



Identificação de proteínas do plasma seminal de touros da raça Gir

Identification of seminal plasma proteins in Gir bulls

I.M. Folhadella^{1,8}, T.S. Castro², D.F. Salvador³, W.F. Sá⁴, A.M. Ferreira⁴, A.A. Ramos¹, J. Polisseni⁵,
R.V. Serapião⁴, L.A. Camargo⁴, V.J. Andrade⁶, M.M. Santoro², J.S. Oliveira²,
L.H. Rodrigues⁷, V.R. Vale Filho⁶

¹Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³CEDERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁵Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁶Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

⁷Central Lagoa da Serra, Sertãozinho, SP, Brasil.

⁸Correspondência: isabellafohadella@fiocruz.br

Resumo

Estudou-se o perfil de proteínas totais (PLB) e proteínas ligadoras de heparina (PLH) do plasma seminal de touros da raça Gir e suas associações com parâmetros andrológicos e fertilidade *in vitro*. A concentração da PLB variou de 4,1 a 167,9 mg/mL e da PLH entre 0,02096 e 0,19025 (%). O perfil cromatográfico apresentou nove picos de afinidade para PLB e cinco picos para PLH. As associações significativas foram: PLB x taxa de blastocistos, PLH do pico 1 x taxa de blastocistos, PLH do pico 5 x taxa de clivagem e blastocistos. Nenhuma proteína estudada apresentou associação com parâmetros andrológicos.

Palavras-chave: *Bos indicus indicus*, fertilização *in vitro*, parâmetros andrológicos, proteínas.

Abstract

It was studied the seminal plasma total protein (TP) and heparin binding protein (PLH) profiles of Gir bulls and their associations with andrological parameters and in vitro fertility. Total protein concentration varied between 4,1 a 167,9 mg/ml and heparin binding protein 0,02096 to 0,19025 (%). Chromatographic profile of TP presented nine peaks. PLH presented five affinity peaks. Associations were for: total proteins x blastocysts rate, peak 1 heparin binding proteins x blastocysts rate, peak 5 heparin binding protein x cleavage rate and blastocysts rate. However no protein showed association with andrological parameters.

Keywords: *andrological parameters, Bos indicus indicus, in vitro fertilization, proteins.*

Introdução

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo (180 milhões de animais; Anualpec, 2002), sendo a maioria de *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos, o que representa 80% ou mais do efetivo nacional. A raça Gir é importante neste contexto, por ser uma das principais raças zebuínas exploradas para leite e muito utilizadas em cruzamentos com os animais europeus.

A subfertilidade de touros representa um impacto econômico negativo nas indústrias de gado de leite e corte. Touros que apresentam exame andrológico normal têm perfis de fertilidade diferenciados, fato que pode estar relacionado com os diferentes componentes químicos do sêmen. Com isso, surge a necessidade de buscar marcadores bioquímicos para essas diferenças.

Sabe-se que o plasma seminal contém substâncias que afetam a função espermática e modificam o potencial fertilizante dos espermatozoides. Alguns pesquisadores relataram uma alta correlação entre perfil proteico do plasma seminal e fertilidade de touros, em raças europeias (Gerena et al., 1998; Killian et al., 1999; Chacur et al., 2003). Proteínas presentes no plasma seminal, denominadas proteínas ligadoras de heparina (PLHs), modulam eventos de ligação da heparina à membrana espermática e servem como marcadores moleculares para diferentes mecanismos de fertilização.

Nas décadas de 1950 e 1960 (Larson e Salisbury, 1954), a técnica de eletroforese começou a ser utilizada para mapear e identificar os componentes proteicos do ejaculado. Pela eletroforese unidimensional, o perfil proteico do plasma seminal de touros foi correlacionado com padrões de fertilidade normais e alterados, com a congelabilidade e com a viabilidade do sêmen, entre outros. Posteriormente, a técnica de cromatografia líquida de rápida *performance* (FPLC) passou a ser usada antes da realização da eletroforese, para as proteínas que fossem separadas mais especificamente, considerando a massa molecular e o grau de afinidade às colunas de



heparina (Salvador, 2005).

