

## Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir

### SDS-PAGE seminal plasma proteins pattern and its correlation with gir breed semen freezability

Marcelo RONCOLETTA<sup>1</sup>; Paulo Henrique FRANCESCHINI<sup>1</sup>; Vera Fernanda Martins Hossepian de LIMA<sup>1</sup>; Lúcia Helena RODRIGUES<sup>2</sup>; Marcelo Almeida OLIVEIRA<sup>2</sup>; Carlos da SILVA<sup>2</sup>

CORRESPONDÊNCIA PARA:  
Paulo Henrique Franceschini  
Departamento de Medicina  
Veterinária e Reprodução Animal  
Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias da UNESP  
Campus de Jaboticabal  
Rodovia Carlos Tonanni, Km 5  
14870-000 - Jaboticabal - SP  
e-mail: roncolet@convex.com.br

1-Departamento de Medicina  
Veterinária Preventiva e  
Reprodução Animal da Faculdade  
de Ciências Agrárias e Veterinárias  
da UNESP, Jaboticabal-SP  
2-Lagoa da Serra inseminação  
Artificial, Sertãozinho-SP

#### RESUMO

Foram utilizados dez animais doadores de sêmen em nível de Central de Inseminação Artificial, da raça Gir, divididos em dois grupos, de acordo com o grau de congelabilidade do sêmen de cada animal. Os animais com sêmen de alta congelabilidade foram aqueles cuja porcentagem de ejaculados viáveis pós-descongelação foi superior a 80%. O grupo de baixa congelabilidade tinha animais com porcentagem menor que 50% de ejaculados viáveis pós-descongelação. Os critérios de avaliação da viabilidade do sêmen e seleção dos animais foram definidos pelo controle de qualidade do Departamento de Produção da Central de Inseminação Artificial. Foram feitas quatro coletas semanais consecutivas, sendo que obtiveram-se as amostras de plasma seminal por centrifugação a 1.500 g por 15 a 20 minutos a 4°C, momentos após a coleta do sêmen em vagina artificial. O plasma seminal foi dialisado em membrana de celulose, em tampão Tris-Glicina pH-7,4 por 24 horas a 4°C, em agitação lenta e constante. As amostras foram padronizadas em 1,0 mg/ml de proteína total, por diluição em tampão Tris-HCl 62mM pH-6,2 mais 20% de glicerol e 4% de SDS. Através de eletroforese do tipo SDS-PAGE, foram feitas as corridas em gel a 13%. A corrida foi feita com a constante de 25 mA, por um período de 5 horas. A coloração do gel foi feita por Coomassie Brilliant Blue. Pelos resultados obtidos, verificou-se que existe uma banda no grupo de alta congelabilidade, cujo fragmento polipeptídico desta proteína tem  $M_r$  (mobilidade relativa) 20,3 e PM (peso molecular) aproximado de 61.800 Da. Esta banda não foi detectada nas amostras do grupo de baixa congelabilidade, o que sugere ser um possível marcador bioquímico quanto ao potencial de criopreservação do sêmen de bovinos.

**UNITERMOS:** Plasma seminal; Bovinos; Eletroforese; Congelamento; Sêmen.

#### INTRODUÇÃO

O plasma seminal serve como veículo para os espermatozoides ejaculados, consistindo numa mistura de secreções do testículo e glândulas acessórias masculinas. Possui um significado fisiológico importantíssimo como carreador dos gametas masculinos até o trato genital feminino, dando condições para a viabilização do processo de fertilização. Vários autores<sup>2,3,10,11,16</sup> sugeriram que o conteúdo do plasma seminal influi na fertilidade masculina, geralmente baseando-se na composição do plasma de animais e/ou homens férteis e inférteis. Indicaram perfis

eletroforéticos como marcadores no auxílio da avaliação clínica em casos de infertilidade; com infertilidade presente nos casos de fibrose cística; a um tipo de esterilidade provinda de defeito de peça intermediária dos espermatozoides; diferenças entre os polipeptídeos no plasma seminal e espermatozoides de animais saudáveis e animais que sofreram degeneração testicular induzida pelo calor.

