of a buck. The results of these tests serve in important decision-making regarding artificial insemination and natural mating, as well as in vitro fertilization or cryopreservation of the semen itself. (Borque & Sagües, 1993).

Semen production is influenced by the species, breed, age, season of year, and nutritional state of the livestock (Bravo et al., 1997) and also by the frequency of mating (Tjebk, 1994).

The objective of this experiment was to analyze the seminal parameters and reproductive performance of Boer goat bucks raised in the interior of the Northeast of Brazil submitted to successive semen collection.

The bucks were examined regarding their general sanitary condition and genital system, and andrological exams were performed according to the norms of the Brazilian Animal Reproduction Board (CBRA, 1998) with weigh-ins every 15 days during the experiment. Prior to the semen collection, the prepuce (foreskin) of the male was washed with saline solution and then dried, in order to remove impurities (feces, dust, urine, etc.) that may be harmful to the semen. The ejaculates were collected by means of the artificial vagina method; the bucks had already been properly trained to use an artificial vagina.

Semen and Reproductive Performance Evaluation

The time elapsed from the moment the buck was introduced in the collection area to the moment of ejaculation (reaction time) was recorded, as well as the quality of the libido (Prado, 2003). Each ejaculate was analyzed after collection. Macroscopic analysis was performed immediately after collection, in which ejaculate was evaluated regarding its visual aspect (marbled, milky, opaque, and even watery), color (white, yellow and citrine yellow) and volume (0.3 to 2.0 mL) according to Betini et al., 1998. In the laboratory, whirling and vigor were also analyzed (Betini et al., 1998). Sperm concentration was evaluated utilizing a hemocytometer (Sorensen, 1982) and sperm pathologies were classified into major defects: in the acrosome and mid-piece, proximal protoplasmic droplets, strongly bent or curled tail; and minor defects: detached acrosome, distal cytoplasmic droplet, bent or curled tail and normal isolated head, being viewed following eosin-nigrosin staining according to Galloway, (1974). All evaluations during the experimental period were performed by the same person.

Statistical Analysis

All data were analyzed using SAS (SAS, Inc., Cary, NC, USA). The effect of female stimulus (natural estrus or induced estrus) for body weight, scrotal circumference, volume of testicle, semen volume and sperm concentration was analyzed by the GLM procedure and comparisons were performed by the paired *t* test. For the other parameters, the NPAR1WAY

procedure was used and the differences were analyzed by the Wilcoxon signed rank test. Correlation testing was assessed using the Spearman test. Values were expressed as mean \pm SEM.

Results

The values of the variables: body weight, scrotal circumference and volume of testicle obtained in the two treatments are presented in Table 1. No significant differences were observed

The scrotal circumference is probably the single best indicator of the buck's ability to produce sperm. Regardless of the male's breed, a larger scrotal circumference can reflect a higher number of Leydig cells and higher production of testosterone, causing greater development of the accessory sex glands, as well as an increase in the production of seminal plasma and volume of ejaculate (Delgadillo et al., 1992). In Corriedale sheep, there is a positive correlation between scrotal circumference and sperm motility (Ferreira et al., 1988). In Holstein bulls, Coulter & Foote (1976) found a high correlation between scrotal circumference and sperm output. According to Neely et al. (1982), selection of bulls aimed at increasing scrotal size will imply an increase in the total number of spermatozoa.

It is worthy of mention that in this experiment, no variations were observed in the scrotal circumference in the collection conditions established. However, the scrotal perimeter found in this study was higher than the average of the

of matings carried out by bucks of the Moxotó breed in relation to bucks of the Brown Alpine breed. Santos et al. (2003) verified influences of breed on the libido of exotic goats naturalized to semi-arid climates.

The reaction time found in this study is according to what was observed by Roca et al. (1991), with reaction times from 106 to 129 seconds. In adult animals, a higher intensity in the pre-mating manifestations was verified—probably due to the sexual experience—causing a longer reaction time that permitted the adult bucks to test the reception of the female in estrus before proceeding to mate.

According to Almquist, 1973, the longer the reaction time in Saanen goat bucks, the greater the stimulation of the accessory Sex glands and, consequently, the higher the volume of ejaculate. However, in this experiment, when the bucks were presented to the doe in natural estrus, the reaction time tended to be shorter and the volume of ejaculate was higher, while the opposite can be observed when the same animals were submitted to collection with the induced-estrus female.

The volume and number of spermatozoa per ejaculate decrease significantly in a semen collection program on sheep (Amir et al., 1986), due to the continuity of the stimulus and available fluid, although sheep can ejaculate many times daily for several weeks before spermatozoa reserves in the epididymus become severely depleted.

When the semen was collected from six sexually mature bucks five times daily, every five successive days in the mating season, a marked decline was observed in the semen volume, sperm concentration, and number of live sperm (Ritar et al., 1992). However, in this study, the males were utilized on alternating collection days, and no sexual or physical depletion was observed, therefore the variations found in the seminal parameters is due to the change of stimulus of the female.

The lower motility of the sperm collected from the male when the induced-estrus doe was utilized is most likely due to the higher percentage of sperm pathologies, mainly bent tail with

droplet and strongly bent or curled tail, which represented approximately 75% of the sperm pathologies for the adult male goats, thus influencing their sperm motility.

It is also noteworthy that although the seminal variables do not directly influence fertility after AI, such variables are decisive for determining if the ejaculate is rejected (Aboagla and Terada, 2003). Also, even after changing the stimulus, the values are within the normal range in terms of seminal quality for utilization of goat males, being in harmony with the values established by the CBRA (1998).

Evaluation of sperm pathologies is an important parameter for assessing the quality of the male's semen, since a high correlation was found between this evaluation and overall fertility (Colas, 1983; Chemineau et al. 1991). The values of sperm pathologies are in harmony to those established by the CBRA (1998), in that the percentage of sperm pathologies for male goats should not exceed 15%.

It should be pointed out that the increase of sperm pathologies, besides negatively interfering in the quality of the ejaculate, can affect the fertilizing ability of the sperm or seriously jeopardize embryonic survival and thus contribute to a significant reduction of fertility at parturition, as shown by Mieusset et al. (1992) in ovine species.

However, the change of stimulus of the teaser significantly increased the presence of sperm defects in Boer goat bucks. It is worth mentioning that such bucks were maintained under the same feeding and climatic conditions during the entire experiment, therefore there was no influence of any another factor on the variables studied. No reference to any such find was found in the literature on goats and in particular on adult Boer goats bred in the Northeast of Brazil.

According to Thiery & Signoret (1978), the stimulus of the female after several matings seems to be the main factor that leads to the progressive increase of sexual activity in the male. The effect of introducing a female as a new stimulus led to the recuperation of sexual response in adult

males (Thiery & Signoret., 1978). However, in this experiment, the introduction of a female with hormonally induced estrus did not increase the reproductive parameters of the Boer goat bucks.

The success of breeding livestock depends on reproduction, and reproduction depends on the will and the capacity of the animals to engage in sexual behavior and fecundate at the right moment. In order to better accompany the expression of sexual behavior, it is necessary to know the different factors susceptible of influencing it. Knowing the "normal" social context in which reproduction develops can help us to understand and to manipulate the reactions of the animals in controlled breeding conditions. This will permit the development of techniques that meet the demands of the breeder as well as the needs of the animals.

Conclusion

The results of the present work have shown that Boer goats—under the climatic conditions of the Northeast of Brazil—maintain a reproductive performance within the breed standards and generally comparable to those of other caprine breeds. However, there was a significant reduction in sperm quality and sexual behavior when the Boer bucks were submitted to semen collection utilizing a female with hormonally induced estrus, showing a sensitivity on the part of these animals to the change of female stimulus.

Acknowledgements

I.J. Arruda was the recipient of a scholarship from FUNCAP/Brazil. The authors would like to thank the EMEPA Experimental Station (*Estação Experimental Benjamin Maranhão*) for the session of animals used in this study.

References

Aboagla, E. M., & Terada, E. T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrana and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69:1245–1250.