A utilização das técnicas de cromatografia e eletroforese é de grande valia, pois permite a separação de proteínas específicas, como as que apresentam associação com os processos de capacitação tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Entretanto, apesar de os estudos das proteínas seminais estarem sendo amplamente realizados em várias espécies animais, com grande ênfase para a espécie bovina, muitas dessas proteínas ainda não apresentam suas funções definidas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar as proteínas totais e proteínas ligadoras de heparina do sêmen, associá-las com a fertilidade *in vitro* e com os parâmetros andrológicos em touros da raça Gir.

Material e Métodos

Local de execução do estudo

O presente trabalho foi realizado em fazendas do estado de Minas Gerais, no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa/Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, e no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Belo Horizonte, MG.

Seleção dos touros e coleta das amostras

Touros jovens da raça Gir foram avaliados segundo o Manual para exame andrológico do CBRA (Manual..., 1998) e classificados de acordo com a Classificação Andrológica por Pontos (CAP), modificada em: satisfatório, questionável e insatisfatório.

Desses animais, 15, com circunferência escrota ≥ 30 cm, e classificados como satisfatórios ou questionáveis, foram selecionados para a avaliação das proteínas do sêmen. Inicialmente, alíquotas dos ejaculados de três touros foram congeladas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C), em triplicata, para avaliação do perfil proteico, a fim de verificar-se a repetibilidade do perfil de proteínas seminais em diferentes coletas. Como não houve variação, os demais touros foram submetidos somente a uma coleta e a um congelamento de alíquotas para avaliação das proteínas.

Dos 15 touros avaliados para proteínas, 12 foram usados no estudo de associação com as características andrológicas, pois um apresentou hipoplasia testicular e dois tiveram seus dados de exame andrológico perdidos. E cinco desses, com perfil andrológico satisfatório e boa congelabilidade do sêmen (motilidade espermática pós-descongelamento satisfatória), foram utilizados para a avaliação da fertilidade *in vitro* em três repetições.

Purificação, isolamento e quantificação das proteínas ligadoras da heparina

Avaliação das proteínas do plasma seminal

A alíquota foi descongelada e diluída na solução tampão (ST), após o que foi centrifugada a 1200 g a 4°C para a separação do plasma seminal e dos espermatozoides.

As amostras do plasma seminal foram submetidas à cromatografia em coluna de Superose 12 por gel filtração (HR 10/30 Pharmacia LKB Biotechnology n°17-053801). As proteínas com massa molecular de até 100 KDa foram retiradas. A eluição das proteínas foi determinada pela leitura da absorbância no comprimento de onda de 280 nm.

As proteínas detectadas entre o tempo de retenção de 25 a 31 min, identificado como pico três, as quais correspondem às proteínas ligadoras de heparina (Salvador, 2005), foram homogeneizadas e aplicadas em coluna de afinidade à heparina (Sigma – Hi-Trap™ Heparin HP) para localização dos *pools* de proteínas de interesse específico.

Após a lavagem do *pool* de proteínas do terceiro pico, os picos cromatográficos correspondentes ao grau de afinidade à heparina foram identificados.

Após passagem pela coluna de afinidade, as concentrações de proteínas totais, do pico 3 e de cada pico de afinidade, foram determinadas pelo método de Lowry (1951).

As proteínas com afinidade à heparina foram separadas em um gel SDS-poliacrilamida unidimensional, com 12,5% de poliacrilamida, para identificação das massas moleculares pelo programa TotalLab 100. Foram então anotadas as massas moleculares das diferentes proteínas para cada animal.

Avaliação da fertilidade in vitro

Fertilização in vitro

Ovócitos recuperados a partir de ovários coletados de fêmeas bovinas abatidas em matadouro foram

selecionados e maturados *in vitro* em meio TCM-199 (Gibco), acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20 µg/mL de FSH, por 24 h (Ramos, 2004). Após a maturação, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen descongelado dos animais selecionados. Para separação de espermatozoides vivos e mortos, foi utilizado o método de *swim up*. A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µL de meio Fert-Talp acrescido de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática média de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL, por um período aproximado de 22 h (Parrish et al., 1986).

