

AValiação Seminal, Determinação da Concentração e do Perfil de Proteínas Presentes no Plasma Seminal de Duas Espécies de Veados-Cinza (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) Mantidos em Cativeiro

SEMINAL EVALUATION, DETERMINATION OF THE CONCENTRATION AND PROFILE OF PROTEINS PRESENT IN THE SEMINAL PLASMA OF TWO SPECIES OF GREY DEER (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*)

 <https://doi.org/10.63330/aurumpub.012-056>

Mareliza Possa de Menezes

Dra.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/7837286382971915>

Marina Suzuki Cursino

Dra.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/4923260848557757>

José Mauricio Barbanti Duarte

Dr.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5886610987678979>

Adriano Marques Gonçalves

Dr.

Universidade de Araraquara
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5448203595628074>

Luiz Flávio José dos Santos

Dr.

Faculdade de Tecnologia de Ribeiro Preto – São Paulo
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>

Joao Martins Pizauro Junior

Dr.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / Unesp - Jaboticabal – São Paulo
LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação seminal comparativa e caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de duas espécies de veados neotropicais, *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) e *Mazama nemorivaga* (veado-roxo), mantidos em cativeiro, considerando duas épocas distintas do ano (agosto e janeiro). Foram utilizados quatro animais adultos, dois de cada espécie, submetidos a coleta de sêmen por eletroejaculação sob anestesia geral. As amostras foram avaliadas quanto a volume, coloração, concentração espermática, motilidade, vigor e concentração de proteínas totais. O plasma seminal foi processado para análise proteica por meio do método de dosagem de proteínas totais e

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

*AValiação Seminal, Determinação da Concentração e do Perfil de Proteínas Presentes no Plasma Seminal de Duas Espécies de Veados-Cinza (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) Mantidos em Cativeiro*



eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os resultados demonstraram diferenças significativas entre as espécies, com *M. gouazoubira* apresentando maior concentração espermática, enquanto *M. nemorivaga* exibiu coloração avermelhada característica no ejaculado, confirmando ser um traço intrínseco da espécie. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas totais entre espécies ou épocas, mas a análise de correlação revelou associação positiva muito forte entre concentração espermática e motilidade, e entre proteínas totais e vigor espermático. O perfil eletroforético mostrou grande complexidade e variabilidade, com predominância de proteínas de baixa massa molecular (≤ 30 kDa) em ambas as espécies. Foram detectadas diferenças no padrão de bandas proteicas entre indivíduos e entre as épocas de coleta, indicando possíveis variações sazonais ou individuais na expressão proteica. Conclui-se que ambas as espécies apresentam características seminais distintas e um perfil proteico complexo, com implicações para sua fisiologia reprodutiva e para o desenvolvimento de técnicas de conservação e reprodução assistida.

Palavras-chave: Plasma seminal; Mazama; Proteínas seminais; Reprodução animal.

ABSTRACT

This study aimed to perform a comparative seminal evaluation and characterize the protein profile of the seminal plasma of two Neotropical deer species, *Mazama gouazoubira* (brown brocket deer) and *Mazama nemorivaga* (red brocket deer), kept in captivity during two distinct seasons of the year (August and January). Four adult animals, two of each species, were used. Semen was collected by electroejaculation under general anesthesia. Samples were evaluated for volume, color, sperm concentration, motility, vigor, and total protein concentration. Seminal plasma was processed for protein analysis using total protein assay and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results demonstrated significant differences between the species, with *M. gouazoubira* presenting higher sperm concentration, while *M. nemorivaga* exhibited a characteristic reddish coloration in the ejaculate, confirming this to be an intrinsic trait of the species. No significant differences in total protein concentration were observed between species or seasons, but correlation analysis revealed a very strong positive association between sperm concentration and motility, and between total proteins and sperm vigor. The electrophoretic profile showed great complexity and variability, with a predominance of low molecular weight proteins (≤ 30 kDa) in both species. Differences in the protein banding pattern were detected between individuals and between collection seasons, indicating possible seasonal or individual variations in protein expression. We conclude that both species have distinctive seminal characteristics and a complex protein profile, with implications for their reproductive physiology and for the development of conservation and assisted reproduction techniques.

Keywords: Seminal plasma; Mazama; Seminal proteins; Animal reproduction.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A família *Cervidae*, com 17 gêneros e 45 espécies distribuídas pelas Américas, Eurásia e norte da África (NOWAK, 1999), é representada no Brasil por três gêneros monoespecíficos – *Odocoileus virginianus* (veado-galheiro), *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro) e *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal) – e pelo gênero *Mazama*, que inclui cinco espécies: *M. nana* (veado-bororó-do-sul), *M. gouazoubira* (veado-catingueiro), *M. bororo* (veado-bororó), *M. nemorivaga* (veado-roxo) e *M. americana* (veado-mateiro) (DUARTE, 1997; ROSSI, 2000).

O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é uma espécie de pequeno a médio porte (11-25 kg) com coloração variável do cinza escuro ao marrom avermelhado (DUARTE, 1997). Suas características distintivas incluem uma pinta branca acima dos olhos e chifres não ramificados presentes apenas nos machos (DUARTE, 1996; BLACK-DÉCIMA et al., 2010). É a espécie de veado mais abundante da América do Sul, altamente adaptável a diversos habitats, incluindo áreas de agricultura (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2007).

Figura 1. Distribuição geográfica da espécie *M. gouazoubira*.



Fonte: <https://zoo.df.gov.br/veado-catingueiro/>

Sua reprodução não é sazonal, com nascimentos ocorrendo ao longo de todo o ano, assim como a troca de velame, que não segue um padrão anual definido, sendo regulada pelos níveis de testosterona e não pelo fotoperíodo (BLACK-DÉCIMA et al., 2010; DUARTE, 1997; BARROZO, 2001). São animais solitários, avistados em pares apenas em contextos específicos, como fêmeas com filhotes ou em locais com concentração de recursos alimentares.