- Ahmad, N. & Noakes, D.E. 1996. Sexual maturity in British breeds of goat kids. *British Veterinary Journal*, v.152, p.93-103.
- Almquist, J.O. 1973. Effects of sexual preparation on sperm output, semen characteristics and sexual activity of beef bulls with a comparison to dairy bulls. *Journal of Animal Science*, v.36, n.2, p.331-336.
- Amir, D. H., Gacitua, H. Ron, M. & Lehrer, A. R. 1986. Seasonal variation in semen characteristics and the fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. *Anim. Reprod. Sci.* 10:75–84.
- Betini, C.M.; Moraes, G.V.; Rigolon. 1998. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. *Acta Scientiarum*, v. 20, n. 3, p. 361-5.
- Bilaspuri, G.S. & Singh, K.1992. Developmental changes in body weight and testicular characteristics in Malabari goat kids. *Theriogenology*, v.37, n.2, p.507-520.
- Borque, C. & Sagües, A. 1993. Influencia de la estacion del ano em las concentraciones de testosterona plasmática y em la composición bioquímics del eyaculado de moruegos de raça manchega In: *Jornada sobre producción animal*, 12, Zaragoza ; p. 468 -470.
- Bravo, P.W., Flores, D. & Ordoñez, C. 1997. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of reproduction* 57, p.520 -524.
- CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2a edição, Belo Horizonte. 49 p.
- Chemineau, P., Cognie, Y., Guérin, Y., Orgeu, P. & Vallet, J.C. 1991. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO. Animal Production and Health Paper. Rome, 222p.
- Colas, G. 1983. Factors affecting the quality of ram semen. In Haresign, W., (ed.), *Sheep production*. Butterworth, London. p. 453-465.
- Coulter, G.H. & Foote, R.H. 1976. Relationship of testicular weight to age and scrotal circumference of Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, v.59, n.4, p.730-732.

- Delgadillo, J.A.; Leboeuf, B.; Chemineau, P. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Ruminant Research*, v.9, p.47-59.
- Everett, R.W. & Beam, B. 1982. Environmental influences on semen output. In: *Proceedings of the Ninth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, Milwaukee. p. 13–7.
- Ferreira, J.M.M.; Silva, J.F.; Moraes, J.C.F. 1988. Associação entre caracteres reprodutivos, peso corporal e época do ano e sua potencial importância na seleção de borregos Corriedale. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.12, n.2, p.69-76.
- Galloway, D.B. 1974. Introductory review; factors affecting fertility In bulls. Course held at the University of Queensland Veterinary School, 18-22 February. p.2-23.
- Machado, R.; Simplicio, A.A.; Pinheiro, A. 1994. Testes objetivos do comportamento sexual do bode. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, n.1-2, p.19-20.
- Mieusset, R.; Quintana Casares, P.; Sanchez Partida, L.G.; Sowbutts, S.F.; Zupp, J.L.; Setchell, B.P. Effects of heating the testis and epididymites of ram by scrotal insulation on fertility and embryo mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, Great Britain, v.94, n.2, p.337-344, 1992.
- Neely, S.D.; Johnson, B.H.; Dillard, E.U.; Robinson, O.W. 1982. Genetic parameters for testes size and sperm number in Hereford bulls. *Journal of Animal Science*, v.55, n.5, p.1033-1040.
- Prado, V., Orihuela, A., Lozano, S. & Perez-Leon, I. 2003. Effect on ejaculatory performance and semen parameters of sexually satiated male goats (*Capra hircus*) after changing the stimulus female. *Theriogenology* 60:261–267.
- Ritar, A.J., Mendoza, G., Salamon, S. & White, I.G. 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil*; 95:97–102.
- Roca, J.; Martinez, E.; Vazquez, J.M. et al. Influence of season on testicle size and libido in male goats from the Mediterranean area. *Animal Production*, v.52, 317-321, 1991.

Santos, F. C. B., Souza, B.B., Alfaro, C.E.P., Cezar, M.F., Pimenta Filho, C.E., Acosta, A.A.A., Santos, J. R.S. 2005. Adaptability of exotic goat and naturalized to the climatic conditions of the tropic semi-arid Brazilian northeast. *Ciênc. agrotec., lavras*, v.29. n.1, p.142-149.

Santos, A.D. F., Torres, C. A. A., Fonseca, J. F., Borges, A. M., Costa, E. P., Guimarães, J. D. & Rovay, H. 2006. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.5, p.1926-1933.

Santos, F. C. B.; Pena-Alfaro, C. E.; Souza, B. B.; Pimenta Filho, E. C.; Cartaxo, W.; Souza, N. L.; Torres, V. L. L.; Acosta, A. A. A. Avaliação da libido em reprodutores caprinos de diversas raças exóticas e naturalizadas submetidos a diferentes frequências de coleta de sêmen em condições de clima semi-árido. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003, João Pessoa. Anais. João Pessoa: EMEPA-PB, 2003.

Sorensen, Jr. A.M. 1982. Reproducción animal: principios y prácticas. Mexico: McGraw-Hill.

Sousa, W. H., Leite, R. M. H. & Leite, P.R.M. 1997. Raça Boer: Caprino tipo carne. Emepa, documento 21, 30p. João Pessoa.

Thiery, J.C. & Signoret P.J. 1978. Effect of changing the teaser ewe on the sexual activity of the ram. *Appl Anim Ethol*; 4:87-90.

Vilar Filho, A.C.; Birgel, E.H.; Barnabe, A. et al. 1993. Características testiculares e seminais de caprinos criados na região semi-árida do estado da Paraíba. I. Características testiculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.17, n.1-2, p.17-22.

Table 1. Body weight, scrotal circumference (SCR) and paired testes volume^c (PTV) of Boer bucks during changing female stimulus tests

Measured Parameters	Natural Estrus	Induced Estrus	Sign
Weight (kg)	94.88 ±3.63	96.41 ±3.97	NS
SCR (cm)	32.83 ±0.45	32.54 ±0.39	NS
PTV (cm ³)	320.85 ±8.85	315.00 ±7.56	NS

^cPTV = 0.0396 x average testis length x SCR² from Godfrey et al. (1990).

* p < 0.05, NS = not significant.

Table 2. Semen and reproductive characteristics of Boer bucks during changing female stimulus tests

Measured Parameters	Natural Estrus	Induced Estrus	Sign
Reaction time (s)	83.53 ±48.68	129.17 ±41.40	NS
Libido	1.87 ±0.08	1.57 ±0.09	*
Semen volume (ml)	1.57 ±0.10	1.30 ±0.09	*
Sperm concentration (x 10 ⁹ x sperm ml)	4.16 ±0.25	3.25 ±0.26	*
Consistency	2.87 ±0.09	2.67 ±0.12	*
Color	1.80 ±0.19	1.67 ±0.17	NS
Motility	4.30 ±0.13	4.03 ±0.10	*
Live sperm	3.97 ±0.13	4.07 ±0.12	NS
Normal spermatozoa (%)	67.35 ±3.55	70.80 ±1.70	*
Abnormal spermatozoa (%)	1.61 ±0.17	5.48 ±0.47	*

* p < 0.05, NS = not significant.

Table 3. Correlation between various semen characteristics of Boer bucks during changing female stimulus tests

Semen characteristics	Natural Estrus	Induced Estrus
Semen volume x Sperm concentration	0.60 *	0.23
Motility x Sperm concentration	0.56 *	0.04
Live sperm x Sperm concentration	0.68 *	0.24

* $p < 0.05$, NS = not significant.

