



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL PROTEICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS PANTANEIROS E SUA  
RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

**PAULA LORENA GRANGEIRA SOUTO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA-DF  
DEZEMBRO DE 2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL PROTEICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS PANTANEIROS E SUA  
RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

**PAULA LORENA GRANGEIRA SOUTO**

**ORIENTADOR: ALEXANDRE FLORIANI RAMOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 95/2013**

**BRASÍLIA-DF  
DEZEMBRO DE 2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 1014176.

S728p Souto, Paula Lorena Grangeira.  
Perfil proteico do plasma seminal de touros pantaneiros e sua relação  
com a congelabilidade do sêmen / Paula Lorena Grangeira Souto. --  
2013.  
xviii, 112 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

Inclui bibliografia.

Orientação: Alexandre Floriani Ramos.

1. Bovino - Reprodução. 2. Sêmen - Conservação. I. Ramos,  
Alexandre Floriani. II. Título.

CDU 636.2.082.4

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL PROTEICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS PANTANEIROS E SUA  
RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

**PAULA LORENA GRANGEIRA SOUTO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, Dr., (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E  
BIOTECNOLOGIA) (ORIENTADOR)**

---

**IVO PIVATO, Dr. (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)**

---

**ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE NORONHA MOURA, Ph.D., (UFC)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA-DF, 18 DE DEZEMBRO DE 2013**

À Deus, o .:Grande Arquiteto do Universo:., agradeço por tudo.

À minha mãe, Valmira, que sempre apoiou meus sonhos e me ajudou a torná-los realidade, com sua dedicação e zelo, e ao meu irmão Gustavo, sempre presentes em todos os momentos de minha vida. A vocês meu respeito e amor incondicional!

À minha querida avó Maria Geralda (*in memoriam*) que, tenho certeza, está vibrando e torcendo por mim como sempre fez em todas as minhas conquistas.  
Uma homenagem.

Ao meu pai, Wilson, e aos meus irmãos Wesley, Milena e Amanda.  
À minha família, com carinho, ofereço.

Ao Carlos, simplesmente por *existir* e *ser* em minha vida:.

A vocês dedico.

“Nada é fácil, nada nesse mundo é dado de presente, tudo precisa ser aprendido com muito esforço. Um homem que vai a busca do conhecimento deve ter o mesmo comportamento de um soldado que vai para a guerra: bem desperto, com medo, com respeito e com absoluta confiança. Se seguir esses requisitos, pode perder uma batalha ou outra, mas jamais irá lamentar-se do seu destino.”

*Carlos Castañeda*

“A mente que se abre a uma ideia nova, jamais volta ao seu tamanho original.”

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Floriani Ramos, por todas as oportunidades, pela confiança e pelos ensinamentos compartilhados durante esses anos. Registro aqui minha admiração profissional.

À equipe do Laboratório de Reprodução do Macho da Fazenda Sucupira, Embrapa Cenargen, em especial aos doutorandos Nathalia Hack e Oscar Brasil, pelos conselhos e pela amizade, à todos os funcionários desta fazenda que cooperaram para a realização desse trabalho e ao técnico Normandes Vieira pela capacitação em criopreservação de sêmen e pelo apoio durante esse período.

Ao Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura, pela valiosa colaboração na execução das análises proteômicas desse projeto, e à toda equipe do Laboratório de Fisiologia Animal, departamento de zootecnia da UFC, por todo o apoio pessoal e profissional no período de minha estada nessa instituição, em especial ao Dr. Mauricio Van-Tilburg e à Doutoranda Erika Bezerra de Menezes.

Ao Dr. Hymerson Costa Azevedo, por compartilhar vossa experiência em microscopia de fluorescência, utilizando combinações de sondas para avaliação simultânea de estruturas do espermatozoide. Ao mestrando Tarsizio da Silva Santos, por compartilhar seus conhecimentos, e à toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros pela agradável recepção.

À Dra. Raquel Soares Juliano da Embrapa Pantanal e toda equipe da Fazenda Nhumirim, pelo suporte no trabalho realizado e à doutoranda Eleonora Araújo Barbosa pela colaboração durante as colheitas e congelamento de sêmen.

À professora Dra. Concepta McManus, pelos esclarecimentos na análise estatística. Obrigada pela paciência, atenção e tempo dedicados.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte nesse experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília, pelo curso oferecido e pelo recurso concedido ao projeto através de edital de apoio à pesquisa de campo.

À todos que de alguma forma estiveram presentes durante esse período e que, pelo cunho sucinto deste tópico, não tiveram os nomes listados, meu muito obrigada!

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO</b>	<b>Página</b>
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO .....	2
1.1 Objetivo Geral .....	4
1.2 Objetivos Específicos .....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 Bovino Pantaneiro .....	5
2.2 Aspectos estruturais e funcionais do espermatozoide .....	8
2.3 Plasma seminal .....	12
2.3.1 Proteínas relacionadas com a proteção espermática .....	14
2.3.2 Proteínas que participam da capacitação espermática .....	16
2.3.3 Proteínas envolvidas na reação acrossomal e na interação entre gametas.....	17
2.4 Eletroforese bidimensional .....	18
2.5 Criopreservação do sêmen bovino .....	21
2.6 Avaliação das injúrias espermáticas .....	26
2.6.1 Avaliação da motilidade espermática .....	26
2.6.2 Avaliação da morfologia espermática.....	27
2.6.3 Avaliação da integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal do espermatozoide.....	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>40</b>
RESUMO .....	41
ABSTRACT .....	43
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	47
2.1 Delineamento experimental .....	47
2.2 Colheita do sêmen, avaliação dos parâmetros espermáticos e extração do plasma seminal.....	48
2.3 Precipitação das proteínas do plasma seminal.....	49
2.4 Quantificação de proteínas totais no plasma seminal .....	50
2.5 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.....	50
2.6 Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais .....	52
2.7 Análise estatística .....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
3.1 Resultados.....	54
3.2 Discussão .....	56
4. CONCLUSÕES .....	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>72</b>
RESUMO .....	73
ABSTRACT .....	75
1. INTRODUÇÃO .....	76