O veado-roxo (*Mazama nemorivaga*) também é de pequeno a médio porte, pesando entre 14 e 15,5 kg. Sua pelagem dorsal é marrom-escuro, podendo ser salpicada de amarelo, e a ventral é amarelada ou esbranquiçada. A principal característica diagnóstica é a ausência de tons avermelhados, apresentando um

marrom acinzentado a castanho chocolate. Difere do *M. gouazoubira* por possuir orelhas mais pontiagudas e olhos maiores (ROSSI, 2000; ROSSI et al., 2010).

Figura 1. Distribuição geográfica da espécie *M. nemorivaga*.



Fonte: https://animalia.bio/pt/amazonian-brown-brocket#google_vignette

Como o veado catigueiro, é solitário, territorial e aparentemente ativo durante todo o dia (ROSSI et al., 2010). A reprodução também parece ocorrer durante todo o ano, sem uma sazonalidade bem definida, provavelmente devido à estabilidade de recursos na floresta tropical. Um achado único nesta espécie é a coloração avermelhada de seu ejaculado e plasma seminal (PS), uma característica não descrita em outras espécies e que, aparentemente, não altera a qualidade seminal (PERONI, 2010; CURSINO, 2012).

O plasma seminal (PS) é um fluido complexo secretado pelos testículos, epidídimos e glândulas acessórias, essencial para a proteção, nutrição e transporte dos espermatozoides (HAFEZ; HAFEZ, 2004). É composto por açúcares, lipídeos, minerais e uma grande variedade de proteínas (enzimas, hormônios, fatores de crescimento, inibidores, etc.), cuja presença ou ausência pode estar diretamente relacionada à fertilidade, afetando a morfologia, motilidade e reação acrossômica dos espermatozoides (FRAZER; BUCCI, 1996; MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

As proteínas são os constituintes orgânicos majoritários do PS e são fisiologicamente cruciais. A proteômica, o estudo do conjunto de proteínas expressas, é uma ferramenta fundamental para entender as interações entre o PS e os espermatozoides, servindo como modelo para decifrar os mecanismos moleculares da reprodução (WRIGHT et al., 2012; STRZEZEK et al., 2002, 2005; JELÍNKOVÁ et al., 2003). Técnicas como a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e bidimensional são empregadas para separar, isolar e identificar essas proteínas com base em seu peso molecular e ponto isoelétrico (ELOY; FURTADO; SILVA, 2009; PLESSIS et al., 2011).

Estudos em espécies domésticas demonstram uma forte correlação entre o perfil proteico do PS e a fertilidade. Em bovinos, proteínas como as da família BSP (BSP-A1/A2, A3, 30 kDa), osteopontina e outras



foram associadas a touros de alta ou baixa fertilidade (MOURA et al., 2007a; MOURA; CHAPMAN; KILLIAN, 2007b; KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993). Padrões semelhantes foram encontrados em equinos (HSP), caprinos (GSP) e ovinos (RSP, sendo a espermadesina a principal) (CALVETE et al., 1995, 1997; VILLEMURE; LAZURE; MANJUNATH, 2003; BERGERON et al., 2005).

Em contraste, há uma escassez significativa de estudos sobre o PS em cervídeos. Um trabalho seminal com cervo-nobre (*Cervus elaphus*) mostrou uma marcante sazonalidade reprodutiva, com a proteína total (PT) do PS variando de 23.7 g/mL na estação reprodutiva para 6.96 g/mL no período de quiescência, acompanhada de mudanças na atividade de diversas enzimas (STRZEZEK; KRZYWIŃSKI; ŚWIDOWICZ, 1985). Este estudo destaca como o perfil proteico é um reflexo do status reprodutivo.

Assim, o objetivo deste capítulo foi mostrar as diferenças entre os ejaculados de duas espécies de *Mazama* (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*), coletados em duas épocas do ano (agosto e janeiro), por meio de avaliação seminal convencional, quantificação da concentração de proteínas totais do plasma seminal e determinação do perfil proteico do plasma seminal através de técnicas eletroforéticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi conduzido com quatro animais adultos mantidos em cativeiro (quantidade máxima obtida haja vista a dificuldade de captura e manejo): dois exemplares da espécie *Mazama nemorivaga* (veado-roxo) e dois da espécie *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro). De cada animal, foram realizadas duas coletas de sêmen. A primeira coleta ocorreu em agosto de 2012 (inverno), cujo plasma seminal, originalmente processado para outro projeto de pesquisa, foi aproveitado para este estudo após centrifugação e armazenamento adequados. A segunda coleta foi realizada em janeiro de 2013 (verão). Este delineamento permitiu a comparação dos parâmetros seminais e do perfil proteico do plasma seminal entre duas épocas do ano distintas. É importante notar que as amostras de agosto não foram submetidas à avaliação de motilidade e vigor no momento da coleta.

2.2 COLETA DE SÊMEN

O protocolo de coleta seminal foi realizado mediante anestesia geral dos animais. Para isso, foi administrada uma combinação de xylazina (1 mg/kg) e cetamina (7 mg/kg) por via intramuscular. Após a contenção química, o sêmen foi coletado por meio da técnica de eletroejaculação.

Foi utilizado um eletroejaculador (P-T Eletronics®; Boring, OR; USA) acoplado a uma sonda retal especialmente confeccionada para cervídeos, com 2,0 cm de diâmetro, 28,0 cm de comprimento e contendo três eletrodos longitudinais em sua superfície, distanciados 1,5 cm entre si. Após a introdução da sonda no reto, foi aplicada uma série de estímulos elétricos crescentes, variando de 250 mA a 750 mA, com duração



média de três segundos cada e intervalos de três segundos entre eles, perfazendo um total de dez estímulos por sequência. Esta sequência foi repetida uma ou duas vezes, conforme a necessidade, até a obtenção de uma quantidade satisfatória de ejaculado.

O sêmen coletado em tubos de 2 mL foi imediatamente acondicionado em banho-maria a uma temperatura entre 32 e 34°C para evitar choque térmico até o início das avaliações subsequentes.