A eletroforese é uma técnica que vem sendo utilizada desde a década de 50 para mapear e identificar componentes protéicos solúveis de ejaculados, na busca de marcadores bioquímicos para diagnóstico de algumas patologias ou diferenciação de animais quanto ao grau de sua fertilidade.

Frente a alterações de clima e manejo, associadas a patologias do trato reprodutivo masculino ou do espermatozóide. Determinadas proteínas no plasma seminal, de seres humanos, foram caracterizadas e relacionadas com infertilidade.

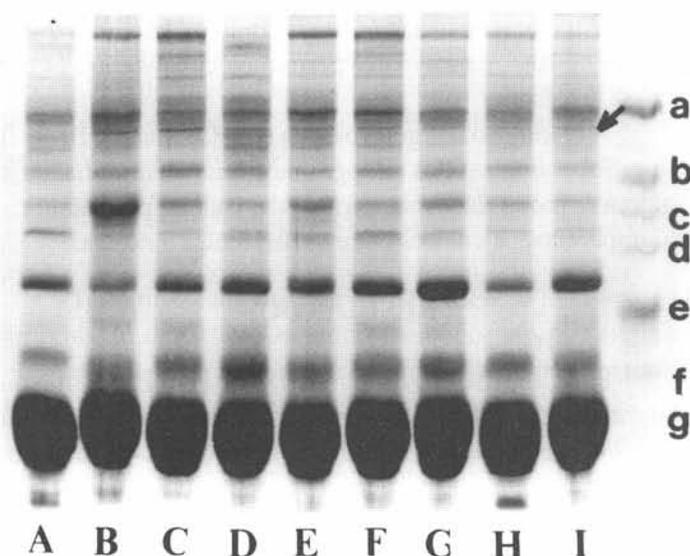
Já foi constatado que o conteúdo do plasma seminal pode influenciar na fertilidade dos machos<sup>8</sup>. Estudos indicam que a habilidade do espermatozóide para se ligar à heparina e a outros glicosaminoglicanos está correlacionada com a qualidade do sêmen e fertilidade. As proteínas com sítio de ligação para heparina no plasma seminal influenciam na fertilidade. Estes sítios de ligação têm estrutura semelhante a proteínas (GAGS) do líquido folicular ovariano, que são responsáveis pela estimulação das reações acrossômicas no espermatozóide bovino, de coelho e porco, agindo provavelmente durante a capacitação do espermatozóide<sup>12</sup>. Utilizando-se da eletroforese, associaram touros férteis de uma determinada população, com duas proteínas do plasma seminal, caracterizadas por apresentarem PM de 26kDa pI 6,2 e PM de 55kDa pI 4,5 como predominantes em touros com alta fertilidade e duas proteínas, de PM 16kDa pI 4,1 e PM 16kDa pI 6,7 como predominantes em animais de baixa fertilidade<sup>8</sup>.

Quando se discute sobre fertilidade masculina, o parâmetro congelabilidade do sêmen é pouco citado. Associaram-na com a concentração de proteínas totais, sólidos totais, frutose, e duas enzimas a Glutamato-oxalacetato transaminase-GOT e Glutamato-piruvato transaminase-GPT<sup>5</sup>. Na busca de um marcador molecular associado a congelabilidade, sugeriram os alelos HLA-DPB como marcador específico para parâmetros de descongelamento do sêmen<sup>15</sup>.

A congelabilidade do sêmen é um fator bastante importante para a melhoria do material biológico para a realização e sucesso da técnica de Inseminação Artificial e conseqüentemente para o Melhoramento Genético Animal. Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou estudar o perfil protéico eletroforético do plasma seminal de touros de uma mesma raça, com características de congelabilidade do sêmen diferentes, bem como avaliar a possibilidade de utilizar um marcador bioquímico para prever a congelabilidade do sêmen.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados dez animais da raça Gir com aptidão para a produção leiteira, doadores de sêmen em nível de Central de Inseminação Artificial, subdivididos em dois grupos de acordo com o grau de congelabilidade do seu sêmen. Os animais de sêmen de alta congelabilidade foram aqueles que apresentaram mais que 80% dos seus ejaculados aproveitáveis,



