

## Marcadores de Congelabilidade no Plasma Seminal de Caprinos - Estudos Preliminares

Ângela Maria Xavier Eloy<sup>1</sup>  
João Ricardo Furtado<sup>2</sup>

### Introdução

Na espécie caprina é comum, em determinadas épocas do ano, os reprodutores apresentarem baixas taxas de congelabilidade do sêmen, fato esse observado por Centrais de Inseminações e também por Martinez e Eloy (2005). Estes autores, trabalhando com animais da raça Anglo-nubiana, relataram diferença significativa entre os índices de aprovação de doses entre os períodos seco e chuvoso, sendo maiores na época seca. Também tem-se observado variação individual da capacidade de congelamento do sêmen. Levando em consideração estes fatores, aliado à necessidade de se selecionar animais para utilização em programas de melhoramento genético, iniciou-se trabalhos visando identificar, neste primeiro momento, o perfil eletroforético (SDS-PAGE) de animais que apresentam histórico de capacidade de congelamento em relação aos que não apresentam esta qualidade.

### Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação

Artificial da Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, Ceará, situado a 3° 42' de latitude Sul e 40° 21' de longitude Oeste. O clima da região é do tipo AW de Savana seguindo a classificação climática de Köppen. A temperatura média anual é de 28°C e a umidade relativa do ar é de 60%.

Foram utilizados dois animais adultos da raça Anglo-nubiana, um apresentando histórico de congelabilidade do sêmen (Animal X), enquanto o outro nunca congelou (Animal Y). Os animais eram submetidos ao regime semi-extensivo, recebendo concentrado à base de milho e farelo de soja pela manhã (300g) e feno de leucena. Sal mineral e água limpa e de boa qualidade eram oferecidos "ad libitum". Coletas de sêmen foram realizadas durante duas semanas, de dois em dois dias, com o auxílio da vagina artificial, sendo o plasma seminal obtido por centrifugação à 10000 x g durante 30 minutos à 4°C. Utilizou-se um pool de todas as coletas para determinação das concentrações de proteínas totais através do método Bradford (1976) e, em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em géis de 10 x 8 cm (Fig. 1), com concentrações de 12% de

<sup>1</sup> Méd. Vet., D. Sc. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, CEP - 62010-970, C. Postal 145, Sobral/CE. E-mail: angela@cnpq.embrapa.br

<sup>2</sup> Licenciatura em Física. Assistente de Pesquisa da Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: ricardo@cnpq.embrapa.br

poliacrilamida, de acordo com o método descrito por Hames (1981). Depois de feito o gel, colocou-se 10 $\mu$ l da amostra do plasma com concentração de 20 $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína por “poço” na placa de gel, e utilizou-se como padrão o kit LMW ELECTROPHORESIS CALIBRATION da Pharmacia Biotech., que apresenta as bandas de massas moleculares a seguir: 94; 67; 43; 30; 20,1 e 14,4 kDa. A separação foi obtida em corrida eletroforética, com corrente elétrica de 40 miliampere, tensão elétrica de 170volts e potência de 7 watts por aproximadamente 2 horas. Na coloração do gel foi utilizado o corante Comassie Brilliant Blue G-250 por aproximadamente 2 horas, e em seguida, a descoloração, em solução de metanol a 30% e ácido acético a 7% em água bidestilada por 3 horas, para visualização das bandas. Os géis foram escaneados por um fotodocumentador Bio Doc-IT and Visidoc-IT Gel Documentation systems, UVP e as bandas protéicas foram então analisados quanto à distribuição e concentração pelo software da Life Science Doc-It<sup>®</sup>LS 6.0.

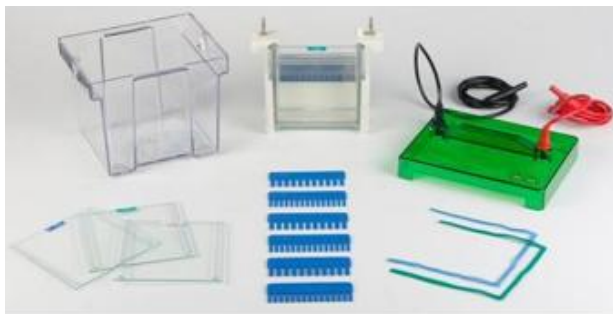


Fig. 1. Cuba vertical utilizada em eletroforese unidimensional.  
Fonte: Cuba..., (2008)

Para secagem do gel utilizou-se metanol a 50% e glicerol a 1% em água bi-distilada por 10 minutos, sendo então os géis colocados entre duas folhas de celofane.

As bandas protéicas dos géis foram comparadas entre os animais observando-se a distribuição e frequência das mesmas, como também sua intensidade.