2.3 AVALIAÇÃO SEMINAL

Imediatamente após a coleta, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros:

- Volume: O volume total do ejaculado foi mensurado com o auxílio de uma micropipeta automática de 20µL.
- Cor: A coloração do ejaculado foi classificada visualmente por um único avaliador, visando padronizar a observação.
- Concentração Espermática: Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em 1 mL de formol salina. A concentração espermática (em espermatozoides por mL, $sptz/mL \times 10^9$) foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica.
- Motilidade: Uma alíquota de sêmen foi colocada em lâmina pré-aquecida e coberta com lamínula. A motilidade foi avaliada em microscópio óptico com aumento de 40x (Carl Zeiss®), calculando-se a porcentagem de espermatozoides com movimento retilíneo progressivo em relação ao total de espermatozoides em cinco campos distintos.
- Vigor: Na mesma lâmina utilizada para a motilidade, o vigor espermático foi classificado de acordo com a escala de 0 a 5 proposta por HAFEZ e HAFEZ (2004), onde 0 representa imobilidade total e 5 representa movimento rápido e em ondas.

2.4 PROCESSAMENTO DO PLASMA SEMINAL (PS)

Após a avaliação seminal, as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo para isolamento do plasma seminal:

Adição de 10 µL de coquetel inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich, diluído 1:10) por 1 mL de ejaculado, para prevenir a degradação proteica.

Primeira Centrifugação: O ejaculado foi centrifugado a 5000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado, contendo os espermatozoides, foi descartado.

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual



Segunda Centrifugação: O sobrenadante (plasma seminal bruto) foi submetido a uma nova centrifugação a 5000 x g por 1 hora a 4°C, para assegurar a completa remoção de quaisquer células ou debris remanescentes.

O sobrenadante final, correspondente ao PS purificado, foi dividido em alíquotas e armazenado inicialmente a -20°C. Posteriormente, foi transportado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C no Laboratório de Enzimologia Aplicada até a realização das análises bioquímicas.

2.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais no PS foi determinada pelo método de Hartree (1972), utilizando soroalbumina bovina fração V (BSA) como padrão para a construção da curva de calibração.

2.6 ELETROFORESE (SDS-PAGE)

O perfil proteico do PS foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), técnica que separa as proteínas principalmente com base em sua massa molecular.

Preparação da Amostra: Para a desnaturação proteica, 90 µL de cada amostra de PS foram misturados com 12 µL de β-mercaptoetanol (agente redutor) e 30 µL de tampão de amostra 4X (Tris-HCl 2M pH 6.8; 87% glicerol; 20% SDS; 0,002% azul de bromofenol). A mistura foi homogeneizada, aquecida em banho-maria fervente por 2 minutos, resfriada em banho de gelo e, em seguida, armazenada a -70°C até o momento da eletroforese.

Eletroforese: A separação das proteínas foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando gel de separação com concentração de 14% de poliacrilamida. Foram carregados nos poços do gel 31,075 µg de proteína total de cada amostra. A corrida eletroforética foi executada em sistema Mini VE Complete (Hoefer®) a 150V por aproximadamente 125 minutos.

Documentação e Análise: Após a corrida, os géis foram corados com prata e documentados utilizando o sistema de captura de imagens Gel Doc® XR+ (modelo Universal Hood II, BIO-RAD).

A análise das “bandas” (determinação das massas moleculares) foi realizada utilizando o software ImageLab 3.0®.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos na avaliação seminal e na dosagem de proteínas foi realizada utilizando o software R (The R Foundation for Statistical Computing). Foram aplicados os testes estatísticos t-student para comparação entre grupos (espécies e épocas do ano), cálculo do coeficiente de correlação entre as variáveis estudadas e análise de regressão linear, adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação seminal e concentração de proteína total (PT) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características seminais encontradas no ejaculado de veado-roxo (*M. nemorivaga*) e veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) nos meses de agosto de 2012 e janeiro de 2013: cor do ejaculado, volume do ejaculado, concentração espermática, motilidade, vigor e concentração de proteína total.

ID	Espécie	Animal	Período	Cor ¹	Volume (µL)	CE ² (spzx10 ⁹ /ml)	Motilidade (%)	Vigor (0 – 5)	PT ³ (mg/mL)
1.2	<i>M. nemorivaga</i>	1	Agosto/2012	A	455	0,27	-	-	19,67
2.2	<i>M. nemorivaga</i>	2	Agosto/2012	Aa	135	0,44	-	-	13,52
3.2	<i>M. gouazoubira</i>	3	Agosto/2012	B	390	3	-	-	27,43
4.2	<i>M. gouazoubira</i>	4	Agosto/2012	Ba	505	1,41	-	-	18
1.1	<i>M. nemorivaga</i>	1	Janeiro/2013	A	280	0,18	50	4	12,07
2.1	<i>M. nemorivaga</i>	2	Janeiro/2013	Aa	620	0,35	60	5	24,86
3.1	<i>M. gouazoubira</i>	3	Janeiro/2013	B	360	2,84	90	5	19,3
4.1	<i>M. gouazoubira</i>	4	Janeiro/2013	Ba	380	1,17	70	3	13,31

Nota: ¹ A = avermelhado; Aa= avermelhado aquoso; B=branco; Ba= branco aquoso; ² CE = Concentração espermática; ³ PT = Proteína total.

Fonte: Próprio autor

3.1 CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E VARIAÇÃO INDIVIDUAL

Foram observadas variações inter e intra-específicas em todos os parâmetros seminais, um fenômeno já documentado em outras espécies de cervídeos (DUARTE, 1997; ZOMBORSKY, 2005; ABREU, 2009). A cor do ejaculado diferiu consistentemente entre as espécies: *M. nemorivaga* apresentou ejaculado avermelhado ou avermelhado aquoso, enquanto *M. gouazoubira* apresentou ejaculado branco ou branco aquoso. Como os animais recebiam a mesma dieta, isso sugere que a coloração vermelha única do *M. nemorivaga* (PERONI, 2010; CURSINO, 2012) é uma característica intrínseca da espécie, não atribuível a pigmentos alimentares.