6. CAPÍTULO 2

Identificação do IGF-II nos espermatozóides de caprinos da raça Boer criados no Nordeste do Brasil

(Identification of IGF-II in spermatozoa of Boer goat bucks raised in Northeast of Brazil)

Veterinary Research Communication
(a enviar)

Identificação do IGF-II nos espermatozoides de caprinos da raça Boer criados no Nordeste do Brasil

Arruda I.J.¹, Holanda, G.M.L.³, Adrião, M.³, Oliveira, M.A.L.², Rondina, D.¹

¹Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes, UECE/FAVET

²Laboratório de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária, UFRPE

³Laboratório Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA, UFRPE

Resumo

Em várias espécies, o IGF-I tem sido identificado e correlacionado com a qualidade do sêmen. No entanto, em caprinos, relatos da identificação de transcripts a partir da extração de RNA no espermatozoide seguidos de RT-PCR são escassos. O objetivo deste experimento foi identificar a expressão do IGF-II no espermatozoide caprinos da raça boer criados no agreste da Paraíba. Os ejaculados foram colhidos de 6 caprinos machos. Foram utilizadas amostras espermáticas com parâmetros seminais normais (volume, aspecto, cor, motilidade, concentração espermática, vigor e morfologia) de acordo com Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. O processo de extração foi realizado utilizando-se o reagente Trizol, seguindo as normas do fabricante. As amplificações por PCR foram conduzidas imediatamente após a construção do cDNA. Para determinar se o RNAm para IGF-II estava presente no espermatozoide, amostras de sêmen de machos caprinos normais foram colhidos e submetidos a RT-PCR. Os resultados encontrados permitem concluir que o IGF-II está presente no espermatozoide de caprinos da raça Boer criados no Agreste da Paraíba no Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: IGF-II; Espermatozoides; Boer; Nordeste;

Abstract

In several species, the IGF-I has been identified and correlated with the quality of the semen. However, in goat, reports of the transcripts identification from the extraction of RNA in the spermatozoid followed by RT-PCR are inexistent. The objective of this experiment was to identify the expression of IGF-II in the spermatozoid goat of the race raised in the northeast of Brazil. For so much, ejaculated they were then collected of 6 goat males of the Boer breed. The samples espermáticas with normal seminal parameters as volume, aspect, color, mobility, concentration espermática, vigor and morphology in agreement with Manual for exam andrologic and evaluation of animal semen of the Brazilian School of Animal Reproduction, 1998. The extraction process was accomplished being used the reagent Trizol (TRIZOL® LS Reagent, Invitrogen, USES) following the manufacturer's norms. The amplifications for PCR were accomplished immediately after the construction of the cDNA. To be determined RNAm for IGF-II it is present in the spermatozoid ejaculated goat, samples of semen of normal goat males were collected and submitted RT-PCR. The found results demonstrated that IGF-II is present in the spermatozoid of goat of the breed Boer raised in the Northeast of Brazil.

Palavras-chave: IGF-II; Spermatozoid; Boer; Northeast;

Introdução

Durante as últimas décadas, pesquisas sobre a expressão e regulação de genes envolvidos na função espermática pós-ejaculação têm sido derivadas, principalmente, de modelos animal (Eddy & O' Brien, 1998). Estas pesquisas utilizam, em sua maioria, as técnicas de isolamento de RNA seguido de RT-PCR (Lambard et al., 2004). No espermatozóide humano, existem relatos que ele contém um material muito sensível a ribonucleases (RNases) (Witkin et al., 1975) mas, resultados recentes obtidos por hibridização *in situ*, tem identificado uma abundância relativa RNA, identificando genes que codificam transcripts expressados exclusivamente por células germinativas haplóides (Pessot et al., 1989; Kumar et al., 1993; Wykes et al., 1997). Surgindo assim a possibilidade de análise da expressão de genes específicos espermatogênicos e de identificação de transcripts raros após a transcrição de RNAm em cDNA (RT-PCR).

No trato reprodutivo masculino, o IGF-I tem sido encontrado no testículo (Handelsman *et al.*, 1985; Zhou & Bondy, 1993; Hess *et al.*, 2001;), onde é secretado pelas células de Leydig e Sertoli (Handelsman *et al.*, 1985; Vanelli *et al.*, 1988; Roser, 2001). Receptores para IGF-I foram identificados nas células de sertoli (Borland *et al.*, 1984), leydig (Smith *et al.*, 1987), espermatócitos secundários, espermátides (Borland *et al.*, 1984) e espermatozóides (Henricks *et al.*, 1998; Naz & Padman, 1999). Existem outras pesquisas que indicam o envolvimento do IGF-I na espermatogênese inicial (Tsuturu & O'Brien, 1995) e esteroidogênese (Saez, 1994), no início da puberdade, fecundação e desenvolvimento embrionário (Spiteri-Grech & Nieschlang, 1992). Em humanos (Glander *et al.*, 1996) e bovinos (Henricks *et al.*, 1998), o IGF-I tem sido mensurado e correlacionado com a qualidade do sêmen. No entanto, a identificação e a relação dos IGFs e a função espermática em espécies domésticas tem sido pouco esclarecida.

Considerando-se que são escassos os relatos da identificação de transcripts a partir da extração de RNA no espermatozóide seguidos de RT-PCR, na espécie caprina. O objetivo deste experimento foi identificar a expressão do IGF-II no espermatozóide caprinos da raça criados no nordeste do Brasil.

Material e métodos

Amostras de Sêmen e preparação espermática

Os ejaculados foram colhidos de 6 caprinos machos da raça Boer com idade média de $3 \pm 1,1$ anos e condição de escore corporal variando de 3,5 – 4,0. Os animais foram examinados quanto à condição sanitária geral e reprodutiva, através de exames clínico e andrológico (CBRA, 1998) a cada 15 dias, além de tomada de peso. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume, aspecto, cor, motilidade, concentração, vigor e morfologia espermática. Em cada amostras foi individualmente centrifugada a 15000 rpm por 15 minutos, para separação do plasma seminal. O pellet foi armazenado em tubos eppendorfs a - 4 °C até o início da extração. Na segunda fase experimental, após a colheita, os espermatozóides foram destinados à capacitação espermática através do método do swin-up seguido da adição de heparina (0, 0010g / 10 uL de meio).

Extração de RNA

O processo de extração do RNA total foi iniciado transferindo-se o pellet para um novo tubo, no qual acrescento-se Trizol e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a digestão com trizol, a fase aquosa foi extraída com clorofórmio e a precipitação do RNA foi feita utilizando-se álcool isopropílico em um volume de 1:1. O precipitado foi lavado com etanol a 75%, secado a temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, ressuscitado em água DEPC (dietilpirocarbonato) e imediatamente armazenado a - 80 °C até sua utilização. A presença do RNA foi avaliada após as extrações através de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 5% de

formaldeído e 10% de MOPS (MOPS 200mM, pH 7,0 , acetato de sódio 80mM e EDTA 10mM, pH8,0). Afim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA total interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR.

Protocolo DNase I

Conforme as instruções do Protocolo DNase I –Amplification Grade (Invitrogen), o RNA total destinado a reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde acrescentou-se 1 µL de tampão DNase, 1 µL de DNase I (1U/ µL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e , em seguida, foi acrescida de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65 °C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram transferidas para gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

Reação de transcrição reversa (RT)

Formação de cDNA

A síntese de cDNA foi conduzida em um volume final de 15 µl contendo aproximadamente 1,0 µg de RNA, 200 U da enzima RT Superscript™ II (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 1x tampão da enzima Superscript II (50 mM Tris- HCl (pH8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0,02 M de Oligo (dT) e 800 µM de cada dNTP. Toda a mistura foi aquecida a 37 ° C por 5 minutos, seguida por 42 °C por 50 minutos e finalmente a 70 °C por 15 minutos. Após o ciclo, as amostras foram mantidas em gelo para utilização imediata no PCR ou armazenadas a -20 °C.

Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As amplificações por PCR foram conduzidas imediatamente após a construção do cDNA. Cada reação para detecção do IGF-II foi realizada adicionando-se os 10 µl de cDNA em um volume final de 50 µl contendo 2U de taq polimerase, 0,25 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmol de cada primer específico para IGF-II (tabela 1) e 1x tampão de PCR (50 mM KCL; 10 mM Tris pH 9; Triton X-100 0,1%). As condições de PCR foram: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos.

O controle positivo utilizado foi o primer GAPDH e controles negativos consistiram da substituição de cDNA por água ultra-pura (Sigma, USA).