Os prováveis zigotos foram cultivados em meio CR2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), juntamente com suas células do *cumulus*, em gotas de 50 µL cobertas com óleo mineral. O meio foi renovado pela metade 48 h após o início do cultivo. Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora a 38,8°C, 95% de umidade e 5% de CO₂.

As taxas de clivagem foram avaliadas 72 h pós-fecundação e as de blastocistos, com 168 a 192 h (Kennedy et al., 1983).

Análise estatística

Neste experimento, foram analisadas: as proteínas totais, proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração, as proteínas ligadoras da heparina do sêmen, a taxa de clivagem e de blastocistos e a Classificação Andrológica por Pontos (CAP) dos touros previamente examinados.

Por ser um estudo relativamente novo e não haver dados de touros da raça Gir, a análise estatística entre as proteínas e os resultados *in vitro* foram feitos pela regressão linear simples, utilizando-se o programa estatístico SAS, 2002, e entre as proteínas e os parâmetros *in vivo* por Correlação de Pearson.

Resultados e Discussão

Perfil cromatográfico por gel filtração de proteínas do plasma seminal

O perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal apresentou nove picos, os oito apresentados no Nelore (Salvador, 2005) e mais um nono (contendo peptídeos; Fig.1). Esses resultados foram semelhantes aos descritos por Mann e Mann (1981), que encontraram proteínas distribuídas em 4 a 10 frações distintas para touros.

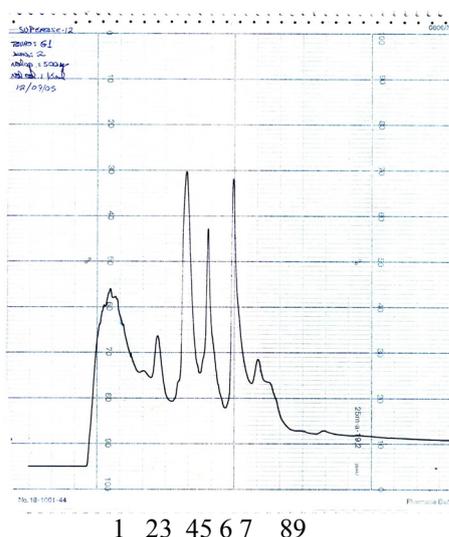


Figura 1. Perfil cromatográfico de frações de proteínas do plasma seminal de touro Gir por gel filtração em coluna de Superose 12.

Dos nove picos identificados, os oito primeiros picos estiveram sempre presentes, e o nono apareceu em 86% das vezes. Apesar da semelhança dos picos nos perfis cromatográficos, a comparação das respectivas áreas de um mesmo pico entre touros apresentou grande variabilidade e alto desvio-padrão (Tab. 1).

Observa-se, como no Nelore (Salvador, 2005), que as maiores médias de áreas foram registradas nos picos 1 e 4, mas, devido aos grandes desvios-padrão, esses picos não podem ser considerados a representação da maior parte de proteínas do plasma seminal, sendo mais correto considerar a maior parte entre as seis primeiras frações.



Tabela 1. Valores mínimos, máximos e médios das áreas dos nove picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros jovens da raça Gir, e suas respectivas frequências.

| Frações | Área (%) e frequência das frações cromatográficas | | | | |
|---------|---|--------|-------|---------------|------------------|
| | Mínimo | Máximo | Média | Desvio-padrão | Frequência N (%) |
| 1 | 9,33 | 35,60 | 18,41 | 6,87 | 15 (100%) |
| 2 | 8,26 | 19,94 | 14,47 | 3,03 | 15 (100%) |
| 3 | 5,53 | 19,58 | 14,83 | 3,74 | 15 (100%) |
| 4 | 16,44 | 32,59 | 21,22 | 5,51 | 15 (100%) |
| 5 | 3,20 | 23,15 | 9,48 | 6,32 | 15 (100%) |
| 6 | 3,61 | 27,85 | 11,31 | 6,59 | 15 (100%) |
| 7 | 0,74 | 4,79 | 3,44 | 1,23 | 15 (100%) |
| 8 | 0,16 | 6,37 | 3,16 | 1,97 | 15 (100%) |
| 9 | 0,42 | 2,68 | 1,39 | 0,83 | 13 (86%) |