## Resultados e Discussão

Os resultados mostraram nove bandas de proteínas identificadas no gel pertencente ao animal X e cinco bandas no gel do animal Y (Fig. 2) (Tabela 1). No animal X foi observada uma banda de alto peso molecular em torno de 112 kDa e outras de 61, 43, 31 e 29 kDa. O animal Y mostrou uma banda de aproximadamente 55 kDa. Ambos os animais apresen-

taram em comum bandas de 67, 23, 22 e 20 kDa. O que chama atenção é a presença da banda de alto peso molecular no animal X e da banda de 55 kDa no animal Y.

No animal X foram encontradas bandas protéicas de 29 e 31 kDa que podem estar relacionadas com as BSPs (*Bovine seminal proteins*) de peso molecular aproximado entre 28 e 30 kDa ligadas à capacitação espermática, estimulando a liberação de colesterol da membrana do espermatozóide pouco depois da ejaculação (DESNOYERS et al., 1994; THERIEN et al., 1999). De acordo com Nauc e Manjunath (2000), as BSPs têm a propriedade de ligação à superfície do espermatozóide, diminuindo sua quantidade após a criopreservação do sêmen, sugerindo alguma relação com a congelabilidade do mesmo.

Jonsson et al. (2005) caracterizaram a rSgl<sub>43</sub> (43 kDa) em sêmen de humanos e demonstraram que esta proteína tem capacidade de se ligar ao zinco (Zn<sup>2+</sup>). Os estudos sobre esta proteína em animais ainda são incipientes.

As glicoproteínas de massa molecular de 55 kDa, pI 4,5 identificadas e isoladas da matriz óssea bovina, cartilagens, pele fetal, cérebro, rins, ovários, útero, bem como da urina, bile e leite bovino (KERR et al., 1991; SORENSEN; PETERSEN, 1993), e também secretadas pelo plasma seminal (FRANZEN; HEINEGARD, 1985) são as chamadas osteopontinas. É uma molécula multifuncional, tipicamente envolvida nos processos de adesão celular e remodelamento de tecidos, estando identificada como uma proteína de fertilidade em touros, e considerada também como um dos marcadores de alta fertilidade existente no plasma seminal de bovino (KILLIAN et al., 1993). Segundo Cancel et al. (1997), a osteopontina liga-se à receptores na superfície do epitélio celular, podendo apresentar uma função protetora em infecções bacterianas e, de acordo com Moura (2005), também participa na interação entre espermatozoides e oócito durante a fertilização. Bianchi et al. (2008) observaram em suínos bandas de 63,85 kDa e 43,62 kDa relacionadas com a integridade da membrana plasmática > 55% em sêmen descongelado.

No plasma seminal de búfalos a literatura relata bandas de 55 kDa que são identificadas com a viabilidade do sêmen fresco (ASADPUR et al., 2007). Na espécie caprina esta proteína ainda necessita ser

identificada e caracterizada. Teixeira (2008) encontrou no plasma seminal de caprinos da raça Anglo-nubiana bandas de peso moleculares de 53 kDa a 55 kDa que estão presentes nos dois períodos do ano no Nordeste do Brasil e, poderão estar relacionadas às osteopontinas, cuja função está ligada à adesão celular através de receptores, que parecem ter um papel na ligação espermatozóide-ovócito na perimplantação e na implantação (VINATIER, 1995).

A banda de massa molecular de 67 kDa observada em ambos os animais, provavelmente esteja relacionada à albumina, proteína que está envolvida com a extração do colesterol da membrana plasmática que irá ocorrer em áreas restritas da membrana, havendo, devido a isto, um deslocamento dos fosfolipídeos causando um re-arranjo de sua arquitetura (YAMANAGIMACHI, 1994, FLESCHE; GADELLA, 2000).

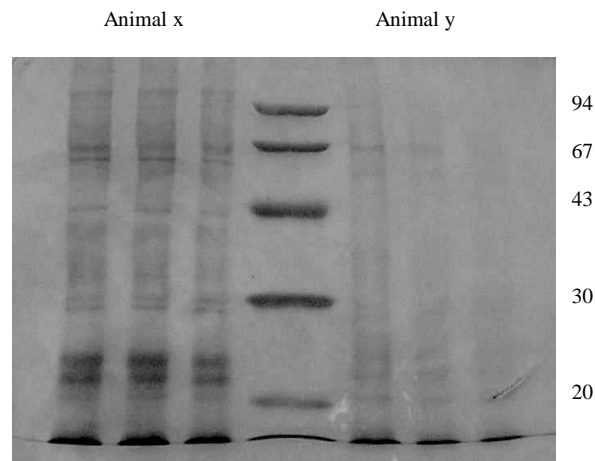


Fig. 2. Perfil eletroforético das proteínas seminais em caprinos da raça Anglo-nubiana com alta (x) e baixa (y) congelabilidade e diferentes concentrações de proteínas (15, 10 e 5 ug/fossa).  
Fonte: Eloy et al., (2008).