**Figura 1**

SDS-PAGE/Gir -Variedade Leiteira. As amostras B, C, D, E, F, G, H e I são de animais pertencentes ao GI (alta congelabilidade), e a amostra A é do animal pertencente ao GII (baixa congelabilidade). Os padrões de peso molecular indicam (a) 67.000 Da, (b) 45.000 Da, (c) 36.000 Da, (d) 33.000 Da, (e) 24.000 Da, (f) 16.000 Da e (g) 14.000 Da. Ø Banda do fragmento  $M_{20,3}$  e PM 51.800 Da.

e com avaliação favorável após o descongelamento das palhetas de sêmen. Porcentagem menor que 50% dos ejaculados aproveitáveis pós-descongelamento incluíram os animais no grupo de baixa congelabilidade. Os parâmetros de avaliação do sêmen foram os utilizados na rotina pelo controle de qualidade da Central de Inseminação.

O sêmen foi colhido através do método de vagina artificial, rotineiramente utilizado na Central. Foram feitas quatro coletas semanais consecutivas de cada animal. O plasma seminal foi obtido por centrifugação do sêmen a 1.500g por 15 a 20 minutos a 4°C. O mesmo foi dialisado em membrana de celulose, em tampão Tris-Glicina pH 7,4 por 24 horas a 4°C, em agitação lenta e constante. O tampão de diálise foi trocado uma vez após 12 horas de agitação. Antes e após a diálise, uma alíquota de cada amostra foi separada para ser utilizada nas dosagens de proteína total. Destas alíquotas, obteve-se, para a padronização das amostras, 1,0 mg/ml de proteína total, sendo preparadas com diluição em tampão Tris-HCl 62 mM pH 6,8 mais 20% de glicerol e 4% de SDS. Após a diluição, as amostras foram submetidas a fervura por 10 minutos.

A eletroforese foi em SDS-PAGE, de acordo com Laemmili<sup>7</sup>, pelo método vertical com placas de 20x20 cm, com gel a 13%, utilizando-se 25 mA constante na corrida, por tempo de 5 horas. As corridas foram feitas com 200 µg

de proteína total de cada amostra. Como padrão, utilizou-se MW-SDS-70L\*, o qual marca pesos moleculares entre 14.000 e 70.000 dáltons.

A coloração dos géis foi feita com Coomassie Brilliant Blue. Pelas análises dos zimogramas foram determinados os valores de mobilidade relativa ( $M_r$ ) das cadeias polipeptídicas e comparados os valores entre as diferentes amostras.

## RESULTADOS

Pela análise dos géis em SDS-PAGE de plasma seminal, pôde-se notar que existem diferenças marcantes e individuais entre os perfis de cada animal, principalmente na faixa que compreende as cadeias polipeptídicas de maior peso molecular, polipeptídeos com peso acima de 29.000 Da (Fig. 1).

Dentre estes peptídeos uma cadeia se destacou, freqüentemente presente no perfil eletroforético das bandas dos animais pertencentes ao grupo de alta congelabilidade, e sempre ausente no grupo de baixa congelabilidade. Essa banda tem  $M_r$  20,3 e PM aproximado de 61.800 Da, localizando-se abaixo da banda demarcada pela albumina bovina do padrão utilizado (Fig. 1).

Os polipeptídeos com menor peso molecular também apresentaram-se com variações individuais, mas quando os perfis são comparados têm menor variabilidade que os citados anteriormente. Com baixo peso molecular encontram-se as cadeias polipeptídicas em maior concentração no plasma seminal, cadeias que têm uma  $M_r$  em torno de 83,78 e PM abaixo de 14.000 Da.

## DISCUSSÃO

A biotecnologia vem trazer a possibilidade de novas ferramentas para o Melhoramento Genético Animal, que, aliada a técnicas convencionais, tornarão o progresso genético mais ágil e confiável<sup>4</sup>. Portanto, será através da biotecnologia, como a determinação de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal, que a seleção de genótipos superiores para determinadas características reprodutivas será incrementada.