Concentração de proteínas totais e proteínas do pico 3

As concentrações de proteínas totais no plasma seminal variaram de 4,1 a 167,9 mg/mL, com média de $47 \pm 48,3$ mg/mL, com grande variabilidade entre os touros, assim como observado em touros Nelore (Assunção et al., 2003; Salvador, 2005). Entretanto, diferiram das médias encontradas por Jobim et al. (2003), de $77,97 \pm 15,82$ mg/mL para touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*. A área média do terceiro pico de proteínas, onde são encontradas as proteínas ligadoras de heparina, foi de $14,83 \pm 3,74$ cm², o que corresponde a 15,2% do total de proteínas do plasma seminal, corroborando os valores encontrados em touros Nelore (Salvador, 2005), de 8 a 10%.

Perfil cromatográfico de proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina

Do *pool* do terceiro pico de proteínas totais do plasma seminal, foram identificados cinco picos cromatográficos diferentes de acordo com a afinidade à heparina, semelhante ao observado em touros Nelore (Salvador, 2005). Bellin et al. (1994) também encontraram resultados semelhantes no plasma seminal de touros europeus.

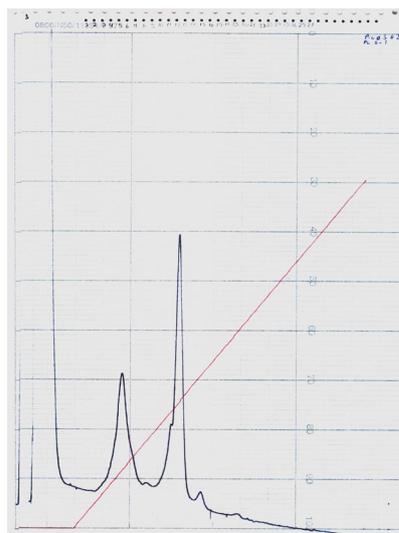
As proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal de touros Gir representaram 13% do total de proteínas avaliadas no pico 3, e 0,5% do total de proteínas, fato também descrito em bubalinos (Arangasamy et al., 2005).

Os graus de afinidade, em função das concentrações de NaCl, e a frequência dos picos são apresentados na Tab. 2 e na Fig. 2. Observa-se que todos os 15 touros apresentaram os três primeiros picos de afinidade à heparina, e 87,5% dos animais apresentaram os picos 4 e 5. Provavelmente, nesse animal (12,5%) que não apresentou esses dois picos, as proteínas apresentavam-se aderidas à membrana espermática e não no plasma seminal, como estudado. Resultados relatados para touros Nelore (Salvador, 2005) demonstram os três primeiros picos em 81% dos animais e os picos 4 e 5 em 38 e 19%, respectivamente. Essa diferença pode ser explicada, em parte, pela maior seleção reprodutiva e produtiva a que são submetidos os touros Nelore. Além disso, por muito tempo, os cruzamentos utilizados entre animais da raça Gir favoreceram a ocorrência de consanguinidade, o que também pode ter influenciado o perfil proteico do plasma seminal dos animais dessa raça.

Tabela 2. Descrição dos picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade à heparina, em função das concentrações de NaCl necessárias para eluir as proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal de touros Gir.

| Picos | Grau de afinidade* | Frequência do pico |
|-------|--------------------|--------------------|
| 1 | 10% (NaCl 0,150 M) | 15 (100) |
| 2 | 13% (NaCl 0,195 M) | 15 (100) |
| 3 | 23% (NaCl 0,345 M) | 15(100) |
| 4 | 29% (NaCl 0,435 M) | 14 (87,5) |
| 5 | 33% (NaCl 0,495 M) | 14 (87,5) |

Concentração de NaCl necessária para a eluição das proteínas. Obs.: Um touro em triplicata não apresentou o pico 1, e outro não apresentou os picos 4 e 5 em duas amostras. Esses dados não foram contabilizados na frequência por se tratar do mesmo animal. A frequência foi analisada conforme o aparecimento de bandas no gel, principalmente devido ao fato de o pico 5 normalmente aparecer abaixo da linha de base no cromatograma. Quanto maior a % de NaCl, maior a afinidade de proteínas à coluna de heparina.