2. MATERIAL E MÉTODOS .....	78
2.1 Delineamento experimental .....	78
2.2 Colheita e processamento do sêmen .....	79
2.3 Avaliações do sêmen pós-criopreservação .....	81
2.3.1 Avaliação da cinética e morfologia espermática .....	81
2.3.2 Avaliação da integridade da célula espermática .....	82
2.3.2.1 Avaliação da integridade acrossomal .....	82
2.3.2.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática.....	83
2.4 Precipitação das proteínas do plasma seminal .....	83
2.5 Quantificação de proteínas totais no plasma seminal .....	84
2.6 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.....	84
2.7 Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais .....	86
2.8 Análise estatística .....	87
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
3.1 Resultados .....	88
3.2 Discussão .....	93
4. CONCLUSÕES .....	101
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
ANEXOS .....	108

## PERFIL PROTEICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS PANTANEIROS E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN

Paula Lorena Grangeira Souto<sup>1</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Escola de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília - UnB, DF, Brasil,

<sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Brasil. E-mail: paulalgsouto@gmail.com

### RESUMO

O bovino Pantaneiro é uma raça localmente adaptada que se desenvolveu no bioma Pantanal brasileiro ao longo de quase 500 anos sob pressão de seleção natural. Estudos acerca de animais localmente adaptados são essenciais para nortear as ações dos programas de conservação de recursos genéticos animais. Assim, o objetivo deste trabalho foi correlacionar o perfil eletroforético bidimensional das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros. Utilizou-se ejaculados de dezoito touros Pantaneiros, divididos em dois grupos: de melhor e de pior congelabilidade. As amostras de sêmen pré-criopreservação foram avaliadas quanto à motilidade, vigor e morfologia espermática e as amostras de sêmen pós-criopreservação, avaliadas quanto à cinética pelo CASA, morfologia, integridade de membrana e acrossoma. As amostras de plasma seminal foram obtidas por centrifugação do sêmen e as proteínas seminais separadas por meio de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), corados com Coomassie coloidal G-250 e analisados por meio do aplicativo PDQuest<sup>™</sup>. Foram detectados 277 *spots* nos mapas bidimensionais do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros. Nove *spots* apresentaram associações consistentes e significativas com os parâmetros seminais pós-criopreservação. Destes *spots*, cinco apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de melhor e pior congelabilidade do sêmen. A análise multivariada apontou cinco *spots* correlacionados positivamente com os parâmetros de boa congelabilidade do sêmen. Houve diferenças no perfil proteico do plasma seminal entre os reprodutores de melhor e de pior congelabilidade do sêmen e a análise dos géis revelou uma heterogeneidade nos perfis individuais. Devido à associação dos *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 e 2227 a proteínas encontradas em amostras de sêmen de alta congelabilidade e também relacionadas a eventos benéficos sobre as funções espermáticas,

sugere-se que a presença dos mesmos está ligada à melhor congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros.

**Palavras-chave:** conservação, criopreservação, eletroforese, proteínas.

## PROTEIN PROFILE OF THE SEMINAL PLASMA OF PANTANEIRO BULLS AND THEIR RELATION WITH SEMEN FREEZABILITY

Paula Lorena Grangeira Souto<sup>1</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine, UnB, DF, Brazil, <sup>2</sup>Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, DF, Brazil. E-mail: paulalgsouto@gmail.com

### ABSTRACT

The Pantaneiro cattle is a locally adapted breed that has been developed in the Brazilian Pantanal biome over almost 500 years under the pressure of natural selection. Studies on locally adapted breeds are essential to guide the actions of the programs for conservation of animal genetic resources. The aim of this study was to correlate the two-dimensional electrophoretic profile of seminal plasma proteins with semen freezability from Pantaneiro bulls. We used ejaculates from eighteen Pantaneiro bulls divided into two groups: best and worst freezability. The sperm parameters motility, viability and morphology were evaluated before cryopreservation and also were evaluated after cryopreservation and further were evaluated CASA kinetics, integrity membrane and acrosome. Seminal plasma samples were obtained by semen centrifugation and seminal proteins were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels were stained with colloidal Coomassie G-250 and analyzed using the PDQuest™. Were detected 277 *spots* in two-dimensional maps of the seminal plasma of Pantaneiro bulls. Nine *spots* showed consistent and significant associations with semen parameters after cryopreservation. Five these *spots* showed differences ( $P < 0.05$ ) between freezability groups. The multivariate analysis showed five *spots* positively correlated with the semen parameters for good freezability. There were differences in the seminal plasma protein profile between bulls of best and worst semen freezability. The analysis of the gels also revealed heterogeneity in individual profiles. Due the association of *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 and 2227 with proteins found in animals with high freezability of semen and it relating to beneficial events on sperm functions, it is suggested that their presence is linked to better semen freezability of Pantaneiro bulls.