3.2 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA (CE) E AUSÊNCIA DE SAZONALIDADE

Não houve diferença significativa ($p = 0,8735$) na CE entre as épocas de coleta (agosto vs. janeiro). Este resultado corrobora a ausência de sazonalidade reprodutiva bem definida nessas espécies (BLACK-DÉCIMA et al., 2010; ROSSI et al., 2010), contrastando fortemente com cervídeos de regiões temperadas, como *Cervus elaphus*, que exibem flutuações dramáticas na CE e no volume seminal entre estações (STRZEZEK; KRZYWIŃSKI; ŚWIDOWICZ, 1985). Entretanto, a CE foi significativamente maior ($p =$



0,009403) em *M. gouazoubira* ($2,105 \pm 0,95 \times 10^9$ spz/mL) em comparação com *M. nemorivaga* ($0,31 \pm 0,11 \times 10^9$ spz/mL), como mostra a tabela 2. Esta diferença provavelmente está relacionada à produção espermática específica de cada espécie, uma vez que não foi encontrada correlação entre volume e CE (Tabela 3).

Tabela 2. Médias da concentração espermática obtidas em cada espécie \pm o desvio padrão.

Espécie	Concentração espermática (spz $\times 10^9$ /ml)
<i>M. nemorivaga</i>	$0,31 \pm 0,11^a$
<i>M. gouazoubira</i>	$2,105 \pm 0,95^b$

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si.

Fonte: Próprio autor

Tabela 3. Coeficiente de correlação encontrado entre as variáveis.

	PT ¹	CE ²	Volume	Motilidade
CE	0,4785	-	-	-
Volume	0,6163	0,0216	-	-
Motilidade	0,2311	0,9798	-0,0666	-
Vigor	0,7947	0,2533	0,4515	0,2548

¹ PT = Proteína total; ² CE = Concentração espermática.

Fonte: Próprio autor

3.3 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (PT) E CORRELAÇÕES

Não foram encontradas diferenças estatísticas na concentração de PT nem entre as espécies ($p = 0,651$; Tabela 4) nem entre as épocas de coleta ($p = 0,6029$). A variação individual observada (Figura 3) reafirma a não interferência do fotoperíodo no ciclo reprodutivo e já foi descrita em outras espécies, como touros Nelore (ASSUMPCÃO, 2005). A análise de correlação (Tabela 4) revelou relações importantes:

CE x Motilidade: Foi encontrada uma correlação positiva muito forte ($r = 0,9798$), indicando que amostras com maior concentração de espermatozoides também apresentaram maior motilidade progressiva. Este resultado difere de estudos com sêmen descongelado (LIMA et al., 2008), sugerindo que a relação pode ser afetada pelo processo de criopreservação.

PT x Vigor: A correlação positiva forte ($r = 0,7947$) entre PT e vigor demonstra que as proteínas do PS interferem diretamente na qualidade do movimento espermático, afetando sua viabilidade (MANN; LUTWAK-MANN, 1981; FRAZER; BUCCI, 1996). Em ovinos, a PT está ligada à integridade da membrana pós-congelamento (PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ; MUIÑO-BLANCO, 2001).

Volume x PT: A correlação moderada ($r = 0,6163$) sugere que o método de coleta (eletroejaculação) pode ter estimulado diferencialmente as glândulas acessórias, aumentando a secreção de fluidos e, conseqüentemente, proteínas (VASCONCELOS, 2009).

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

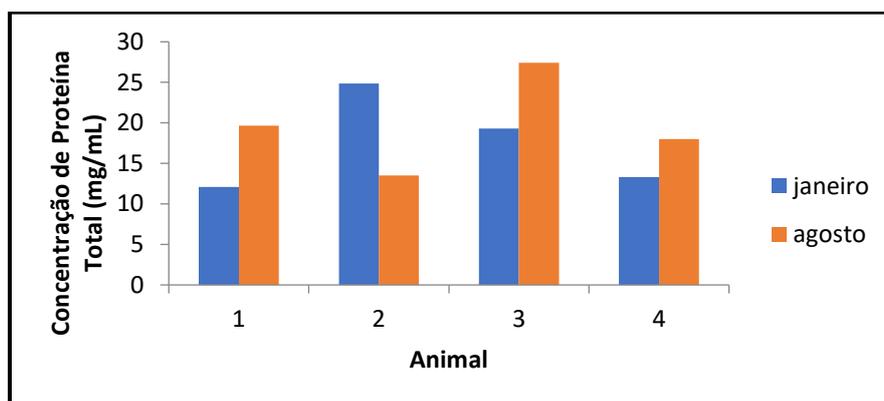
Tabela 4. Concentração de Proteína Total (PT) obtidas em cada espécie \pm o desvio padrão.

Espécies	Concentração de PT (mg/mL)
<i>M. nemorivaga</i>	17,53 \pm 5,89 ^a
<i>M. gouazoubira</i>	19,51 \pm 5,87 ^a

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si.

Fonte: Próprio autor

Figura 3. Concentração de Proteína Total obtida na amostra de cada animal nas duas coletas. *M. nemorivaga* (1 e 2) e *M. gouazoubira* (3 e 4).

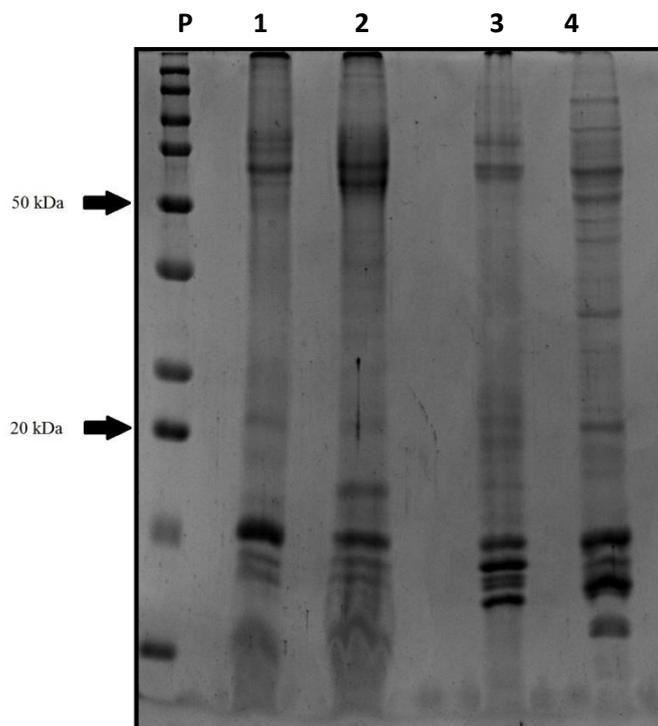


Fonte: Próprio autor

3.4 PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE: COMPLEXIDADE E VARIABILIDADE

A análise eletroforética (Figuras 4, 5, 6, e 7 e Tabelas 5, 6, 7, 8) revelou um perfil proteico complexo e variável, com diferenças entre espécies, indivíduos e épocas de coleta, um padrão também observado em outras espécies domésticas (FRAZER; BUCCI, 1996; CHACUR; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006).