Gradiente de NaCl 1,5M

Figura 2. Perfil cromatográfico de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal.

As médias das concentrações dos cinco picos variaram de 0,02096 a 0,19025%, com o terceiro pico de afinidade contendo a maior parte das proteínas ligadoras de heparina (Tab. 3). O pico de maior afinidade à heparina (5) correspondeu a apenas 4,2% do total de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal, semelhante aos 6% delas encontrados por Miller et al. (1990) no fluido de touros vasectomizados. Em um estudo realizado com touros Red Angus, Gelbvieh, Santa Gertrudes e Gelbvieh x Santa Gertrudes, este mesmo pico correspondeu a 30% das proteínas ligadoras de heparina (Bellin et al., 1994).

Tabela 3. Médias e desvios-padrão das concentrações das proteínas de plasma seminal (PPS) nos cinco picos de afinidade à heparina identificados e suas frequências (%).

| Pico | Mín. | Max. | Média | Desvio-Padrão |
|------|---------|---------|---------|---------------|
| 1 | 0,00087 | 0,33080 | 0,06653 | + - 0,10624 |
| 2 | 0,00511 | 0,73083 | 0,16948 | + - 0, 23035 |
| 3 | 0,00508 | 0,53794 | 0,19025 | + - 0,19188 |
| 4 | 0,00000 | 0,12698 | 0,04616 | + - 0,04878 |
| 5 | 0,00000 | 0,07240 | 0,02096 | + - 0,02270 |

Perfil eletroforético de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal

Na Tab. 4 e na Fig. 3, observam-se as massas moleculares (obtidas por comparação com o padrão sigma, pelo programa Totallab 100) das proteínas mais frequentes nos respectivos picos.

Nos cinco picos de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal, foram encontradas 18 bandas de proteínas com massas moleculares diferentes, semelhante ao encontrado por Arangasamy et al. (2005) no plasma seminal de bubalinos.

Tabela 4. Estimativa das massas (pesos) moleculares em eletroforese das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal.

| Picos | Estimativa PM (KDa) |
|-------|---|
| 1 | 13 (forte), 14 (forte), 17, 18 (forte), 22, 24, 28 (forte), 30, 32 e 38 |
| 2 | 13, 14 (forte), 18 (forte), 20 (forte) 22, 24, 28, 34, 37 |
| 3 | 13, 16 (forte), 17, 18 (forte), 20 (muito forte), 24, 30 (forte), 38, 50 e 56 |
| 4 | 15, 16, 18, 29, 30, 50 e 56 |
| 5 | 17, 29 (forte), 56 |

Dessas 18 bandas das proteínas localizadas no gel de eletroforese, as mais fortes, ou seja, proteínas que apresentaram maior concentração em seus respectivos picos, foram as de massa molecular 13, 14, 16, 18, 20, 28, 29 e 30 KDa. O pico 5, de maior afinidade à heparina, apresentou as bandas 17, 29 e 56 KDa, semelhante às bandas de 14-18 KDa encontradas por Bellin et al. (1994) e às 14-20, 24 e 30 KDa encontradas por Miller et al. (1990).