**Keywords:** conservation, cryopreservation, electrophoresis, proteins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 1</b>		
Figura 1.	Bovino Pantaneiro, Fazenda Nhumirim, Embrapa Pantanal, Corumbá-MS	6
Figura 2.	Espermatozoides corados com diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP). Espermatozoides verdes (A): Membrana plasmática íntegra. Espermatozoides vermelhos: (B) Membrana plasmática lesada. Aumento de 100x.	29
Figura 3.	Espermatozoides corados com FITC-PNA e IP. Microscopia de contraste de fase, campo claro (1) e o mesmo campo sob epifluorescência (2), mostrando espermatozoide íntegro (A) visualizado apenas no campo claro (1); e falsa reação acrossomal (B) visualizada no campo claro (1) e sob epifluorescência (2). Espermatozoide com membrana lesada e acrossoma íntegro (C). Reação do acrossomo verdadeira (3). Aumento de 100x.	30
<b>Capítulo 2</b>		
Figura 1.	Gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest™ (Bio-Rad Laboratories, USA), baseado na combinação dos <i>spots</i> de todos os géis utilizados no experimento. Os grupos de proteínas majoritárias estão em destaque: Grupo 1 (G1), Grupo 2 (G2), Grupo 3 (G3), Grupo 4 (G4), Grupo 5 (G5), Grupo 6 (G6), Grupo 7 (G7), Grupo 8 (G8) e Grupo 9 (G9).	55

### Capítulo 3

- Figura 1. Gel de eletroforese bidimensional SDS-PAGE 12,5% das proteínas do plasma seminal de touros Pantaneiros, corado com Coomassie coloidal blue G-250. 90
- Figura 2. Intensidade (médias e erros-padrão) dos *spots* que apresentaram correlações consistentes e significativas com os parâmetros seminais pós-criopreservação de touros Pantaneiros. Os números dos spots são referentes aos mostrados na Figura 1. 91
- Figura 3. Análise multivariada fatorial entre os *spots* expressos nos mapas bidimensionais do plasma seminal e os parâmetros pós-criopreservação de touros Pantaneiros. 93

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>Capítulo 2</b>		
Tabela 1.	Médias e desvios-padrão dos valores de biometria testicular e dos parâmetros seminais de reprodutores bovinos Pantaneiros (n=18)	54
Tabela 2.	Correlação entre a densitometria dos <i>spots</i> expressados nos géis 2D-PAGE e os parâmetros do sêmen de reprodutores bovinos Pantaneiros	56
<b>Capítulo 3</b>		
Tabela 1.	Médias e desvios-padrão dos parâmetros seminais pré-criopreservação e pós-criopreservação de reprodutores bovinos Pantaneiros por grupo de congelabilidade	89
Tabela 2.	Correlação entre a densitometria dos <i>spots</i> expressados nos géis 2D-PAGE e os parâmetros seminais pós-criopreservação de reprodutores bovinos Pantaneiros	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D-PAGE = eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

ALH = amplitude lateral de cabeça

ACBP = Associação de Criadores de Bovino Pantaneiro

aSFP = Proteína ácida do fluido seminal

ATP = Adenosina trifosfato

BCF = frequência de batimentos de cauda

BSA = Albumina sérica bovina

BSP = *Binder of Sperm Protein*

BS-RNase = Ribonuclease seminal bovina

cAMP = Adenosina Monofosfato Cíclica

Ca<sup>2+</sup> = Íons de cálcio

CASA = Computer-assisted semen analysis

CE = Circunferência escrotal

C-FDA = Diacetato de 6-carboxifluoresceína

CONC = Concentração Espermática

DMai = % Defeitos espermáticos maiores

DMen = % Defeitos espermáticos menores

DNA = ácido desoxiribonucleico

DTot = % Defeitos espermáticos totais

DTT = Ditioneitol

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fe<sup>3+</sup> = Íons de ferro

FITC = isotiocianato de fluoresceína

GAG = Glicosaminoglicano

HBP = Heparin Binding Protein

HDL = lipoproteína de alta densidade

Hz = Hertz

IEF = Focalização isoeletrica

IP = Iodeto de propídeo

kDa = KiloDalton

Km<sup>2</sup> = quilômetro quadrado

LDL = lipoproteína de baixa densidade

LIN = linearidade

M = molar

mA = miliampere

MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1

mg = miligrama

MI = Membrana íntegra

MIAI = Membrana íntegra acrossoma íntegro

mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

MOT = Motilidade Espermática

Mr = Massa molecular relativa

NEPHGE = Eletroforese em gel de pH não equilibrado

nm = nanômetro

OPN = Osteopontina

PBS = Tampão fosfato salina

PGDS = prostaglandina D-sintetase

pH = potencial de hidrogênio

pI = Ponto Isoeletrico

PNA = Lecitina de *Arachis hypogaea* ou peanut agglutinin

ppm = partes por milhão

RNA = ácido ribonucleico

SDS = dodecil-sulfato de sódio

SPMI = Inibidores de motilidade do plasma seminal

Sptz = Espermatozoide

TIMP-2 = Inibidor tecidual de metaloproteinase 2

V = volts

VAP = velocidade média do trajeto

VCL = velocidade curvilínea

VE = Volume do ejaculado

Vh = volts x hora

VSL = velocidade retilínea

VTC = Volume testicular cálculo do cilindro

W = Watt

$\mu\text{g}$  = micrograma

$\mu\text{L}$  = microlitro

$\mu\text{m}$  = micrômetro

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção da diversidade de recursos genéticos animais é vital para qualquer sistema de produção, assim como é fundamental para garantir a segurança alimentar, principalmente diante das atuais taxas de crescimento demográfico. No entanto, a biodiversidade vem diminuindo e, além disso, se estima que em um futuro próximo várias mudanças possam afetar gravemente os sistemas pecuários. Dentre elas destacam-se as evidentes mudanças climáticas globais, a evolução da resistência química dos patógenos, as novas demandas de mercado e as doenças emergentes. Sendo assim, as raças que se adaptarem a estas novas condições podem ser indispensáveis para garantir a produção de alimentos no futuro (FAO, 2007; SODHI & EHRLICH, 2010).

Quando uma raça é extinta antes da completa identificação dos seus atributos adaptativos – que são resultado da interação complexa entre vários genes com o meio ambiente – os recursos genéticos que poderiam contribuir de maneira notória para a promoção da saúde animal e para a produtividade são perdidos para sempre (FAO, 2007; SODHI & EHRLICH, 2010). Além das razões supracitadas, o fato de que as raças refletem a identidade histórica e cultural de populações, sendo um “patrimônio vivo da humanidade”, também tem justificado os esforços para a conservação de raças localmente adaptadas.