Figura 4. SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de veados-cinza do mês de agosto, *M. nemorivaga* (Colunas 1 e 2: amostras 1.2 e 2.2, respectivamente) e *M. gouazoubira* (Colunas 3 e 4: amostras 3.2 e 4.2, respectivamente). Coluna P – Marcador de massamolecular Precision Plus ProteinKaleidoscope®standards. Imagem gerada pelo software ImageLab 3.0®.



Fonte: Próprio autor

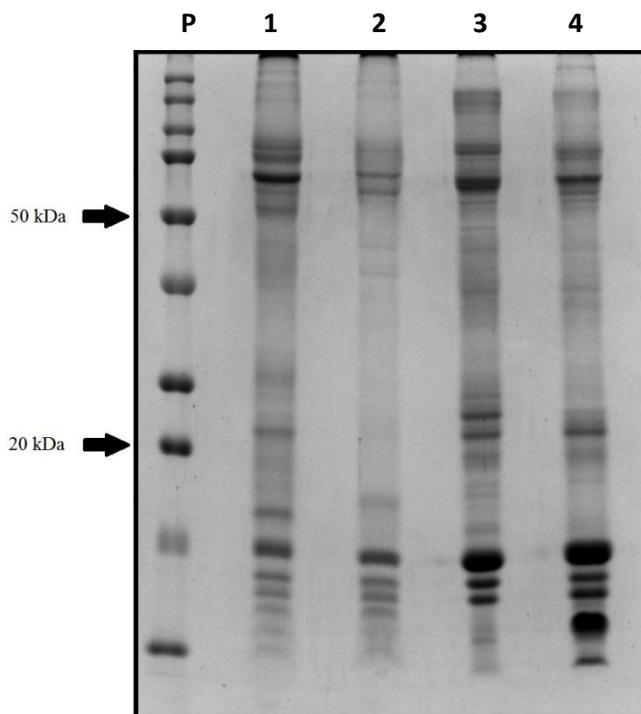


Tabela 5. Valores da massa molecular e porcentagem da banda obtidos através da análise realizada da SDS-PAGE dos animais da espécie *M. nemorivaga* (Colunas 1 e 2: amostras 1.2 e 2.2, respectivamente) e *M. gouazoubira* (Colunas 3 e 4: amostras 3.2 e 4.2, respectivamente) no mês de agosto de 2013 utilizando o software ImageLab 3.0®.

Número da Banda	Coluna 1.2		Coluna 2.2		Coluna 3.2		Coluna 4.2	
	Massa Molecular (kDa)	% da Banda						
1	96,7	3,72	135,1	2,48	95,5	6,87	118,1	2,58
2	92,6	2,67	126,6	1,58	82,7	13,85	102,4	1,59
3	83,5	8,76	84,9	23,00	23,7	1,93	95,5	1,66
4	78,2	1,63	78,2	20,50	21,3	2,94	89,9	0,90
5	23,6	2,18	61,0	0,77	17,1	2,11	82,4	7,15
6	19,7	1,20	51,8	3,25	14,5	1,82	72,0	4,79
7	13,5	42,10	23,1	3,40	12,8	15,30	64,6	1,09
8	11,8	4,17	16,7	8,79	11,4	21,01	58,5	1,90
9	10,9	6,83	13,0	17,92	10,5	13,78	53,4	0,35
10	7,8	26,73	11,6	6,21	9,6	20,39	48,1	0,84
11	-	-	10,7	4,70	-	-	43,7	0,53
12	-	-	8,1	7,40	-	-	40,2	3,52
13	-	-	-	-	-	-	33,5	1,46
14	-	-	-	-	-	-	25,0	1,45
15	-	-	-	-	-	-	22,9	4,28
16	-	-	-	-	-	-	19,9	2,85
17	-	-	-	-	-	-	18,3	1,63
18	-	-	-	-	-	-	13,0	16,61
19	-	-	-	-	-	-	11,6	5,58
20	-	-	-	-	-	-	10,4	25,22
21	-	-	-	-	-	-	8,3	14,02

Fonte: Próprio autor

Figura 5. SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de veados-cinza do mês de Janeiro, *M. nemorivaga* (Colunas 1 e 2: amostras 1.1 e 2.1, respectivamente) e *M. gouazoubira* (Colunas 3 e 4: amostras 3.1 e 4.1, respectivamente). Coluna P – Marcador de massa molecular Precision Plus ProteinKaleidoscope®standards. Imagem gerada pelo software ImageLab 3.0®.



Fonte: Próprio autor



Tabela 6. Valores da massa molecular e porcentagem da banda obtidos através da análise realizada do SDS-PAGE dos animais da espécie *M. nemorivaga* (Colunas 1 e 2: amostras 1.1 e 2.1, respectivamente) e *M. gouazoubira* (Colunas 3 e 4: amostras 3.1 e 4.1, respectivamente) no mês de Janeiro de 2014 utilizando o software ImageLab 3.0®.