Tabela 1. Peso molecular (kDa) e concentração relativa (%) das bandas protéicas presentes no plasma seminal de dois caprinos da raça Anglo-nubiana cujos sêmen congela (X) e não congela (Y).

Bandas	Peso Molecular (kDa)		Concentração Relativa (%)	
	Animal X	Animal Y	Animal X	Animal Y
1	112	67	10,4	19,8
2	67	55	12,1	19,6
3	61	24	10,5	20,4
4	43	22	11,2	19,5
5	31	20	11,6	20,7
6	29		11,6	
7	24		10,0	
8	22		11,5	
9	20		11,1	

## Conclusão

Conclui-se que possivelmente as bandas protéicas de aproximadamente 29, 31, 43, 61 e 112 kDa possam estar envolvidas no processo de congelação, podendo vir a ser consideradas como marcadores para congelabilidade em caprinos da raça Anglo-nubiana.

## Referências

ASADPOUR, A. M.; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; REZAILI, S. A.; ANSARI, M. H. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3/4, p. 308-313, 2007.

BIANCHI, I.; COLLARES, T.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V.; KAEFER, C.; CORRÊA, E. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; LUCIA JÚNIOR., T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-descongelamento. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 384-388, 2008.

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

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1292-301, 1997.

CUBA de eletroforese vertical 10x10cm EEL 150. Disponível em: [http://www.insightltda.com.br/produtos\\_descricao.php?id=1202](http://www.insightltda.com.br/produtos_descricao.php?id=1202). Acesso em: 25 jul. 2008.

DESNOYERS, L.; THERIEN, L.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 425-435, 1994.

ELOY, A. M. X.; FURTADO, R.; TEIXEIRA, A. V.; PINHEIRO, R. R.; PONTES, M. de S. Electrophoresis profile in plasma semen from Anglo Nubian goats according to freezing ability in northeast of Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 9.; REUNIÓN NACIONAL SOBRE CAPRINOCULTURA, 23,

2008, Querétaro, México. **Sustainable goat production: challenges and opportunities of small and large enterprises**; proceedings. Querétaro: International Goat Association, 2008. p. 238. ref. 338.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bovine calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, p. 715-724, 1985.

HAMES, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL Press, c1981. p. 1-86.

JONSSON, M.; LINSE, S. ; FROHM, B.; LUNDWALL, A. ; MALM, J. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. **Biochemistry Journal**, v. 387, p. 447-453, 2005.

KERR, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D. The cDNA clonig and distribution of bovine osteopontin. **Gene**, Amsterdam, v. 108, p. 237-243, 1991.

KILLIAN G.J.; CHAPMAN D. A.; ROGOWSKI L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

MARTINEZ, P. M.; ELOY, A. M. X. Efeito da sazonalidade sobre a congelação do sêmen caprino no Nordeste. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Teresina. **[Traba-**

**lhos apresentados]**. Teresina: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; UFP, 2005. Seção resumos. 1 f. 1 CD-ROM.

MOURA, A. A Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2005.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification seminal plasma and sperm. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.

SORENSEN, E. S.; PETERSEN, T. E. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 198-197, 1993.

TEIXEIRA, A. V. **Estudos dos parâmetros espermáticos e das proteínas seminais de caprinos da raça Anlo-nubiana no Nordeste do Brasil**. 2008. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1999.

VINATIER, D. Integrins and reproduction. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 59, p. 71-81, 1995.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2th ed. New York: Raven Press, 1994. v. 1, p. 189-317.

### Comunicado Técnico, 97

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Caprinos e Ovinos**  
**Endereço:** Fazenda Três Lagoas. Estrada Sobral/  
 Groáiras, Km 04, CEP - 62010-970, C. Postal 145,  
 Sobral/CE.  
**Fone:** (0xx88) 3112-7400  
**Fax:** (0xx88) 3112-7455  
**Home Page:** www.cnpc.embrapa.br  
**SAC:** www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

1ª edição on line (Dez./2008).

### Comitê de publicações

**Presidente:** Lúcia Helena Sider.  
**Secretário-Executivo:** Diônes Oliveira Santos.  
**Membros:** Alexandre César Silva Marinho, Carlos José Mendes Vasconcelos, Fernando Henrique M.A.R. Albuquerque, Jorge Luis de Sales Farias, Leandro Silva Oliveira, Mônica Matoso Campanha, Tânia Maria Chaves Campêlo e Verônica Maria Vasconcelos Freire.

### Expediente

**Supervisão editorial:** Alexandre César Silva Marinho.  
**Revisão de texto:** Carlos José Mendes Vasconcelos.  
**Normalização Bibliográfica:** Tânia Maria Chaves Campêlo.  
**Editoração eletrônica:** Alexandre César Silva Marinho.