Em algumas situações, a criação de bovinos localmente adaptados por pequenos produtores é recomendada. Devido às características como rusticidade e serem de pequeno a médio porte, por conseguinte necessitando de investimentos menores quando comparado a raças altamente especializadas, esses animais podem ser fonte de renda para esta parcela do agronegócio brasileiro.

Com aproximadamente 500 anos de seleção natural, o bovino Pantaneiro, adquiriu características únicas de adaptação às condições edafoclimáticas do Pantanal

brasileiro. Mesmo sendo um recurso genético animal tão importante, o bovino Pantaneiro faz parte da lamentável estatística que mostra que cerca de 50% da população bovina adaptada ao clima tropical brasileiro está em processo de extinção ou já se tornou extinta (PRIMO, 1992; EGITO, 2007; MARIANTE *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012). Apesar disso, ainda há grandes lacunas no conhecimento acerca das características adaptativas deste recurso genético que podem ser importantes para fins de pesquisa, de produção ou para atender a outras necessidades humanas (FAO, 2007). Porém, para se justificar a conservação de uma raça faz-se necessário, em princípio, conhecer seus aspectos fisiológicos para, posteriormente, identificar e estimular os potenciais usos da mesma.

A criopreservação de gametas é uma ferramenta estratégica que permite preservar material genético para utilização futura. Na criopreservação de espermatozoides, a utilização de modernas técnicas criogênicas tem demonstrado crescente progresso (MARIANTE *et al.*, 2011). No entanto, existe grande variação de resultados tanto na qualidade quanto no potencial fecundante dos espermatozoides submetidos ao estresse térmico pelo frio, mesmo em animais com boa avaliação do sêmen antes da criopreservação. Em geral, alterações na capacidade funcional da célula durante o processamento reduzem a motilidade e viabilidade espermática, ocorrendo perdas em torno de 50% de espermatozoides viáveis (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Diversos métodos são utilizados para tentar estimar a eficiência reprodutiva do touro como, por exemplo, a mensuração da biometria testicular, a avaliação da cinética espermática, os testes de avaliação de integridade espermática, dentre outros. Embora todos estes métodos apresentem boa acessibilidade às técnicas e facilidade de execução, estes podem ser insuficientes para predizer as relações existentes entre a dinâmica dos parâmetros seminais e o potencial reprodutivo do touro. Várias pesquisas indicam que essas divergências nos resultados da criopreservação possam estar associadas à variação da composição do plasma seminal entre animais e mesmo entre ejaculados, principalmente quanto aos constituintes proteicos (WATSON, 2000; STRZEZEK *et al.* 2005). Estudos recentes têm demonstrado a existência de uma relação entre a composição proteica do plasma seminal, a congelabilidade do sêmen e a fertilidade em várias espécies, como por exemplo, em humanos (AUTIERO *et al.*, 1991), bovinos (RONCOLETTA *et al.*, 2000; JOBIM *et al.*, 2009), ovinos (BARRIOS *et al.*, 2000; CARDOZO *et al.*, 2006), bubalinos (HIRON *et al.*, 2006), peixes (ZILLI *et al.*, 2005) e em suínos (CASAS *et al.*, 2009). As modificações estruturais e bioquímicas da superfície espermática ocorridas durante a criopreservação do sêmen já são conhecidas, porém a literatura

ainda é bastante contraditória acerca de questões sobre a relação entre os mecanismos da crioinjúria espermática e a presença ou a perda de proteínas do plasma seminal. Por vezes, se desconhece a forma de proteção ou os possíveis efeitos negativos na qualidade espermática pós-criopreservação conferida por essas proteínas (PRUIT *et al.*, 1993; SCHÖNECK *et al.*, 1996; MAXWELL *et al.* 2007; MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008; VASCONCELOS, 2009).

A técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) tem sido o método de escolha para estudar a proteômica do plasma seminal e sua relação com os parâmetros do sêmen criopreservado, revelando resultados promissores. Neste contexto, potenciais marcadores bioquímicos identificados por meio desta técnica podem ser utilizados como uma ferramenta valiosa para predizer com mais acurácia a congelabilidade do sêmen e a fertilidade em reprodutores.

### **1.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros e relacioná-lo com a congelabilidade do sêmen.

### **1.2 Objetivos Específicos**

Caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros.

Correlacionar parâmetros espermáticos do sêmen fresco e congelado com o perfil proteico do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros.

Verificar diferenças no perfil proteico do plasma seminal entre reprodutores com sêmen de melhor e de pior congelabilidade.

Identificar possíveis marcadores proteicos para a congelabilidade do sêmen no plasma seminal de reprodutores Pantaneiros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Bovino Pantaneiro

Bovinos não têm ocorrência natural no continente americano, tendo sido introduzidos nestes territórios nos primórdios da colonização para garantir a manutenção dos povoados, com o fornecimento de leite, carne, de locomoção e tração de veículos (BOAVENTURA, 2005). Consta que os primeiros registros de bovinos, exemplares de raças ibéricas, que chegaram às Américas, datam de 1524. No Brasil, o primeiro registro rastreável é do ano de 1534. Em menos de 40 anos a espécie se dispersou para todos os países Sul-Americanos (PRIMO, 1992).

Após quase 500 anos de processos adaptativos e de miscigenação entre raças, os bovinos europeus evoluíram e adquiriram características que permitiram sobrevivência em condições adversas de ordem sanitária, de manejo e de clima encontrados nos ecossistemas a que foram expostas (PELLEGRIN *et al.*, 1997). Isso ocasionou mudanças tanto no comportamento quanto na fisiologia desses animais. Assim, no bioma Pantanal, surgiu um tipo local com características únicas de adaptação: o bovino Pantaneiro (Figura 1), também conhecido como “Tucura”, “Jofreano” (referência a Porto Jofre, que antes da rodovia Transpantaneira foi um ponto de referência no caminho de terra que chegaria a Corumbá) ou “Cuiabano” (MAZZA *et al.*, 1989; 1994; ABREU *et al.*, 2000; MENDES *et al.*, 2012).