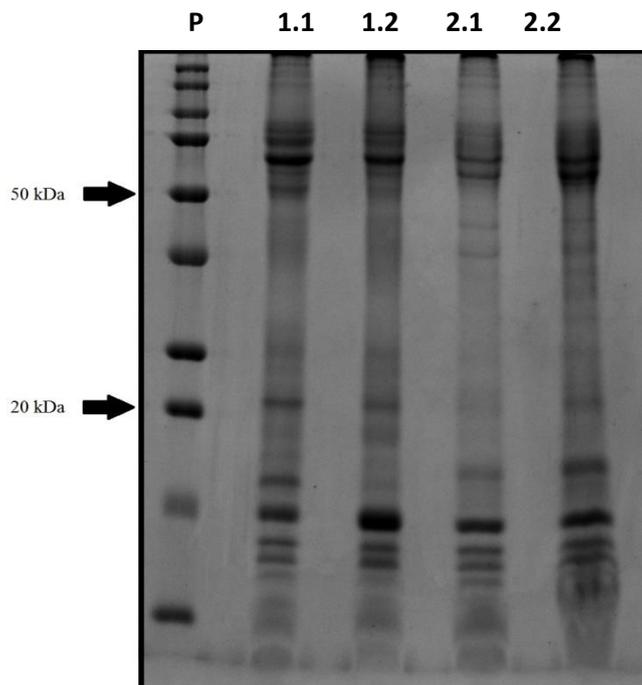
Número da Banda	Coluna 1.1		Coluna 2.1		Coluna 3.1		Coluna 4.1	
	Massa Molecular (KDa)	Banda %						
1	145,4	1,07	136,8	0,64	130,0	3,02	148,2	0,88
2	135,6	1,08	126,4	0,61	124,2	3,22	129,3	3,28
3	126,4	1,16	97,5	3,77	99,0	2,56	96,7	3,75
4	98,6	7,20	85,6	6,42	96,7	2,93	84,0	7,40
5	94,1	6,37	78,7	6,25	82,1	13,36	78,7	2,78
6	84,0	14,18	59,7	1,26	74,8	1,60	75,5	1,26
7	78,7	1,53	52,1	1,65	65,6	0,48	72,7	0,78
8	72,0	4,09	16,5	7,10	58,9	1,27	48,3	1,18
9	53,1	7,90	12,3	31,90	47,7	3,56	25,7	1,24
10	30,7	5,89	10,9	8,25	27,9	2,32	23,4	8,27
11	23,4	4,92	10,1	8,04	25,3	6,92	20,7	2,15
12	20,0	1,05	9,4	5,79	22,9	4,45	18,2	0,38
13	17,6	0,63	8,5	9,01	20,6	2,82	12,6	28,35
14	15,5	5,85	7,7	9,31	17,8	0,58	11,2	5,25
15	12,8	15,16	-	-	16,9	0,63	10,3	6,62
16	11,2	5,67	-	-	14,2	1,42	8,8	20,09
17	10,3	5,16	-	-	12,1	29,35	7,3	6,34
18	9,5	3,25	-	-	10,8	9,43	-	-
19	8,5	2,69	-	-	10,0	8,29	-	-
20	7,7	3,93	-	-	8,1	1,04	-	-
21	5,8	1,19	-	-	7,0	0,74	-	-

Fonte: Próprio autor

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

AVALIAÇÃO SEMINAL, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE DUAS ESPÉCIES DE VEADOS-CINZA (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) MANTIDOS EM CATIVEIRO

Figura 6. SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de dois veados-roxo (*M. nemorivaga*). Colunas 1.1 e 1.2: animal 1, janeiro e agosto, respectivamente; colunas 2.1 e 2.2: animal 2, janeiro e agosto, respectivamente; coluna P – Marcador de massamolecular Precision Plus Protein Kaleidoscope® standards. Imagem gerada pelo software ImageLab 3.0®.



Fonte: Próprio autor



Tabela 7. Valores da massa molecular e % da banda obtidos através da análise realizada do SDS-PAGE dos animais da espécie *M. nemorivaga* utilizando o software ImageLab 3.0®. Animal 1: colunas 1.1 e 1.2, janeiro e agosto, respectivamente. Animal 2: colunas 2.1 e 2.2, janeiro e agosto, respectivamente.

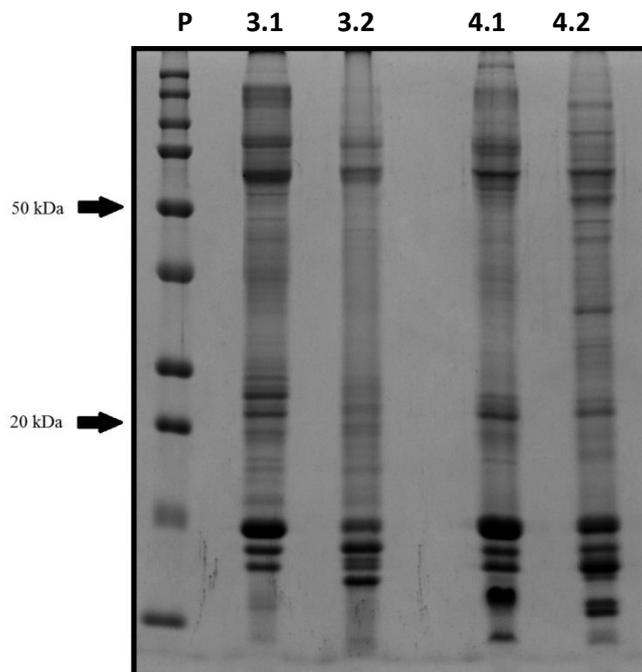
Número da Banda	Coluna 1.1		Coluna 1.2		Coluna 2.1		Coluna 2.2	
	Massa Molecular (KDa)	% da Banda						
1	138,8	1,51	96,7	3,34	135,7	2,67	131,5	2,78
2	132,1	0,56	92,1	1,74	131,5	2,27	125,2	1,52
3	124,1	0,87	83,5	8,93	124,1	1,37	83,9	23,48
4	97,6	5,66	77,7	1,80	96,3	5,00	77,4	18,20
5	91,7	3,14	22,8	5,87	83,9	9,70	60,8	0,69
6	83,5	11,64	19,3	4,03	77,1	8,22	52,3	2,24
7	78,4	1,74	12,3	42,14	59,0	1,05	23,1	1,44
8	71,4	2,99	10,7	8,36	50,7	1,51	16,5	11,45
9	52,5	9,55	10,0	10,84	22,6	3,20	12,6	18,48
10	30,6	7,59	7,4	3,18	16,0	6,82	11,0	6,76
11	23,0	3,22	5,8	9,77	12,1	22,48	10,2	4,85
12	19,8	0,48	-	-	10,6	9,24	8,6	8,11
13	17,5	0,64	-	-	9,7	5,48	-	-
14	15,3	3,61	-	-	9,0	2,96	-	-
15	12,8	14,63	-	-	7,2	9,08	-	-
16	11,1	7,40	-	-	5,9	8,97	-	-
17	10,1	3,62	-	-	-	-	-	-
18	9,3	1,80	-	-	-	-	-	-
19	8,0	2,84	-	-	-	-	-	-
20	7,3	5,61	-	-	-	-	-	-
21	5,9	10,92	-	-	-	-	-	-