De acordo com os dados encontrados na literatura, a proteína de 14-16 KDa pode consistir na PDC-109, proteína ligadora de fucose, também denominada BSP A1/A2 (Gwathmey et al., 2003). A proteína de 29-30

KDa pode ser uma FAA (Fertility Associated Antigen), identificada em touros Holandeses de maior fertilidade (Bellin et al., 1994) e também observada em touros Nelore (Salvador, 2005). Outras proteínas encontradas neste estudo, e que não apresentaram bandas tão fortes, foram as proteínas de massa molecular 24 e 56 KDa, descritas na literatura como a proteína HPB-24. Esta proteína provavelmente é uma TIMP-2 (proteína inibidora das metaloproteinases 2 dos tecidos), responsável por processos fisiológicos associados com a ovulação, fertilização (Edwards et al., 1996) e produção de progesterona pelas células esteroidogênicas (Boujrad et al., 1995).

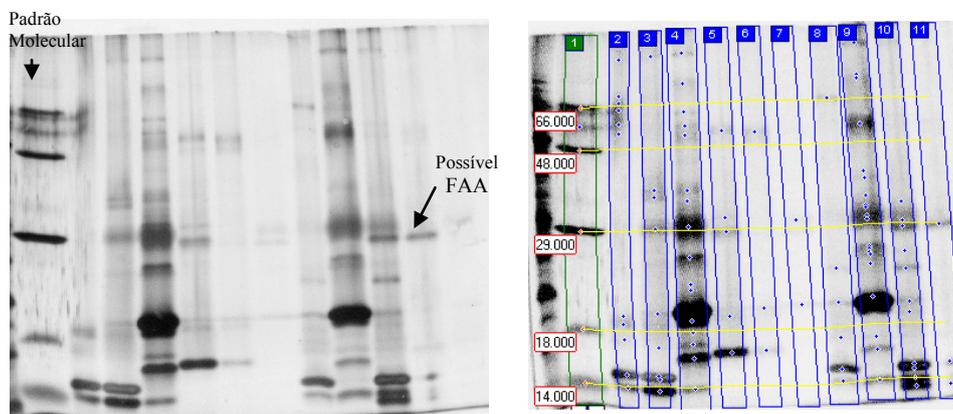


Figura 3. Fotos do gel de poliacrilamida a 12,5%, com aplicação de PPS com afinidade à heparina dos cinco picos cromatográficos e sua imagem sendo analisada no programa TotalLab 100.

Estudo de associação entre as proteínas totais, proteínas do pico 3 e proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e parâmetros andrológicos

Como descrito na Tab. 5, nenhum dos parâmetros andrológicos estudados apresentou correlação ($P < 0,05$) com proteínas totais, proteínas do pico 3 e proteínas ligadoras de heparina.

Os resultados observados corroboram os obtidos por Salvador (2005) para touros Nelore, em que as características proteínas totais x circunferência escrotal apresentaram associações não significativas.

Da mesma forma, não houve correlação entre a avaliação física dos espermatozoides, a circunferência escrotal e o perfil da proteína ligadora de heparina FAA-30 KDa (Bellin et al., 1998).

Tal fato pode ocorrer em razão de o perfil de proteínas totais não estar somente relacionado com proteínas produzidas pelas glândulas sexuais acessórias, mas também com proteínas de origem testicular e epididimária (Dacheux e Dacheux, 2002).

Tabela 5. Correlação simples e grau de significância entre as proteínas totais, proteínas do pico 3, proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e parâmetros andrológicos (n = 12; $P < 0,05$).