Figura 1: Bovino Pantaneiro, Fazenda Nhumirim, Embrapa Pantanal, Corumbá-MS. Fonte: Arquivo pessoal

O Pantanal é caracterizado por topografia plana em geral, com solos inundáveis durante grande parte do ano. O clima é quente, com estação seca de maio a setembro e estação chuvosa de outubro a abril (JUNK *et al.*, 2006). As grandes distâncias das planícies e a falta de cercas permitiram que a raça se espalhasse e se reproduzisse. O bovino Pantaneiro consegue produzir com baixos investimentos em uma região de clima inóspito para outras raças. São animais capazes de se alimentar durante várias horas em pastos alagados, suportar períodos de seca prolongada, quando há escassez de pasto e de água. A tudo isto, soma-se a baixa qualidade do solo e dos ciclos das pastagens nativas. Estes fatos tornam evidente a resistência genética a doenças, a rusticidade, a fertilidade e a adaptabilidade da raça (ABREU *et al.*, 2002; PRIMO, 1992).

Os animais que formaram o bovino Pantaneiro foram inseridos no Pantanal no fim do século XVI e início do século XVII, em um momento de disputa de território durante as expedições na Bacia do rio Prata, época em que fronteiras eram pouco definidas (NEVES, 1980). Segundo Mazza e colaboradores (1994), o Pantaneiro descende de raças bovinas espanholas tendo também influência indireta das raças portuguesas, através do cruzamento com raças já adaptadas como o Franqueiro e o Curraleiro/Pé-duro. Athanassof (1957), porém, compara as características fenotípicas do Pantaneiro com as raças portuguesas, afirmando que esta se filia ao tronco *Bos taurus ibericus* devido a sua semelhança com as raças Mirandesa e Brava.

Estes animais apresentam porte pequeno a médio; linha dorso lombar geralmente reta; focinho negro e em 73% dos animais há um anel branco em seu redor;

chifres arredondados saindo lateralmente para cima e para frente; orelhas pequenas com presença de pelos na parte interna; pelagem predominantemente da cor amarelo-avermelhada, com tonalidades mais escuras nas extremidades e pelos brancos na porção ventral; e cauda fina, de inserção alta. São de temperamento dócil, quando manejados constantemente, tornando-se bravios quando mantidos isolados (MAZZA *et al.*, 1994).

A pecuária extensiva é a principal atividade econômica na região Pantaneira e o bovino Pantaneiro foi a base desta durante aproximadamente 300 anos (MAZZA *et al.*, 1994). No entanto, ao final do século XIX e início do século XX, raças altamente produtivas e especializadas foram importadas e foram realizados cruzamentos absorventes indiscriminadamente com as raças locais, levando à drástica redução ou mesmo à substituição dessas populações (EGITO *et al.*, 2002). Embora o Pantaneiro seja menos produtivo que raças especializadas, este difere destas por possuir características adaptativas às condições edafoclimáticas da região onde sofreu um longo processo de seleção natural (RANGEL *et al.*, 2004). Um exemplo disso é a constatação de que apesar do peso ao nascer do Nelore superar o do Pantaneiro, as taxas de nascimentos e desmama deste, são maiores que as observadas em rebanhos Nelore da região (ABREU *et al.*, 2000).

Há um notável índice de variabilidade genética nas populações bovinas criadas no Brasil, sendo que as raças localmente adaptadas têm riqueza alélica significativamente mais alta do que raças especializadas e zebuínas. Porém o número extremamente reduzido de animais, especialmente o pequeno número de reprodutores, além da distância geográfica entre os rebanhos tornaram-se fatores limitantes para a troca de material genético e está levando a um processo de endogamia nos núcleos de conservação (EGITO, 2007).

Por ser considerado um recurso genético importante e ameaçado de extinção, em 1984 foi implantado o núcleo de conservação do bovino Pantaneiro. Desde então são realizadas pesquisas e atividades relacionadas à conservação, manutenção da variabilidade genética, estudos de características produtivas e reprodutivas e uso da raça. Além disso, a pesquisa também está voltada para o desenvolvimento de programas de melhoramento animal para áreas inundáveis, nos quais o uso da raça pode ser requerido no futuro. Assim, haveria o aproveitamento de modo sustentável dessas áreas e promoveria a conservação desses ambientes, como fonte para o turismo cultural, ecológico e gastronômico. Para este foco, os estudos das características adaptativas são de primordial importância (ABREU & MCMANUS, 2000, ABREU *et al.*, 2000; PRIMO, 1992).

Aos poucos o bovino Pantaneiro vem conquistando o reconhecimento público. A lei estadual nº 9.393, de 21 de junho de 2010, reconheceu o bovino Pantaneiro como Patrimônio Cultural e Genético do Estado de Mato Grosso, por constituir patrimônio natural portador de referência à identidade, à ação e à memória da sociedade mato-grossense. Mais recentemente, em 24 de abril de 2013, foi fundada uma Associação de Criadores de Bovino Pantaneiro (ACBP). Dentre os objetivos da associação estão: estabelecer os padrões fenotípicos da raça, fazer o registro genealógico, reunir e cadastrar criatórios como forma de promover o desenvolvimento e o melhoramento do rebanho e incentivar os estudos sobre esses animais. A criação de uma associação de criadores é fundamental para que haja avanços em relação ao registro da raça junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Isso proporcionará a valorização da mesma, possibilitando a comercialização de produtos com agregação de valor (marca, indicação geográfica, indicação de origem protegida), estimulando, assim, o interesse de outros produtores em criar os animais.

Entretanto, apesar dos esforços das instituições, a raça ainda encontra-se em risco de extinção (ABREU *et al.*, 2007).