Tabela 1: Seqüência dos primers utilizados para detecção do IGF-II E GAPDH por RT-PCR

Gene alvo	Seqüência
GAPDH	S 5' TGT TCC AGT ATG ATT CCA CC 3' A 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG 3'
IGF-II	S 5'-TCGTGCTGCTATGCTGCTTACC-3' A 5'-ACTGCTTCCAGGTGTCAGATTGG-3'

Eletroforese

As amplificações foram analisadas em gel de agarose (2%) corado com Brometo de etídio e tampão de corrida SB1X (10mM hidróxido de sódio- ácido bórico pH 8,5) sobre um transluminador

de luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram avaliados utilizando-se um marcador molecular de 50 pb (invitrogen , USA) e fotografados em câmera digital.

Resultados e discussão

Para determinar se o RNAm para IGF-II está presente no espermatozóide ejaculado caprino, amostras de sêmen de machos caprinos normais foram colhidas e submetidas a RT-PCR. Vale ressaltar que os produtos de RT-PCR para IGF-II não foram resultados de contaminação de DNA, porque as amostras de RNA foram submetidas a tratamento com dextroribonucleases (DNases) antes do RT-PCR. A seqüência de “primers” foram baseadas na seqüência do gene do IGF-II bovino e as amplificações de RT-PCR revelaram um produto de 63,5 bp (Figura 1), e ainda, que ete está presente no espermatozóide caprino de cada indivíduo doador (Figura 2) em espermatozóide caprino capacitado (Figura 1) e em amostras de sêmen submetidas ao pool (Figura 3).

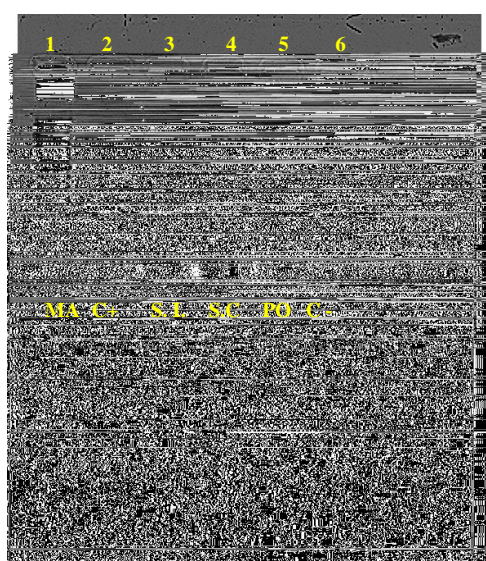


Figura 1: Análise de RT-PCR do gene do IGF-II no espermatozóide caprino. Poço 1:MA (marcador molecular de 50bp), Poço 2: C+ (controle positivo –GAPDH), Poço 3: S.I (amostras de sêmen por indivíduos), Poço 4: S.C. (espermatozóide capacitado), Poço 5: PO (pool de espermatozóides) e Poço6: C- (controle negativo)



Figura 2: Análise de RT-PCR do gene do IGF-II no espermatozóide caprino. Poços 1-8, amostras de cada indivíduo doador.

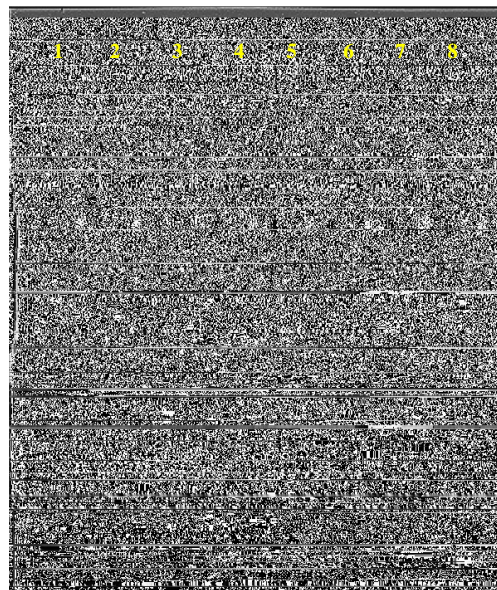


Figura 3: Análise de RT-PCR do gene do IGF-II no pool de espermatozóides caprinos.

As gonadotrofinas são os maiores reguladores da função gonadal em muitos organismos. Um grande número de estudos tem relatado que o IGF-II age através de vias autócrinas e parácrinas, como regulador sensível da função testicular (Daughaday & Rotwein, 1989; Adashi et al., 1992; Spiteri-grech & Nieslag, 1993).

O IGF-II é um polipeptídeo de baixo peso molecular que apresenta papel importante no desenvolvimento, diferenciação e crescimento de vertebrados (Daughaday & Rotwein, 1989; DePablo et al., 1990). Estes hormônios são restritamente relacionados à insulina em termos de sua

seqüência de aminoácidos e atividade biológica (Van wyk, 1984). Em mamíferos, o IGF-II apresenta uma dependência sobre o hormônio do crescimento durante a vida pós-nascimento (Froesch et al., 1985). Entretanto, recentes estudos sugerem que o IGF-II é essencial para o desenvolvimento na embriogênese. No entanto, a localização e regulação celular da expressão do IGF-II e sua ação na gônada masculina permanece obscura.

O IGF-II a partir do RNAm foi detectado em uma muitas células estudadas: células de sertoli, espermatogônia A e B, espermatócitos primários e secundários e espermátides, nos diferentes níveis de expressão (Le Gac & Loir, 1993). O IGF-II a partir do RNAm parece ser expressado na maioria das células germinativas pré-meióticas e em particular, na espermatogônia. E em nosso estudo podemos identificar a presença deste também no espermatozóide normal e capacitado.

A técnica de isolamento de RNA realizada neste experimento necessitou de ajustes, uma vez que, em espermatozóide caprino, não existe relatos de isolamento de RNA; observou-se

A confirmação de que o RNA foi recuperado do espermatozóide caprino foi realizada com

Este estudo apresenta uma nova possibilidade de um mediador endógeno da capacitação, porque foi identificada neste experimento a presença do IGF-II no espermatozóide ejaculado caprino. Pondo em questão a possível influência deste fator de crescimento sobre este processo.

Conclusão

Os resultados demonstraram que o IGF-II está presente no espermatozóide de caprinos da raça Boer criados no Agreste da Paraíba, Nordeste do Brasil, tanto no espermatozóide normal (individual ou em poll), quanto no capacitado. Logo, as análises de RNA no espermatozóide caprino são possíveis e podem adicionar novos conhecimentos moleculares sobre a fertilidade no macho caprino.

Agradecimentos

I.J. Arruda was the recipient of a scholarship from FUNCAP/Brazil. The authors would like to thank EMEPA – Estação experimental Benjamin Maranhão for the session of animals used in this study.

Referências

- Aquila, S.; Gentile, M.; Middea, E.; Catalano, S.; Morelli, C.; Pezzi, V.; Andó, S. 2005a. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.90 (8): p. 4753-4761,.
- Aquila, S., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S. & Ando, S., 2005b. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology* 146 (2), p. 552-557.
- Borland, K.; Mita, M.; Oppenheimer, C.L.; Blinderman, L.A.; Massague, J.; Hall, P.F.; Czech, M.P. The actions of insulin-like growth factors I and II on culture sertoli cells. *Endocrinology*, v. 114: p. 240-246, 1984.
- CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2a edição, Belo Horizonte. 49 p.
- Eddy, E.M. & O'Brien, D.A. 1998. Gen expression during mammalian meiosis. *Curr. Tropics Dev. Biol.*, 37, 141 -200.
- Glander, H.J.; Kratzsch, J.; Weisbrich, Ch.; Birkenmeier, G. Insuline-like growth factor-I and α_2 -macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Human Reproduction* v.11: p.2454-2460, 1996.
- Glander, H.J.; Lammert, A.; Paasch, U.; Glasow, A.; Kratzsch, J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia*, v. 34: p. 227-233, 2002.
- Goodwin, L.O., Karabinus, D.S., Pergolizzi, R & Benoff, S. 2000. L-type voltage-dependent calcium channel α - 1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. *Molecular Human reproduction*, v.6. n.2, p.127-136.
- Handesman, D.J.; SPALIVIERO, J.A.; SCOTT, C.D.; BAXTER, R.C. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rats testis. *Acta Endocrinol*, v. 190: p.543-549, 1985.
- Henricks, D.M.; Kouba, A.J.; Lackey, B.R.; Boone, W.R.; Gray, S.L.L. Identification of insulin-like growth factor-I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reproduction* v.59: p.330-337, 1998
- Hess, M.F.; Roser, J.F.; The effects of age and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor-I concentration in stallions. *Theriogenology*, v.56: p.723-733, 2001.
- Kumar, G., Patel, D & Naz, R.K.. 1993. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell. Mol. Biol.Res.* 39, 11-117.

- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Martin, G., Levy, R., Chocat, A. & Carreau, S. 2004. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Molecular human reproduction*, v.10, n.07, p. 535-541.
- Montagne, C.T., Farooqi I.S. & Whitehead, J.P. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908.
- Mounzih, K., Lu, R., Chehab, F.F. 1997. leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138, 1190-1193
- Naz, R.K.; Padman, P. Identification of insulin-like growth factor (IGF-I) receptor in human sperm cell. *Arch Androl*, v.43: p. 153-159, 1999.
- Pessot, C.A., Brito, M., Figuerosa, J. Et al. 1989. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem. Biophys Res. Commun*, 158, 272-278.
- Piva, M. & Sharpe-Timmes, K.I. 1999. Peritoneal endometriotic lesions differentially express a haptoglobin-like gene. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 71-78.
- Plymate, S.R; Rosen, C.J.; Paulsen, C.A.; Ware, J.L.; Chen, J.; Vessella, R.E.; Birnbaum, R.S. 1996. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 in the male reproductive tract
- Roser, J.F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Animal Reproduction Science*, v.68: p.139-151, 2001.
- Saez, J.M. Leydig cells: endocrine, paracrine, autocrine regulation. *Endocr Rev*, v.15: p.574-626, 1994.
- Smith, E.P.; Svoboda, M.E.; Van Wyk, J.J.; Kierszebaum, A.L.; Tres, L.L. Partial characterization of a somatomedin-like peptide from the medium of cultured rat sertoli cells. *Endocrinology*, v. 129: p.186-193, 1987.
- Spiteri-grech, J.; Nieschlag, E. Role of growth hormone and insulin-like growth factor in the regulation of male reproductive function. *Horm. Res.* v. 38 (Suppl 1): p. 22-27, 1992.
- Tena-sempere, M.; Bareiro, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinology*, v. 188: p. 9-13, 2002.
- Tsutura, J.K.; O'Brien, D.O. Sertoli cell-sperm

7. CONCLUSÕES GERAIS

A raça Boer nas condições do Nordeste Brasileiro mantém um desempenho reprodutivo dentro dos padrões da raça e de forma geral, comparáveis ao de outras raças caprinas.

O IGF-II está presente no espermatozóide de caprinos da raça Boer criados no Agreste Nordestino do Brasil, tanto no espermatozóide normal (individual ou em poll), quanto no capacitado.

8. PERSPECTIVAS

Nossos resultados deixam a perspectiva de que pesquisas adicionais devem ser desenvolvidas a fim de adicionar novos conhecimentos moleculares sobre a fertilidade no macho caprino.

9. REFERÊNCIAS GERAIS

ABOAGLA, E. M., & TERADA, E. T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrana and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69:1245–1250, 2003.

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

AITKEN, R.J. Pathophysiology of human spermatozoa. *Curr. Opin. Obstet Gynecol.* v. 6: p.128-135, 1994.

AL-GHALBAN, A.M., TABBAA, M.J., KRIDLI, R.T., Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks (technical note). *Small Rumin. Res.* 53, 141–149, 2004.

ALBARRACIN, J.L; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; BALLESTER, J.; RAUCH, M.C.; QUINTERO-MORENO, A.; PENA, A.; MOGAS, T.; RIGAU, T.; YANEZ, A.; GUINOVART, J.J.; SLEBE, J.C.; CONCHA, I.I.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of *in vitro* capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biol Reprod*, v. 71, p.3437-3445, 2004.

ALI, B.H., MUSTAFA, A.I., Semen characteristics of Nubian goats in Sudan. *Anim. Reprod. Sci.* 12, 63–68, 1986.

ALMQUIST, J.O. Effects of sexual preparation on sperm output, semen characteristics and sexual activity of beef bulls with a comparison to dairy bulls. *Journal of Animal Science*, v.36, n.2, p.331-336, 1973.

AMIR, D. H., GACITUA, H. RON, M. & LEHRER, A. R. Seasonal variation in semen characteristics and the fertility of Finn cross rams subjected to frequent ejaculation. *Anim. Reprod. Sci.* 10:75–84, 1986.

ANDÒ, S.; AQUILA, S. Arguments raised by the recent Discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. *Molecular and cellular endocrinology* v.245: p.1-6, 2005.

ANUALPEC. Consultoria e comércio. São Paulo: FNP, p. 376, 2004.

AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E.; CATALANO, S.; MORELLI, C.; PEZZI, V.; ANDÒ, S. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.90 (8): p. 4753-4761, 2005a.

AQUILA, S., GENTILE, M., MIDDEA, E., CATALANO, S. & ANDO, S., Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology* 146 (2), p. 552-557, 2005b.

BACCETTI, B.; LA MARCA, A.; PIOMBONI, P.; CAPITANI, S.; BRUNI, E.; PETRAGLIA, F.; DE LEO, V. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum. Reprod.* v.17: p. 2673-2677, 2002.

BALLESTER, J.; FERNANDEZ-NOVELL, J.M.; RUTLLANT, J.; GARCIA-ROCHA, M.; JESUS-PALOMO, M.; MOGAS, T.; PENA, A.; RIGAU, T.; GUINOVART, J.J.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.56: p. 207-219, 2000.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, v. 137: 3144-3147, 1996.

BARB, C.R.; KRAELING, R.R. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science*, v.82-83: p.155-167, 2004.

BETINI, C.M.; MORAES, G.V.; RIGOLON. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. *Acta Scientiarum*, v. 20, n. 3, p. 361-5, 1998.

BESTETTI, G.; LOCATELLI, V.; TIRONE, F.; ROSSI, G.L.; MULLER, E.E. One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. *Endocrinology*, v. 117: p.208-216, 1985.

BILASPURI, G.S. & SINGH, K. Developmental changes in body weight and testicular characteristics in Malabar goat kids. *Theriogenology*, v.37, n.2, p.507-520, 1992.

BLOM, E. A one minute live dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility*. v.1, p.176-177, 1950.

BLOM, E. A new sterilizing and hereditary defect (the Δ 324 defect') located in the bull sperm tail. *Nature*. v. 209, p.739-740, 1966.

BLOM, E. Om bedømmelsen af tyresperma. Specielt med henblik på anvendelsen ved den kystige sal deverfring. Kopenhagen, 1950c. 223p. Tese Doutorado. Citado por Garcia, 1971.

BORELLI, M.I.; ARANCINI, F.; GAGLIARDINO, J.J. Autocrine regulation of glucose metabolism in pancreatic islets. *Am J Physiol*, v.286: p.111-115, 2004.

BORLAND, K.; MITA, M.; OPPENHEIMER, C.L.; BLINDERMAN, L.A.; MASSAGUE, J.; HALL, P.F.; CZECH, M.P. The actions of insulin-like growth factors I and II on culture sertoli cells. *Endocrinology*, v. 114: p. 240-246, 1984.

BONGSO, T.A.; JAINUDEEN, M.R.; ZAHRAH, A.S. Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. *Theriogenology*, v.18, n.5, p.513-524, 1982.

BORQUE, C. & SAGÜES, A. Influencia de la estacion del ano em las concentraciones de testosterona plasmática y em la composición bioquímics del eyaculado de moruegos de raça manchega In: Jornada sobre producción animal, 12, Zaragoza ; p. 468 -470, 1993.

BREIER, B.H.; VICKERS, M.H.; GRAVANCE, C.G.; CASEY, P.J. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology*, v.137(9): p. 4061-4064, 1996.

CAPRIO, M.; ISIDORI, A.M.; AVERSA, A; FABBRI, A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*, v.12: p.65-72, 2001.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2a edição, Belo Horizonte. 49 p., 1998.

CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUÉRIN, Y., ORGEU, P. & VALLET, J.C. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO. Animal Production and Health Paper. Rome, 222p, 1991.