| | PLB | P3 | P1A | P2A | P3A | P4A | P5A |
|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| CE | -0.16901 P = 0.5995 | -0.04669 P = 0.8854 | 0.06983 P = 0.8293 | -0.11774 P = 0.7155 | -0.06771 P = 0.8344 | -0.07123 P = 0.8259 | -0.17988 P = 0.5759 |
| MOT | -0.29511 P = 0.3517 | 0.01220 P = 0.9700 | -0.13901 P = 0.6666 | -0.09527 P = 0.7684 | -0.10175 P = 0.7530 | 0.13948 P = 0.6655 | -0.20779 P = 0.5170 |
| VIG | -0.45776 P = 0.1345 | -0.28162 P = 0.3752 | 0.24711 P = 0.4387 | -0.17484 P = 0.5868 | -0.22465 P = 0.4827 | -0.00854 P = 0.9790 | -0.06339 P = 0.8448 |
| D. MA | 0.08983 P = 0.7813 | 0.08306 P = 0.7975 | 0.50244 P = 0.0960 | -0.04201 P = 0.8969 | 0.22720 P = 0.4776 | -0.21577 P = 0.5006 | 0.10027 P = 0.7565 |
| D.TOT | 0.08651 P = 0.7892 | 0.28742 P = 0.3650 | 0.20254 P = 0.5278 | 0.27000 P = 0.3960 | 0.23652 P = 0.4592 | -0.06565 P = 0.8394 | 0.10398 P = 0.7478 |
| CAP | -0.35517 P = 0.2572 | -0.35878 P = 0.2521 | -0.06351 P = 0.8445 | 0.04051 P = 0.9005 | -0.41847 P = 0.1758 | -0.17857 P = 0.5787 | -0.32802 P = 0.2979 |

PLB- proteínas totais; P3- proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração; P1A, P2A, P3A, P4A e P5A são os picos das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal; CE- circunferência escrotal; MOT- motilidade; VIG- vigor; D.MA- defeitos maiores; D.TOT- defeitos totais; CAP- Classificação Andrológica por Pontos.

*Estudo de associação entre as proteínas totais, proteínas do pico 3, proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e fertilidade in vitro*

As maiores associações foram observadas entre as proteínas totais (PLB) x taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 1 (P1A) x taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) x taxa de clivagem e proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) x taxa de blastocistos, como evidenciado na Tab. 6. Pode-se ainda observar que todas as variáveis estudadas apresentaram alta magnitude de associação (>0,66).

Tabela 6. Regressão linear simples e grau de significância entre as proteínas totais, proteínas do pico 3, proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e fertilidade *in vitro* (n = 5).

| | TxCliv | TxBlast |
|-----|----------------------|----------------------|
| PLB | 0,5750 P = 0,1374 | 0,8544 P = 0,0247 |
| P3 | 0,2559 P = 0,3845 | 0,2603 P = 0,3798 |
| P1A | 0,6408 P = 0,1037 | 0,9225 P = 0,0094 |
| P2A | 0,3075 P = 0,3320 | 0,0645 P = 0,6803 |
| P3A | 0,3824 P = 0,2662 | 0,5308 P = 0,1626 |
| P4A | 0,0784 P = 0,6483 | 0,2445 P = 0,3971 |
| P5A | 0,8829 P = 0,0177 | 0,9624 P = 0,0005 |

PLB- proteínas totais; P3- proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração; P1A, P2A, P3A, P4A e P5A são os picos das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal; Tx Cliv.taxa de clivagem; Tx Blast.- taxa de blastocistos.

Este estudo também demonstrou que a afinidade, e não somente a presença da proteína ligadora de heparina na membrana, está relacionada com o fato de o potencial do espermatozoide ser capacitado, sofrer reação acrossômica e, conseqüentemente, fertilizar oócitos (Bellin et al., 1994), visto que o pico 5, que é o de maior afinidade, foi o que resultou em maiores taxas de clivagem e produção de blastocistos.

Quando *in vivo*, as taxas de gestação à primeira inseminação artificial foram de 2,8 a 69,6% entre fêmeas inseminadas por touros negativos para a proteína de 30 KDa (FAA) e 22,1-91,3% entre fêmeas inseminadas por touros positivos para essa mesma proteína (Sprott et al., 2000). No presente estudo, essa proteína (29-30 KDa) esteve presente, entre outros, nos picos 1 e 5 de afinidade à heparina do plasma seminal, o que sugere que a sua presença pode estar relacionada às altas taxas de produção de blastocistos. O pico 5 apresentou ainda grande associação com as taxas de clivagem. As bandas encontradas nesse pico, além da de 29 KDa, foram as de 17 e 56 KDa. Pode ser que esta proteína de 56 KDa seja a mesma osteopontina relacionada à alta fertilidade em touros Holandeses (Killian et al., 1993).