## **2.2 Aspectos estruturais e funcionais do espermatozoide**

O espermatozoide (Anexo A) é uma célula altamente especializada em estrutura e função, sendo o produto final do processo de espermatogênese. Após sucessivas fases mitóticas, meióticas e pós-meióticas ocorridas no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, o espermatozoide torna-se hábil a combinar seu pró-núcleo com o pró-núcleo de um ovócito para dar início ao processo que originará a próxima geração (EDDY, 2006; CHENG *et al.*, 2004; GARNER & HAFEZ, 2004).

Desde o início do século XX, as principais características da morfologia do espermatozoide são conhecidas, mas a associação entre as funções mais importantes com cada região da célula só veio a ser entendida, após a segunda metade deste período, à medida que houve avanços na área da biotecnologia. Em mamíferos, esta célula tem duas partes principais, a cabeça e a cauda ou flagelo, que são unidas pelo colo (EDDY, 2006; SUTOVSKY & MANANDHAR, 2006). O espermatozoide bovino mede cerca de 60 a 70  $\mu\text{m}$  de comprimento, sendo que a cabeça representa 8 a 10  $\mu\text{m}$ . Em animais ungulados, carnívoros e primatas o espermatozoide tem cabeça achatada. No touro esta tem cerca de 4  $\mu\text{m}$  de largura

e 0,5 µm de espessura (BEARDEN & FUQUAY, 1997). As estruturas que compõem a cabeça são basicamente o núcleo, o acrossoma, estruturas do citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma. O núcleo é formado por uma massa de DNA, denominada de cromatina, e é anteriormente coberto pelo acrossoma. Durante a espermatogênese a cromatina sofre um processo de ultracompactação devido à substituição das histonas, ricas em lisina, pelas protaminas, ricas em cisteína e arginina (SETCHELL, 1993). O acrossoma é uma grande vesícula citoplasmática repleta de múltiplas enzimas hidrolíticas que recobre até dois terços da porção anterior da cabeça, localizando-se entre a face interna da membrana plasmática e o núcleo. Esta vesícula, originária do complexo de Golgi durante a fase de espermátide, é limitada pela membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa. A membrana acrossomal interna está disposta sobre a membrana nuclear, enquanto a membrana acrossomal externa contacta o lado interno da membrana plasmática (EDDY, 2006; JOHNSON, 1994).

A cauda ou flagelo é constituída principalmente pelas seguintes estruturas: o axonema ou filamento axial, que se estende por toda a cauda; a bainha de mitocôndrias; e a bainha fibrosa. Esquemáticamente, o flagelo do espermatozoide pode ser dividido em quatro segmentos: o colo, a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal (EDDY, 2006; SUTOVSKY & MANANDHAR, 2006). Na parte central do flagelo encontra-se o axonema, composto por nove microtúbulos externos e por dois microtúbulos simples centrais. As fibras densas externas são adjacentes ao axonema (GARNER & HAFEZ, 2004). A peça intermediária é envolvida pela bainha mitocondrial e a peça principal é definida pela bainha fibrosa. Esta última é uma estrutura do citoesqueleto que circunda o axonema e as fibras densas externas e ainda contribui para o controle e restrição do movimento flagelar (EDDY, 2006; SUTOVSKY & MANANDHAR, 2006). A principal função desse arranjo helicoidal de mitocôndrias, a bainha mitocondrial, é disponibilizar energia à célula, via fosforilação oxidativa, convertendo vários substratos em ATP (BEARDEN & FUQUAY, 1997; MANELLA, 2000). A peça terminal contém os microtúbulos axonemais, o final das fibras densas externas e a bainha fibrosa (EDDY, 2006). Vários elementos que compõem o flagelo geram a força necessária para o movimento em ondas que propulsiona o espermatozoide para frente (BEARDEN & FUQUAY, 1997).

As membranas espermáticas – plasmática, acrossomal, mitocondrial e nuclear – são formadas por complexos de proteínas e lipídeos anfipáticos, que pelo fato de não terem ligações covalentes entre si, constituem um mosaico fluido. A membrana plasmática ou plasmalema envolve toda a célula. A fluidez da membrana permite que a mesma desempenhe

suas funções de interação com o meio. Assim, as proteínas se difundem e interagem melhor entre si, o que é essencial, por exemplo, para a sinalização celular (ALBERTS *et al.*, 1998). O estado de fluidez é influenciado principalmente pela composição de fosfolípidos, pela presença do colesterol e também pela temperatura (STRYER, 1992; HAMMERSTEDT *et al.*, 1990). Nenhuma célula, em mamíferos, passa por tantas variações de temperatura durante o ciclo de vida quanto o espermatozoide (WOLF *et al.*, 1990). Quanto aos fosfolípidos, os principais tipos presentes na bicamada são a colina, o inositol, o glicerol, a serina, glicosíngolipídeos e esteroides. Já o colesterol, principal esteroide dos espermatozoides ejaculados, é constituído de moléculas pequenas e rígidas e, portanto, de acordo com a proporção colesterol/fosfolípido a bicamada pode ser mais ou menos fluida (ALBERTS *et al.*, 1998; CROSS, 1998).

Em cada domínio da membrana as interações entre as moléculas diferem, modificando sua composição, proporção lipídeo/proteína e função. Isso resulta em uma compartimentalização da membrana plasmática (PARKS & GRAHAM, 1992). No espermatozoide há três regiões da membrana que são altamente especializadas: a cabeça, que interage com o ovócito; a peça intermediária, que contém a bainha mitocondrial, responsável por produzir energia; e o flagelo, responsável pelo movimento da célula. Na cabeça, a membrana plasmática tem dois domínios, um na região acrossomal e outro na região pós-acrossomal. Na região acrossomal esta ainda pode ser dividida em segmento marginal, segmento principal e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal constituem a capa ou capuz acrossomal. A região pós acrossomal é sustentada por uma estrutura chamada de bainha pós-acrossomal ou lâmina densa pós-acrossomal (EDDY, 2006; FLESCHE & GADELLA, 2000; SETCHELL, 1993).