COLAS, G..Variations saisonnières de la qualité du sperme chez la belier lli-de-france. I. étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dévelop.* v. 20, p.1789-1799, 1980

COLAS, G.. Factors affecting the quality of ram semen. In Haresign, W., (éd.), *Sheep production*. Butterworth, Londres. p. 453-465, 1983.

COPELAND, K.C.; UNDERWOOD, L.E.; VAN WYK, J.J. Induction of immunoreactive somatomedin C human serum by growth hormone: dose-response relationships and effect on chromatographic profiles. *L Clin Endocrinol Metab*, v. 50 (4): 690-697, 1980.

COULTER, G.H. & FOOTE, R.H. Relationship of testicular weight to age and scrotal circumference of Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, v.59, n.4, p.730-732, 1976.

CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 3ª edição, 2004

DELGADILLO, J.A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Ruminant Research*, v.9, p.47-59, 1992.

DE FRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev*, v.5: p. 177-269, 1997.

DERIVAUX, J. *Reprodução dos animais domésticos*. Editorial Acribia. Zaragoza. 446p., 1980.

EDDY, E.M. & O'BRIEN, D.A. Gen expression during mammalian meiosis. *Curr. Topics Dev. Biol.*, 37, 141 -200, 1998.

ELDER, K.; DALE, B.; *In vitro fertilization*. 2ª edition, 2000.

EPPLESTON, J., MAXWELL, WMC. Recent Attempts to improve the fertility of frozen semen inseminated into the cervix. *Woll Tech Sheep Breed*. v.41, p. 291-302, 1993.

EVERETT, R.W. & BEAM, B. Environmental influences on semen output. In: *Proceedings of the Ninth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, Milwaukee. p. 13-17, 1982.

FLAHERTY, C; DE LAMIRANDE, E; GAGNON, C; Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. *Free radical biology and medicine*, v.41, p.528-540, 2006.

FERREIRA, J.M.M.; SILVA, J.F.; MORAES, J.C.F. Associação entre caracteres reprodutivos, peso corporal e época do ano e sua potencial importância na seleção de borregos Corriedale. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.12, n.2, p.69-76, 1988.

FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J.; WALL, R.J. Principles and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration. In: *TECHNICAL CONFERENCE ON*

ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 7., Madison, 1978. Proceedings... s.l., NAAB,. p.55-61,1978.

GALLOWAY, D.B. Introductory review; factors affecting fertility In bulls. Course held at the University of Queensland Veterinary School, 18-22 February. p.2-23, 1974.

GLANDER, H.J.; KRATZSCH, J.; WEISBRICH, CH.; BIRKENMEIER, G. Insuline-like growth factor-I and α_2 - macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. Human Reproduction v.11: p.2454-2460, 1996.

GLANDER, H.J.; LAMMERT, A.; PAASCH, U.; GLASOW, A.; KRATZSCH, J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. Andrologia, v. 34: p. 227-233, 2002.

GATTI, J.L., DACHEUX, J.L. Bases moléculaires du mouvement flagellairte. Andrologie. v.5, p.15-30, 1995.

GODFREY, R. W., COLLINS, J. R. & GRAY, M. L. Evaluation of Sexual Behavior of Hair Sheep Rams in a Tropical Environment1. J. Anim. Sci. 76:714–717, 1998.

GREYLING, J.P.C., GROBBELAAR, J.A.N. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. S. A. J. Anim. Sci. 13, 250–252, 1983.

GUITON & HALL - Text Book of Medical Physiology, 9th edition, p. 911-923, 1996.

HAFEZ, E.F.E.; HAFEZ, D. Reprodução animal.7ª Edição, Ed. Manole, 2004.

HALE, E.B. & ALMQUIST, J.O. Relation of sexual behavior to germ cell output in farm animals. J Dairy Sci;43:145–69, 1960.

HANCOCK, J.L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. Nature (lond). v. 167: p.323, 1951.

HANDELSMAN, D.J.; SPALIVIERO, J.A.; SCOTT, C.D.; BAXTER, R.C. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rats testis. Acta Endocrinol, v. 190: p.543-549, 1985.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; BOONE, W.R.; GRAY, S.L.L. Identification of insulin-like growth factor-I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. Biol Reproduction v.59: p.330-337, 1998.

HESS, M.F.; ROSER, J.F.; The effects of age and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor-I concentration in stallions. *Theriogenology*, v.56: p.723-733, 2001.

HILEMAN, S.M.; PIERROZ, D.D.; MASUZAKI, H.; BJORBAEK, C.; EL-HASCHIMI, K.; BANKS, W.A.; FLIER, J.S. Characterization of short isoform of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology*, v. 143: p.775-783, 2002.

JENNINGS, J.J. & MCWEENEY, J. Effect of frequent ejaculation on semen characteristics in rams. *Vet Rec*;20:230–3, 1976.

KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53, 1285–1293, 2000

KIESS, W.; BLUM, W.F.; AUBERT, M.L. Leptin, puberty and reproductive function: lesson from animal studies and observations in humans. *Eur J Endocrinology* v.138: p. 26-29, 1998

KIRK, E.S. Flow cytometric evaluation of stallion sperm. Fort Collins-CO, 131p. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, 2001.

KUMAR, G., PATEL, D & NAZ, R.K.. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell. Mol. Biol. Res.* 39, 11-117, 1993.

LACKEY, B.R.; GRAY, S.L.; HENRICKS, D.M. Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. *Physiol. Res.* v. 51: p.309-311, 2002

LAMBARD, S., GALERAUD-DENIS, I., MARTIN, G., LEVY, R., CHOCAT, A. & CARREAU, S. 1993.. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Molecular human reproduction*, v.10, n.07, p. 535-541, 1993.

LIGHTFOOT, R.J., RESTAL, B.J. Effects of site of insemination, sperm motility and genital tract contractions on transport of spermatozoa in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* v.26, p.1-3, 1971.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; PINHEIRO, A. Testes objetivos do comportamento sexual do bode. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, n.1-2, p.19-20, 1994.

MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B.R.; VARNER, D.D.; LOOMIS, O.; CADARIO, M.E.; MILLER, C.D.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T.L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. *Biology of reproduction*, v. 67: p.648-454, 2002.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. New York: Springer-Verlag, . 495p, 1981.

MENDOZA, G., WHITE, I.G., CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology* 32, 455–466, 1989.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 3.ed. Porto Alegre, Sulina,. 545p, 1975.

MIEUSSET, R.; QUINTANA CASARES, P.; SANCHEZ PARTIDA, L.G.; SOWBUTTS, S.F.; ZUPP, J.L.; SETCHELL, B.P. Effects of heating the testis and epididymites of ram by scrotal insulation on fertility and embryo mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, Grã-Bretanha, v.94, n.2, p.337-344, 1992.

MIYAMOTO, A.; UMEZU, M.; HAMANO, K. et al. Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in the male goat (*Capra hircus*). *Theriogenology*, v.28, n.1, p.67-76, 1987.

MONTAGNE, .C.T., FAROOQI I.S. & WHITEHEAD, J.P. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908, 1997

MOUNZIH, K., LU, R., CHEHAB, F.F. 1997. leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138, 1190-1193.,1997.

NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; ABE, S.I. IGF-I , IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of news testes. *Int. J. Dev. Biol.* v. 43: 343-347, 1999.

NAZ, R.K.; PADMAN, P. Identification of insulin-like growth factor (IGF-I) receptor in human sperm cell. Arch Androl, v.43: p. 153-159, 1999.

NEELY, S.D.; JOHNSON, B.H.; DILLARD, E.U.; ROBINSON, O.W. Genetic parameters for testes size and sperm number in Hereford bulls. Journal of Animal Science, v.55, n.5, p.1033-1040, 1982.

OVESEN, P.; JORGENSEN, J.O.; INGERSLEV, J.; HO, K.K.; ORSKOV, H. CHRISTIANSEN, J.S. Growth hormone treatment of subfertile males. Fertil Steril, v.66(2): p.292-296, 1996.

PEPELKO, W. E. & CLEGG, M.T. Studies of mating behavior and some factors influencing the sexual response in the male sheep (*Ovis aries*). Anim. Behav. 13:249–258, 1965.