Fonte: Próprio autor

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

AVALIAÇÃO SEMINAL, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE DUAS ESPÉCIES DE VEADOS-CINZA (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) MANTIDOS EM CATIVEIRO

Figura 7. SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal de dois veados-catingueiro (*M. gouazoubira*). Colunas 3.1 e 3.2: animal 3, janeiro e agosto, respectivamente; colunas 4.1 e 4.2: animal 4, janeiro e agosto, respectivamente; coluna P – Marcador de massa molecular Precision Plus ProteinKaleidoscope® standards. Imagem gerada pelo software ImageLab 3.0®.



Fonte: Próprio autor



Tabela 8. Valores de massa molecular e % da banda obtidos através da análise realizada do SDS-PAGE dos animais da espécie *M. gouazoubira* utilizando o software ImageLab 3.0®. Animal 3: colunas 3.1 e 3.2, janeiro e agosto, respectivamente. Animal 4: colunas 4.1 e 4.2, janeiro e agosto, respectivamente.

Número da Banda	Coluna 3.1		Coluna 3.2		Coluna 4.1		Coluna 4.2	
	Massa Molecular (KDa)	Banda (%)						
1	143,4	0,29	96,9	7,28	147,4	2,09	119,8	3,02
2	127,8	11,32	83,6	15,58	127,8	6,72	103,4	2,00
3	102,2	0,91	61,4	0,58	107,2	0,06	96,0	0,71
4	96,9	6,68	26,7	2,06	96,0	6,47	89,6	0,90
5	82,1	13,87	23,8	2,26	82,9	7,84	83,6	10,73
6	74,5	1,94	21,4	3,06	77,3	2,52	72,5	6,79
7	65,5	0,53	17,3	2,42	73,5	1,49	64,6	1,22
8	58,9	2,20	14,6	3,51	57,3	0,13	58,6	2,27
9	47,4	4,31	12,8	14,48	47,0	1,06	53,0	0,46
10	28,1	1,99	11,4	18,63	25,2	2,21	47,4	0,70
11	25,6	8,09	10,5	11,59	23,0	6,19	45,5	0,63
12	23,1	4,49	9,5	15,49	20,4	2,91	40,2	4,77
13	20,9	2,89	6,8	3,05	18,1	0,64	33,1	2,25
14	18,3	0,67	-	-	12,6	25,22	30,2	3,09
15	17,4	1,19	-	-	11,2	5,17	24,7	1,86
16	14,6	2,15	-	-	10,3	7,98	23,3	4,27
17	12,5	19,53	-	-	8,8	15,52	20,6	0,84
18	11,2	7,17	-	-	7,1	5,77	18,7	1,65
19	10,3	6,57	-	-	-	-	12,8	13,87
20	8,4	2,57	-	-	-	-	11,3	6,39
21	7,0	0,65	-	-	-	-	10,3	13,23
22	-	-	-	-	-	-	8,3	14,82
23	-	-	-	-	-	-	7,0	3,54

Fonte: Próprio autor

Foram detectadas entre 15 e 27 bandas proteicas por amostra, com massas moleculares variando de 5.8 a 148.2 kDa. A maioria das proteínas (média de $68,25\% \pm 11,68$) apresentou massa molecular ≤ 30 kDa (Tabela 9), um achado consistente com estudos em outras espécies, onde peptídeos de baixa massa molecular são majoritários no PS (DRUART et al., 2013).

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

AVALIAÇÃO SEMINAL, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE DUAS ESPÉCIES DE VEADOS-CINZA (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) MANTIDOS EM CATIVEIRO



Tabela 9. Médias \pm desvio padrão da porcentagem de bandas iguais ou menores que 30 kDa detectadas na SDS-PAGE em cada amostra.

Amostra	%	DP
1.1	55,08	0,46
2.1	73,82	7,91
3.1	62,98	7,11
4.1	75,15	5,01
1.2	83,70	0,69
2.2	49,76	1,89
3.2	77,92	1,93
4.2	67,60	5,72

Fonte: Próprio autor

O fato de ter sido detectada variação no perfil proteico entre as épocas de coleta para o mesmo indivíduo (Figuras 9 e 10), mesmo na ausência de sazonalidade reprodutiva, indica que mecanismos regulatórios ainda desconhecidos (possivelmente hormonais ou metabólicos) influenciam na expressão proteica do PS nessas espécies.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para as características seminais e o perfil de proteínas do plasma seminal demonstraram diferenças entre os indivíduos e as épocas de coleta para ambas as espécies, o que pode influenciar no sucesso de fertilização por monta natural ou na criopreservação do sêmen para inseminação artificial. Novos estudos são necessários para elucidar o papel das proteínas expressas em cada período a fim de se estabelecer melhores estratégias para a reprodução e conservação desses animais.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Jaboticabal pela infraestrutura cedida.

Esse estudo foi financiado, em parte, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2013/04692-4, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. O; MARTINEZ, A. C.; MORAES, W.; JUVENAL, J. C.; MOREIRA, N. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica, v. 29, n. 12, p. 993-998, Dez. 2009.

ASSUMPÇÃO, T.I.; TORRES JÚNIOR, R.A.A.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 57, n.1, p. 55-61, Feb. 2005.

BARROZO, L. A. Padrão anual endócrino, fisiológico e seminal de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814) sob condições de cativeiro. 2001. 86f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2001.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and Characterization of the Major Proteins of Ram Seminal Plasma. Molecular Reproduction and Development, Malden, v. 71, n. 4, p. 461-470, Aug. 2005.