A composição das membranas também sofre modificações durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo, no momento da exposição aos fluidos das glândulas acessórias e mesmo no trato reprodutivo da fêmea. Neste percurso alguns componentes se perdem enquanto outros migram, havendo mudanças na sua organização. Isso indica que esses componentes são porções dinâmicas da célula. E quando há modificações na interação dessas moléculas a função da membrana pode ser alterada (EDDY, 2006; FLESCHE & GADELLA, 2000).

A capacitação espermática é um evento complexo, necessário para que ocorra a fecundação. Este fenômeno resulta de uma série de alterações na membrana plasmática as quais permitem que ocorra a reação acrossômica completa. Após a ejaculação alguns fatores

presentes no plasma seminal interagem com a membrana espermática alterando a dinâmica dos fosfolipídeos, promovendo uma redução na relação colesterol/fosfolipídeo, o que diminui a microviscosidade da membrana, reduzindo a adesão entre os fosfolipídeos. Após este primeiro efluxo de colesterol da membrana, fatores presentes no trato reprodutivo da fêmea induzem a um segundo efluxo de colesterol, findando o processo de capacitação. O cálcio, o bicarbonato de sódio e a albumina são elementos importantes na capacitação. O bicarbonato parece atuar na redistribuição de colesterol na membrana, facilitando o sequestro desse lipídeo pela albumina. Possivelmente, o cálcio se liga à enzima adenilato ciclase, que eleva a quantidade de AMP cíclico (cAMP), o que resulta na ativação de proteínas quinases como a fosfoquinase A, induzindo a fosforilação da tirosina da proteína espermática. Também há influxo de cálcio. Essa fosforilação tem relação com o desencadeamento dos processos de hiperativação e início da reação acrossômica. Após a completa capacitação o processo de reação acrossômica se inicia rapidamente. A reação acrossômica se dá, fisiologicamente, com a elevação intracelular da concentração de mediadores iônicos da exocitose (como o cálcio, por exemplo) ou pode ser induzida artificialmente na presença de outros fatores, como lipídeos exógenos e outras substâncias que induzem a essas mudanças na membrana, como ocorre no processo de criopreservação. Em seguida ao aumento desses mediadores intracelulares, principalmente o cálcio, a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa se fundem formando vesículas, pelas quais o conteúdo é liberado por exocitose (ALBERTS *et al.*, 1998; CROSS, 1998; FLESCHE & GADELLA, 2000).

A membrana plasmática íntegra é auto selante e seletivamente permeável. Há relatos da existência de diferenças entre espécies quanto ao grau de permeabilidade da membrana à água. E isso pode explicar a maior ou menor sensibilidade espermática aos procedimentos de criopreservação de cada espécie (CURY *et al.*, 2000). Considerando-se esta dinâmica dos componentes da membrana e a existência das crioinjúrias na célula espermática, a diferença entre a composição da membrana plasmática do sêmen fresco e do congelado pode ser a chave para elucidar as discrepâncias encontradas na congelabilidade e fertilidade do sêmen criopreservado.

### 2.3 Plasma seminal

O plasma seminal é uma secreção fisiológica formada a partir da mistura das secreções testiculares, epididimárias, dos ductos deferentes e, em maior parte, das glândulas sexuais acessórias (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). O volume e a composição do fluido seminal variam muito entre espécies, entre indivíduos e mesmo entre ejaculados e estações do ano (VILLEMURE *et al.* 2003; JOBIM *et al.*, 2004; STRZEZEK *et al.* 2005; CARDOZO *et al.*, 2006; CHACUR & MACHADO NETO, 2007; MOURA *et al.*, 2010). Neste contexto, há também a influência evolutiva da anatomofisiologia do trato reprodutivo masculino e feminino que determina as características seminais espécie-específicas (JOBIM *et al.*, 2004). A composição bioquímica do plasma seminal também é afetada pelo método de colheita de sêmen, visto que dependendo da técnica de colheita uma glândula acessória pode ser muito estimulada em detrimento de outra, e pela frequência das colheitas (VASCONCELOS, 2009). Este fluido contém eletrólitos, principalmente o sódio e o cloreto (que influenciam diretamente na osmolaridade do meio e das células), carboidratos, ácido ascórbico, citrato, aminoácidos, prostaglandinas, esteroides, enzimas, amins, além de grande volume de água e uma vasta quantidade de peptídeos (JOBIM *et al.*, 2004). O plasma seminal funciona como um tampão e meio nutriente para os espermatozoides. Em touros e carneiros o pH do plasma seminal é levemente ácido, já nos suínos e garanhões é levemente alcalino (BEARDEN & FUQUAY, 1997; BALL & PETERS, 2004). Todos estes componentes têm funções essenciais para a sobrevivência dos espermatozoides, como manutenção adequada do pH e da osmolaridade, e também como fonte de energia e meio nutriente para estas células (JOBIM *et al.*, 2004). Esta abundância de componentes no plasma seminal se deve à escassez de meio intracelular do espermatozoide e visa compensar isto (AITKEN & BAKER, 2004).

Em todas as fases da produção da célula espermática, esta entra em contato com substâncias específicas do plasma seminal. No epidídimo dos bovinos o espermatozoide encontra altas concentrações de carnitina, glicerilfosforilcolina, ácido salicílico e, também, os principais cátions do fluido seminal, o sódio e o potássio. As ampolas secretam frutose e citrato. Já as vesículas seminais, responsáveis por até 60% do total do ejaculado, detém o conteúdo mais abundante em proteínas, além de altas concentrações de frutose e a maioria das prostaglandinas do fluido seminal (JOBIM *et al.*, 2004). A próstata produz uma secreção ácida contendo minerais, putrescina, espermidina e espermina. Sendo que a putrescina, uma

diamina, e as duas últimas, poliaminas, são envolvidas em diversos processos biológicos. Enzimas representam a maior parte da secreção prostática e vesicular e são associadas, geralmente, à membrana. Em contraste com estas duas glândulas acessórias, as bulbouretrais tem uma secreção mais alcalina (MILLER & AX, 1988).