PESSOT, C.A., BRITO, M., FIGUEROSA, J. Et al. Presence of RNA in the sperm nucleus. Biochem. Biophys Res. Commun, 158, 272-278, 1989.

PIVA. M.& SHARPE-TIMMES, K.I. Peritoneal endometriotic lesions differentially express a haptoglobin-like gene. Mol. Hum. Reprod. 5, 71-78, 1999.

PLYMATE, S.R; ROSEN, C.J.; PAULSEN, C.A.; WARE, J.L.; CHEN, J.; VESSELLA, R.E.; BIRNBAUM, R.S. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 in the male reproductive tract. J Clin Endocrinol Metab, v.86: p. 618-624, 1996.

PRADO, V., ORIHUELA, A., LOZANO, S. & PEREZ-LEON, I. Effect on ejaculatory performance and semen parameters of sexually satiated male goats (*Capra hircus*) after changing the stimulus female. Theriogenology 60:261–267, 2003.

QUINTERO-MORENO, A.; PENA, A.; MOGAS, T.; RIGAU, T.; YANEZ, A.; GUINOVART, J.J.; SLEBE, J.C.; CONCHA, I.I.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of *in vitro* capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. Biol Reprod, v. 71, p.3437-3445, 2004.

RITAR, A.J., MENDOZA, G, SALAMON, S. & WHITE, I.G. Frequent semen collection and sperm reserves of

ROCA, J., CARRIZOSA, J. A., CAMPOS, I., LAFUENTE, A., VÁZQUEZ, J. M. &
MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano- Granadina goat spermatozoa

M

SHAMSUDDIN, M., AMIRI, Y., BHUIYAN, MMU. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reprod. Domes. Anim.* 35, 53–57, 2000.

SILVESTRONI, L.; MODESTI, A.; SARTORI, C. Insulin-sperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome. *Arch. Androl.* v.28: 201-211, 1992.

SMITH, E.P.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J.; KIERSZEBAUM, A.L.; TRES, L.L. Partial characterization of a somatomedin-like peptide from the medium of cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology*, v. 129: p.186-193, 1987.

SPITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. Role of growth hormone and insulin-like growth factor in the regulation of male reproductive function. *Horm. Res.* v. 38 (Suppl 1): p. 22-27, 1992.

STEINMAN, N.; GAMZU, R.; YOGEV, L.; BOTCHAN, A.; SCHREIBER, L.; YAVETZ, H. Serum leptin concentrations are higher in azoospermic than in normozoospermic men. *Fertil Steril*, v. 75, p. 821-822, 2001.

SORENSEN, JR A.M. *Reproducción animal: principios y prácticas*. México: McGraw-Hill, 1982.

SOUSA, W. H., LEITE, R. M. H. & LEITE, P.R.M. Raça Boer: Caprino tipo carne. *Emepa*, documento 21, 30p. João Pessoa. 1997.

TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinology*, v. 188: p. 9-13, 2002.

TENA-SEMPERE, M.; PINILLA, L.; GONZALEZ, L.C.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F.; AGUILAR, E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis *in vitro*. *J Endocrinol*, v.161, p.211-218, 1999.

THIERY, J.C. & SIGNORET, P.J. Effect of changing the teaser ewe on the sexual activity of the ram. *Appl Anim Ethol*;4:87–90, 1978.

TRAVIS, A.J.; FOSTER, J.A.; ROSENBAUM, N.A.; VISCONTI, P.E.; GERTON, G.L.; KOPF, G.S.; MOSS, S.B. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Biol Cell*, v.9: p.263-276, 1998.

TRAVIS, A.J.; JORGEZ, C.J.; MERDIUSHEV, T.; JONES, B.H.; DESS, D.M.; DIAZ-CUETO, L.; STOREY, B.T.; KOPF, G.S.; MOSS, S.B. Functional relationships

between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol Chem*, v.276, p.7630-7636, 2003.

TSUTURA, J.K.; O'BRIEN, D.O. Sertoli cell-spermatogenic interactions: insulin-like growth factor II / cation-independent mannose-6-phosphate receptor mediates changes in spermatogenic cycle gene expression in mice. *Biol Reprod*, v.53: p.1454-1464, 1995.

VANELLI, B.G.; BARNI, T.; ORLANDO, C.; NATALI, A.; SERIO, M.; BALBONI, G. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the IGF-I receptor in the human testis: an immunohistochemical study. *Fert Steril*, v.49: p. 666-669, 1988.

VILAR FILHO, A.C.; BIRGEL, E.H.; BARNABE, A. et al. Características testiculares e seminais de caprinos criados na região semi-árida do estado da Paraíba. I. Características testiculares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.17, n.1-2, p.17-22, 1993.

VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G.D.; BAILEY, J.L.; NING, X.; FORNES, M.; KOPF, G.S. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, v.19: p.242-248, 1998.

WYKES, S.M., VISSCHER, D. W. & KRAWETZ, S.A. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 3 15-319, 1997.

WITKIN, S.S., KORNGOLD, G.C. & BENDICH, A. Ribonuclease-sensitive DNA synthesizing complex in human sperm heads and seminal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75, 3295-3299, 1975.

ZEMJANIS, R. Diagnostic and therapeutic techniques in animal reproduction. 2.ed. Baltimore, Williams Wilkins Co, 242p, 1970.

ZHOU, M.D.; BONDY, C. Anatomy of insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil Steril*, v.60: p.897-904, 1993.

WAUTERS, M.; CONSIDINE, R.V.; VAN GALL, L.F. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*, v.143: p.293-311, 2000.

WEBB, E.C. & MANABOLO, M. J. Production and reproduction characteristics of south african indigenous goats in communal farming systems. *South African journal of animal science*, n.34 –supplement 1). P.236-239, 2004.

WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl*, v.22: p.680-695, 2001.