Conclusões

Apesar da ausência de correlação das proteínas com os testes de avaliação de fertilidade *in vivo*, essa avaliação não deve ser descartada. Provavelmente essas proteínas têm funções relacionadas ao potencial fertilizante dos espermatozoides, mas não estão correlacionadas com padrões clínicos.

Os riscos de baixas taxas de clivagem e blastocistos podem ser reduzidos usando na fertilização *in vitro* touros que se apresentarem positivos para proteínas ligadoras de heparina e proteínas totais.

O entendimento da composição de proteínas do sêmen pode ser diretamente aplicável às condições de laboratório e resultar em maior eficiência na produção de bezerros. No futuro, esse conhecimento pode gerar algumas tecnologias, como sequenciamento dessas proteínas ou até mesmo o desenvolvimento de *kits* para diagnóstico delas.



Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida; à FAPEMIG, pelo financiamento do presente projeto; ao Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite e ao Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas do ICB/UFMG, pela utilização de suas instalações e equipamentos; às centrais de congelamento de sêmen Lagoa da Serra e Pecplan, pelo apoio oferecido.

Referências

- Anualpec.** Disponível em: <www.fnp.com.br/fnp/anualpecmain.htm>, 2002. Acesso em: fevereiro de 2002.
- Arangasamy A, Singh LP, Ahmed N, Ansari MR, Ram GC.** Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.90, p.243-254, 2005.
- Assunção TI, Fontes W, Souza MV, Ricart CAO.** Perfil de proteínas do plasma seminal de touros Nelore e sua relação com a fertilidade. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.187-188, 2003.
- Bellin ME, Hawkins HE, Ax RL.** Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci*, v.72, p.2441-2448, 1994.
- Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL.** Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci*, v.76, p.2032-2039, 1998.
- Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier, M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V.** Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science*, v.268, p.1609-1612, 1995.
- Chacur MGM, Rabesquine MM, Parra JAG, Machado Neto NB.** Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal, correlação com o quadro espermático. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.185-186, 2003.
- Dacheux JL, Dacheux F.** Protein secretion in the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT (Ed.). *The epididymis: from molecules in clinical practice*. New York, NY: KluwerAcademic/Plenum Publishers, 2002. p.151-168.
- Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, Lim MS.** The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.20, p.S9-S15, 1996.
- Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ.** Identification of a fertility-associated protein in bulls seminal plasma as lipocalin type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod*, v.58, p.826-833, 1998.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS.** PDC-109 (BSP-A1/A2) Promotes Bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, v.69, p.809-815, 2003.
- Jobim MIM, Oberst ER.; Salbego CG, Souza DO, Gomes, Wald VB, Mattos RC.** Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Sci Vet*, v.31, p.21-30, 2003.
- Kennedy CG, Boland MP, Gordon I.** The effects of embryo quality of freezing on subsequent development of thawed low embryo. *Theriogenology*, v.19, p.823-832, 1983.
- Killian GJ, Chapman DA, Cancel AM, Gerena RL, Rodriguez CM, Day JR.** Male factors affecting sperm fertility. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.83-85, 1999.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- Larson BL, Salisbury GW.** The proteins of bovine seminal plasma. Preliminary and electrophoretic studies. *J Biol Chem*, v.206, p.741-749, 1954.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Fars AL, Randel RJ.** Proteins measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, p.265-275, 1951.
- Mann T, Mann CL.** Male reproductive function and semen. New York: Springer-Verlag, 1981.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte, MG: CBRA, 1998.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, v.42, p.899-915, 1990.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL.** Bovine in vitro fertilization with frozenthawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- Ramos AA.** Produção *in vitro* de embriões após punção folicular em vacas Gir submetidas à estimulação hormonal. 2004. 79f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2004.
- Salvador DF.** Perfis cromatográfico e eletroforético de proteínas com afinidade à heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelamento do sêmen e reação acrossômica induzida. 2005. 56f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2005.
- Sprott LR, Harris MD, Forrest DW, Young J, Zhang HM, Oyarzo JN, Bellin ME, Ax RL.** Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. *J Anim Sci*, v.78, p.795-798, 2000.