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R.V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J.L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. & JULIÁ, J.P. Brown Brocket Deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. (Eds.). Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal: FUNEP, 2010. Cap. ?, p. 190-201.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: Effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. Biochemical Journal, Londres, v. 310, n. 2, p. 615-622, Set. 1995.

CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. FEBS Letters, v. 407, n. 2, p. 201-206, Apr. 1997.

CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. Perfil em SDS-PAGE das Proteínas do Plasma Seminal e sua Relação com a Qualidade do Sêmen de Touros da Raça Nelore (*Bostaurus indicus*). Veterinária Notícias, Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 87-93, Jun. 2006.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Anatomia dos Animais Selvagens. São Paulo: Editora Roca, 2007. 641 p.

CURSINO, M. S.; PERONI, E. F. C.; ROLA, L. D.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. Análise Comparativa Preliminar do Ejaculado de Veados – Cinza Brasileiros (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*). In: XV Congresso e XXI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2012, Florianópolis. Pôster Científico 035, p. 102-105.

DRUART, X.; RICKARD, J.P.; MACTIER, S.; KOHNKE, P.L.; KERSHAW-YOUNG, C.M.; BATHGATE, R.; GIBB, Z.; CROSSETT, B.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; GRUPEN, C.G.; GRAAF, S.P. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. Journal of Proteomics, v. 91, p. 13-22, Oct. 2013.

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

AVALIAÇÃO SEMINAL, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE DUAS ESPÉCIES DE VEADOS-CINZA (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) MANTIDOS EM CATIVEIRO



- DUARTE, J. M. B. Guia de identificação de cervídeos brasileiros. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 14 p.
- DUARTE, J. M. B. Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama*. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 238 p.
- ELOY, A. M. X.; FURTADO, J. R.; SILVA, N. M. M. Marcadores moleculares do plasma seminal de caprinos. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. 2009. 33 p.
- FRAZER, G.S. ; BUCCI, D.M. SDS-PAGE Characterization of the Proteins in Equine Seminal Plasma. *Theriogenology*, New York, v. 46, p. 579-591, Sep. 1996.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, Duluth. 1972. v. 48, n. 2, p. 422-427.
- JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, Sep. 2003. v. 32, p. 99-107.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, Pennsylvania, Dec. 1993. v.49, p. 1202-1207.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, Aug 15. 1970. v. 227, n. 5259, p. 680-685.
- LIMA, F. R. G.; ARAUJO, A. A.; SANTOS, D. O.; FACÓ, O.; CATUNDA, A. G. V.; LIMA, I. C. S.; LINARD, M. A. B. Efeito da Concentração Espermática Sobre Sêmen Congelado de Carneiros da Raça Santa Inês. In: Congresso Nordeste de Produção Animal, V, 2008, Aracajú. Anais V Congresso Nordeste de Produção Animal. 3 p.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male Reproductive Function and Semen General Features of the Seminal Plasma. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1981. p. 28-34.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, Pennsylvania, Apr. 2007a. v. 98, p. 169-188.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the Accessory Sex Glands Associated With the Oocyte-Penetrating Capacity of Cauda Epididymal Sperm From Holstein Bulls of Documented Fertility. *Molecular Reproduction and Development*, Pennsylvania, Feb. 2007b. v. 74, p. 214-222.
- NOWAK, R. M. Order Artiodactyla. In: _____. *Mammals of the world*. 6th ed. London: The Johns Hopkins University Press, 1999. v. 2, p. 1051-1238.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, Berlin, Aug. 2001. v. 56, p. 425-434.
- PERONI, E. F. C. ; SALVIANO, M. B. ; CHRISTOFOLETTI, M.D. ; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The surprisingly characteristics of the Amazonian Brown Brocket deer (*Mazama nemorivaga*) semen:

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

AVALIAÇÃO SEMINAL, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE DUAS ESPÉCIES DE VEADOS-CINZA (*MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA*) MANTIDOS EM CATIVEIRO



the red semen. In: 7th International Deer Biology Congress, 2010, HuiloHuilo. Advances and Challenges in Deer Biology. HuiloHuilo, Aug 1-6. p. 56-57.

PLESSIS, S. S.; KASHOU, A. H.; BENJAMIN, D. J.; YADAV, S. P. E AGARWAL, A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, London, Mar22. 2011. v. 9, p. 36.

ROSSI, R. V. Taxonomia de *Mazama Rafinesque*, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). 2000. p. 132. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROSSI, R.V.; BODMER, R.; DUARTE, J.M.B.; TROVATI, R.G. Amazonian Brown Brocket Deer *Mazama nemorivaga* (Cuvier 1817). In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. (Eds.). *Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer*. Jaboticabal: Funep, 2010.p. 202-210.

STRZEŻEK, J.; KRZYWIŃSKI, A.; ŚWIDOWICZ, K. Seasonal changes in the chemical composition of red deer (*Cervus elaphus*) semen. *Animal Reproduction Science*, Popielno, Oct. 1985. v. 9, p. 195-204.

STRZEŻEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P.; TYSZKIEWICZ, A.; JASTRZEBSKI, M. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Animal Science Papers and Reports*, Wolka Kosowska. 2002.v. 20, n. 4, p. 255-266.

STRZEŻEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology*, Olsztyn, Oct. 2005.v. 5, n. 3, p. 279-290.

VASCONCELOS, A. B. Bioquímica do Sêmen. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, Belo Horizonte, Dez. 2009. n. 6, p. 32-35.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, London, Apr 28. 2003. v. 1, p. 39.

WRIGHT, P. C.; NOIREL, J.; OW, S. Y.; FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology*, New York, Mar 1. 2012. v. 77, p. 739-765.

ZOMBORSZKY, Z.; NAGY, S.; NÁNÁSSY, L.; SZABARI, M.; BODÓ, S. Experiences in deer sperm cryopreservation under practical conditions: A pilot study. *Animal Reproduction Science*, Philadelphia, Nov. 2005. v.90, n. 1, p. 185-190.

Contribuições Multidisciplinares Para o Conhecimento Atual

AVALIAÇÃO SEMINAL, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DO PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE DUAS ESPÉCIES DE VEADOS-CINZA (MAZAMAGOUAZOUBIRAE M. NEMORIVAGA) MANTIDOS EM CATIVEIRO