10. ANEXOS

ANEXO 1

FOTOS DO EXPERIMENTO

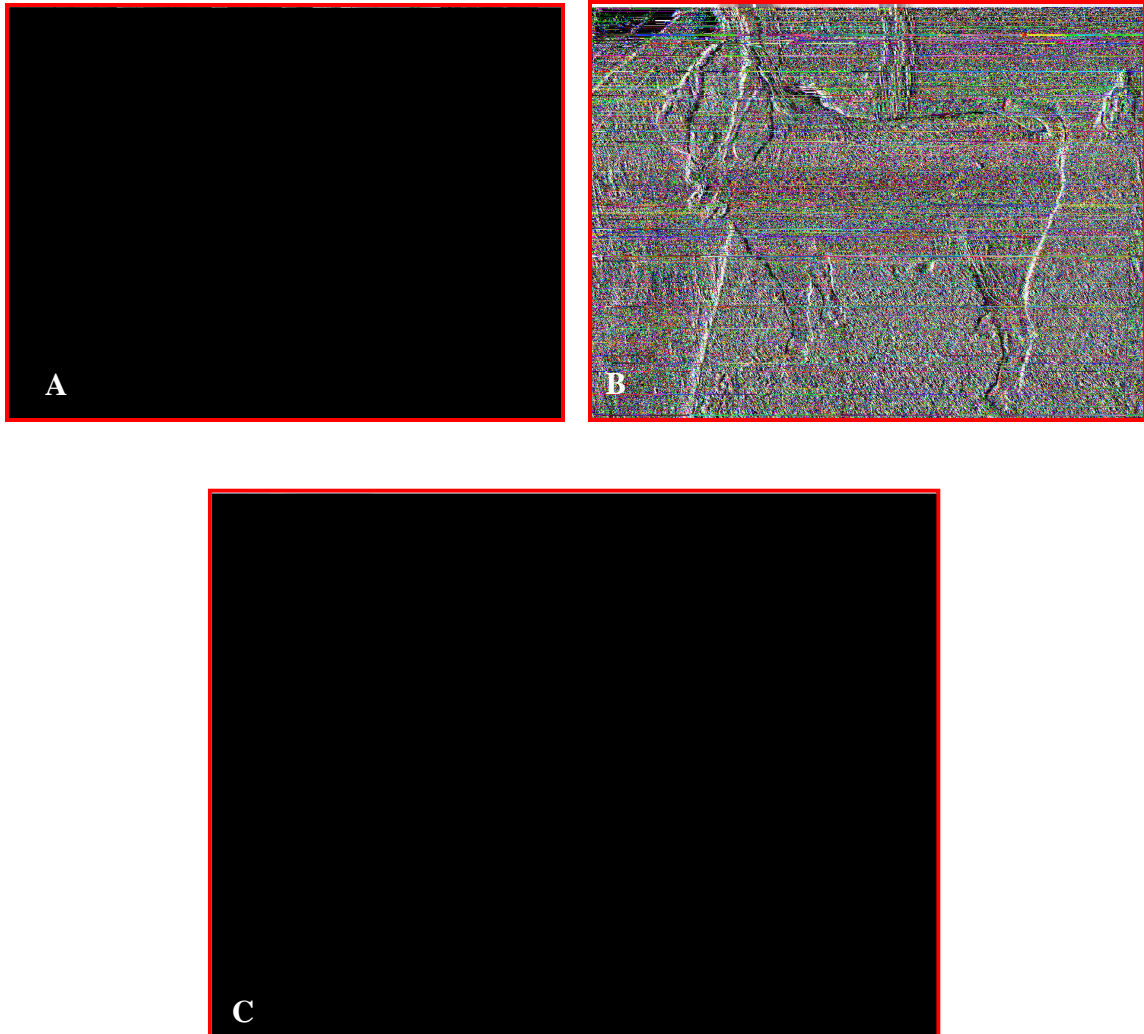


Figura 4. Animais experimentais (A, B e C).

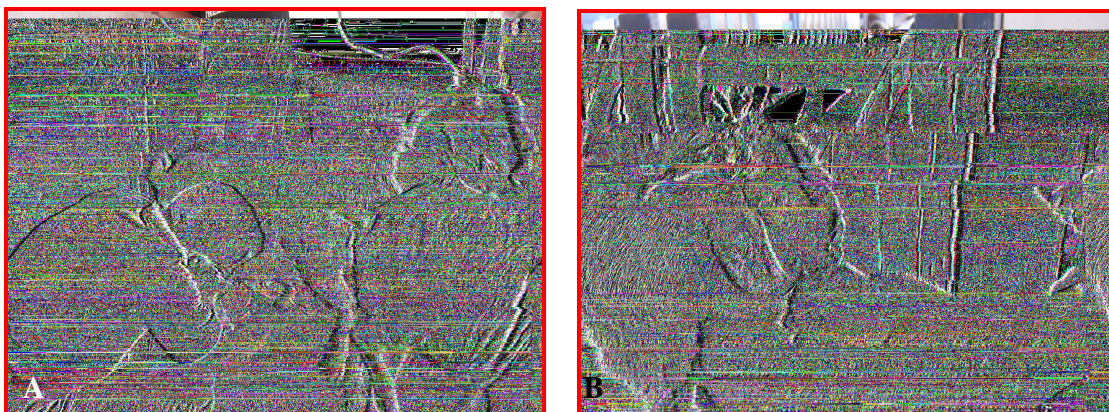


Figura 5. Colheita de sêmen (A) e Demonstração de libido (B).

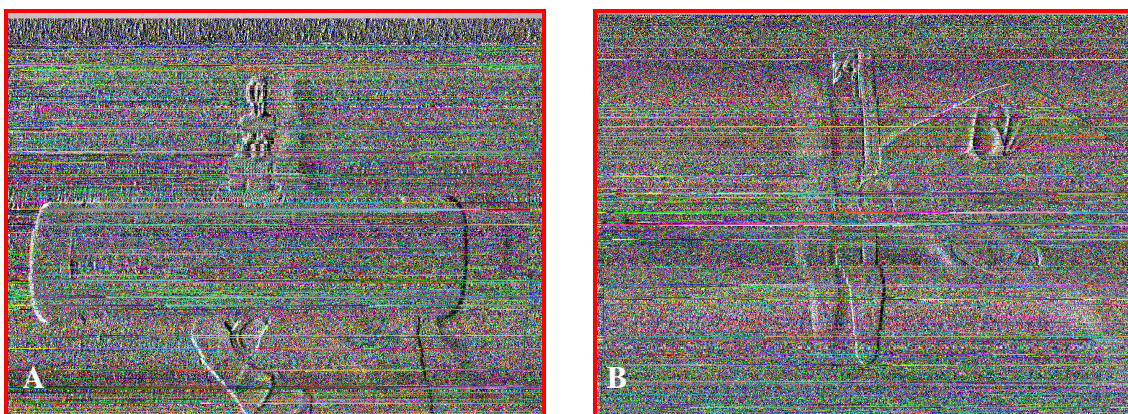


Figura 6. Vagina artificial utilizada (A) e ejaculado colhido (B).

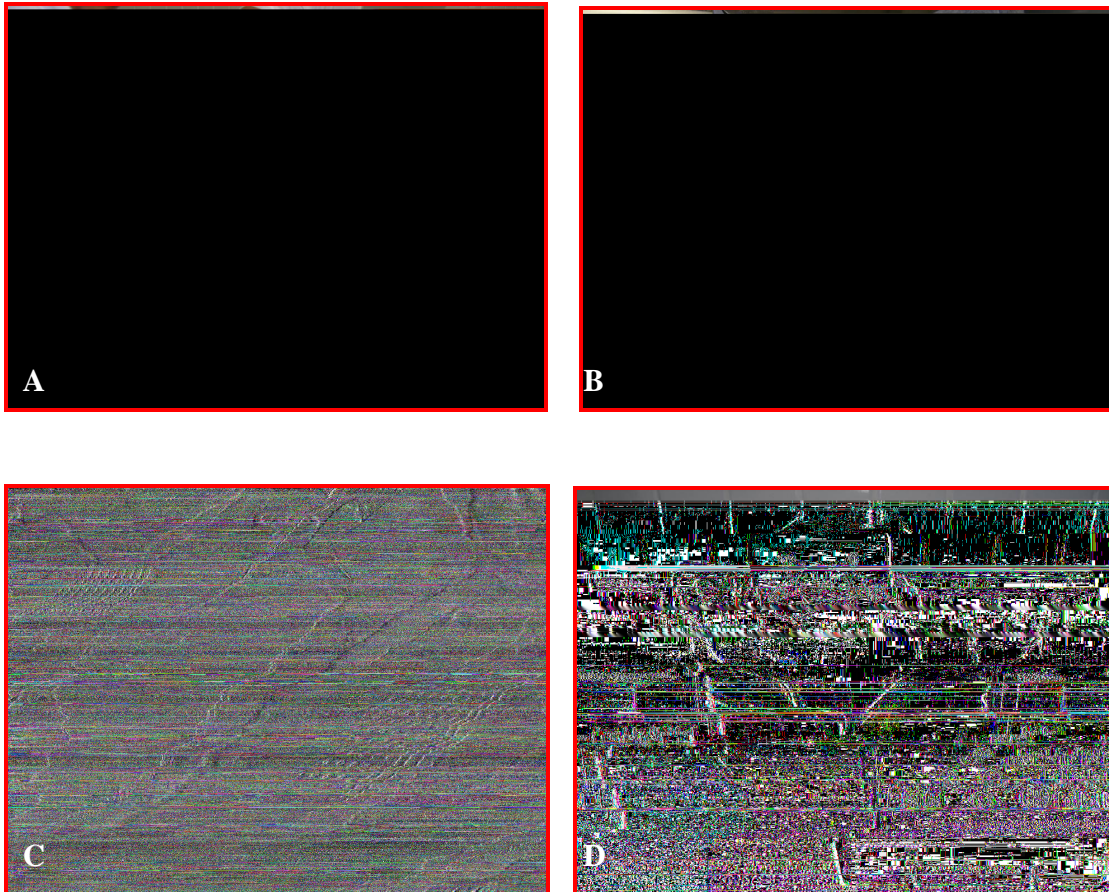


Figura 7. Extração de RNA (A), preparo do Mix para PCR (B), plotagem (C) e Termociclador (D).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)