Para o processo de fecundação, é necessária uma composição apropriada do plasma seminal para viabilizar os processos metabólicos do espermatozóide, tanto em situação de monta natural como nos processos de congelamento do sêmen para utilização em Inseminação Artificial.

Muitos são os trabalhos com eletroforese para isolar e identificar as proteínas do sêmen, seja do espermatozóide ou

do plasma seminal. Rattan<sup>13</sup>, comparando diferenças climáticas e de manejo entre animais, encontrou perfis protéicos característicos. Neste estudo, verificaram-se também algumas alterações semelhantes nos perfis protéicos, individuais, ou até mesmo grupais. Estas não devem ser devidas às alterações de manejo, pois todos os animais foram mantidos sob o mesmo regime de internato. Alterações de clima podem ser consideradas fatores de interferência sobre a característica estudada, se os animais que apresentaram as diferenças no perfil forem mais sensíveis às alterações climáticas que os demais.

Uma característica no perfil eletroforético do plasma seminal é que existem fragmentos protéicos de baixo PM em abundância, caracterizados por  $M_r$  80,3 e PM aproximado de 13.000 Da, presente em todos os animais, porém sem importância na caracterização dos grupos em estudo, visto que as diferenças encontradas são pequenas e individuais. Estas mesmas bandas foram mencionadas por outros autores<sup>6,9,14</sup>, porém as isolaram e identificaram-nas como sendo um conjunto constituído por três proteínas de PM 12.774 Da. Duas delas fazem parte do PDC-109 (proteínas idênticas, somente com tempo de eluição do HPLC diferentes), e a outra é denominada BSP A<sub>3</sub>. Confirmaram a abundância da concentração deste conjunto de proteínas e mencionam que tem sua bioatividade fisiológica ainda desconhecida. No estudo em apreço, o polimorfismo apresentado não foi suficiente para categorizar os animais, mesmo que individualmente, não caracterizando portanto os dois grupos em questão.

Rattan<sup>13</sup> também levantou a hipótese de semelhança entre as proteínas séricas com as do plasma seminal, já que estas apresentavam mobilidades relativas semelhantes. Nesta linha, acredita-se ser possível encontrar o mesmo marcador bioquímico do plasma seminal para congelabilidade do sêmen, nas proteínas séricas, o que permitiria uma seleção dos animais mesmo antes da puberdade tornando os processos de seleção ainda mais ágeis e eficientes.

A fertilidade em touros foi analisada e comparada frente a perfis eletroforéticos de proteínas de membrana de espermatozóides que associaram duas proteínas 26KDa pI 6,2 e 55KDa pI 4,5 predominantes em animais com alta fertilidade, e duas proteínas de 16KDa pI 4,1 e 16KDa pI 6,7 em animais de baixa fertilidade<sup>8</sup>. Estes também mencionaram que estas proteínas estão presentes no plasma seminal e são caracterizadas por apresentarem sítios de ligação com a heparina e outros glicosaminoglicanos. Estes sítios têm estrutura semelhante a proteínas (GAGS) provenientes do líquido folicular ovariano, responsáveis pela estimulação de reações acrossômicas no espermatozóide bovino, de coelho e

\*Sigma Chemical CO.

suíno, agindo provavelmente durante a capacitação espermática<sup>12</sup>.

Amann<sup>1</sup> discorreu que para a criopreservação é necessário um exame rigoroso na seleção dos ejaculados, a qual serve como suporte para apurar o potencial de fertilidade do animal. Dentro do conceito fertilidade, o fator congelabilidade é muito pouco mencionado e discutido, sendo poucos os autores que o mencionaram, associaram-no com constituintes do plasma seminal, como proteínas totais, sólidos totais, frutose, GOT e GTP<sup>5</sup>; e sugeriram os alelos HLA-DPB como marcadores moleculares específicos para parâmetros de descongelação do sêmen<sup>15</sup>.

Assim, na tentativa de aprimorar-se o conceito de congelabilidade em touros doadores de sêmen, sugeriu-se uma banda do fragmento citado anteriormente, o fragmento caracterizado pela  $M_r$  de 20,3 e PM aproximado em 61.800

Da, como um possível marcador bioquímico para o caráter de congelabilidade do sêmen. Entretanto, admite-se a necessidade de maiores estudos, incluindo um número maior de amostras e animais, para se confirmar este fragmento protéico como marcador.

## CONCLUSÕES

1. É possível utilizar o peptídeo  $M_r$  20,3 e PM aproximado de 61.800Da como marcador bioquímico para diferenciação do grau de congelabilidade do sêmen em touros doadores em nível de Central de Inseminação Artificial;

2. É necessário o isolamento e identificação deste fragmento protéico sugerido como marcador bioquímico, para que a utilização desta proteína na tecnologia da criopreservação do sêmen seja viabilizada.

## SUMMARY

This study was undertaken to determine whether bovine seminal plasma contained protein markers associated with semen freezability. Seminal plasma was obtained from ten Gir bulls of known fertility and freezability, set into two groups of High (up to 80% of viable sperm after thawing) and Low freezability (less than 50%). SDS-PAGE of seminal plasma samples indicated that one protein ( $M_r$  = 20.3; MW = 61,800Da) predominated in high-freezability semen. These findings indicate that bull seminal plasma contains freezability-associated proteins which can be used as markers for predicting semen freezability.

**UNITERMS:** Seminal plasma; Cattle; Electrophoresis; Freezing; Semen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AMANN, R.P. Evaluation of sperm quality: can we pick the winners? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. Belo Horizonte : CBRA, 1995. **Anais.** Belo Horizonte : CBRA, 1995. p.206-12.
- 2- AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v.12, n.3, p.191-200, 1991.
- 3- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; MAVER, A.; PALLINI, V.; RENIERI, T. "9+0" Immotile spermatozoa in an Infertile Man. **Andrologia**, v.11, n.6, p.437-43, 1979.
- 4- COUTINHO, L.L. *et al.* O uso de marcadores na indústria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. Belo Horizonte, 1995. **Anais.** Belo Horizonte : CBRA, 1995. p.195-205.
- 5- DHAMI, A.J.; KODAGALI, S.B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen of Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.57, n.12, p.1283-6, 1987.

- 6- ESCH, F.S.; LING, N.C.; BOHLEN, P.; YING, S.Y.; GUILLEMIN, R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.113, n.3, p.861-7, 1983.
- 7- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. **Nature**, v.227, p.680-5, 1970.
- 8- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-7, 1993.
- 9- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, v.241, p.685-92, 1987.
- 10- MARCHINI, M. *et al.* Electrophoretical patterns of seminal plasma proteins in patients with cystic fibrosis. **Fertility and Sterility**, v.53, n.3, p.541-5, 1990.
- 11- MORGENTHAUER, A.; SCHOPPERLE, W.M.; CROCKER, R.H.; WOLF, W.C. Protein differences between normal and oligospermic human sperm demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis. **Fertility and Sterility**, v.54, n.5, p.902-5, 1990.

- 12- MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v.42, p.899-915, 1990.
- 13- RATTAN, P.J.S.; BHIMASENARAO, M.; ANANTAKRISHMAN, C.P. Eletrophoretic studies on bovine semen. **Indian Journal of Animal Science**, v.42, n.2, p.77-84, 1972.
- 14- SEIDAH, N.G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J.; SAIRAM, M.R.; CHRÉTIEN, M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, v.243, p.195-203, 1987.
- 15- PERROTT, W.; SU, B.C.; CHAN, P.J.; KALUGDAN, D.R.; TREDWAY, D.R. Identification of sperm cryopreservation - thawing parameters based on HLA-DPB allelic sequence variation determined through the polymerase chain reaction (PCR). *In*: MEETING SOCIETY OF AMERICAN FERTILITY, 18. **Abstracts**, 1992. p.59-133, 1992.
- 16- WOLFE, D.F.; BRADLEY, J.T.; RIDDELL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v.40, p.1083-91, 1993.

Recebido para publicação: 20/11/1996

Aprovado para publicação: 27/10/1998