Dentre os constituintes mais importantes do plasma seminal, destacam-se as proteínas. Estas exercem diversas funções na regulação das funções espermáticas. Como citado anteriormente, elas modificam as membranas e podem influenciar o metabolismo dos espermatozoides, além de conferir proteção contra efeitos oxidativos e imunológicos oriundos do aparelho reprodutor feminino.

Em várias espécies animais há relatos de que as variações na composição proteica do plasma seminal são relacionadas à congelabilidade do sêmen (JOBIM *et al.*, 2004; RONCOLETTA *et al.*, 2013), à fertilidade do macho (RONCOLETTA *et al.*, 2013; KILLIAN *et al.*, 1993) e também com características do sêmen como a motilidade (SALVADOR *et al.*, 2004). Porém, ainda não há um consenso sobre as influências inibitórias ou protetoras do plasma seminal na preservação do sêmen (LEAHY & GRAAF, 2012). Sendo assim, as nuances sobre este mérito ainda são especulativas. Alguns autores atribuem ao plasma seminal tanto a manutenção da motilidade e viabilidade espermática em bovinos, suínos e ovinos quanto a prevenção da capacitação espermática prematura (PRUIT *et al.*, 1993; MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008; VASCONCELOS, 2009). Outros associaram a ele efeitos negativos na qualidade espermática pós-criopreservação (SCHÖNECK *et al.*, 1996; MAXWELL *et al.* 2007).

É bem estabelecido que os componentes do plasma seminal desempenham funções importantes nos processos relacionados com a capacitação espermática, estabilidade de membrana, viabilidade e motilidade das células espermáticas, afetando o metabolismo do espermatozoide (MOURA *et al.*, 2010; CHACUR & MACHADO NETO, 2007). Segundo Muiño-Blanco e colaboradores (2008), algumas proteínas do plasma seminal exercem funções específicas na regulação da função espermática e na fertilidade. Sabendo-se disto, torna-se útil a identificação de marcadores moleculares fisiológicos que caracterizem os animais com boa qualidade seminal pós-criopreservação. As proteínas do plasma seminal têm sido alvo destas pesquisas (WATSON, 1995). E, ainda, algumas proteínas têm maior prevalência em animais com sêmen de alta congelabilidade, ao passo que são menos frequentes em animais com sêmen de baixa congelabilidade.

Segundo Chacur e Machado Neto (2007), a sazonalidade influencia diretamente na presença ou ausência de bandas específicas de proteínas no plasma seminal em touros. Cardozo *et al* (2006) atribuíram estas mudanças à variação da concentração de gonadotrofinas e dos respectivos receptores testiculares de acordo com a estação do ano, o que provavelmente afeta a função endócrina das gônadas e a secreção da vesícula seminal e epidídimo.

### **2.3.1 Proteínas relacionadas com a proteção espermática**

No plasma seminal existem diversas proteínas que atuam na proteção dos espermatozoides contra os danos causados a eles desde o momento da sua produção até a chegada ao trato reprodutor feminino (MOURA *et al.*, 2011). Para um bom funcionamento dos sistemas aeróbicos é preciso haver equilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO's) gerada, em parte pelos espermatozoides, e a quantidade eliminada pelo sistema antioxidante celular. Em linhas gerais, o estresse oxidativo ocorre quando o sistema antioxidante celular não consegue eliminar o excesso destas substâncias oxidantes produzidas ou ERO's (KISO *et al.*, 2013).

A glutathione peroxidase é uma das principais enzimas de proteção espermática presente no epidídimo e na membrana espermática de várias espécies (PERRY *et al.*, 1992; DACHEUX *et al.*, 2005). A função antioxidante desta glicoproteína consiste principalmente na redução do peróxido de hidrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

A lactoferrina, uma glicoproteína ligadora de ferro, desempenha diversas funções biológicas tais como atividade antimicrobiana, antiparasitária, imunomodulatória e antineoplásica, além de atuar no transporte de íons de  $Fe^{3+}$  (ADLEROVA *et al.*, 2008). No sêmen, o ferro serve como um catalisador na produção de ERO's. Em pequenas quantidades, as ERO's são necessárias para manter a função espermática normal, porém o excesso pode ser prejudicial resultando em danos celulares, que podem acarretar a perda da capacidade fecundante do espermatozoide, como: redução da motilidade espermática, perda de ATP, indução da peroxidação da membrana lipídica, aumento da fragmentação do DNA e morte prematura de células espermáticas. Assim, a lactoferrina no sêmen pode atuar como um antioxidante natural, além de também ser sugerido que a mesma tem propriedades

antibióticas, devido à sua capacidade de sequestrar ferro e prevenir efeitos patogênicos sobre os espermatozoides (FURMANSKI, 1995; KISO *et al.*, 2013).

Em bovinos, a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), pertencente a família das espermedesinas, é uma glicoproteína secretada pelas glândulas acessórias e epidídimo que atua em eventos que protegem a célula espermática, como a prevenção da capacitação, preservação da integridade acrossomal e mitocondrial e regulação da motilidade (ROMERO *et al.*, 1997; MOURA *et al.*, 2011). A aSFP também cumpre importante papel no controle do estresse oxidativo no trato reprodutor masculino (EINSPANIER *et al.*, 1991; MOURA *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012). No touro, os espermatozoides são brevemente estocados na ampola antes da ejaculação. Neste momento as células entram em contato com altas concentrações de aSFP, o que restringe a motilidade espermática com a finalidade de poupar energia da célula. Já no trato reprodutivo da fêmea, as concentrações da aSFP diminuem por diluição, permitindo a rápida restauração do movimento do espermatozoide (KUMAR *et al.*, 2012). Contudo, quando há altas concentrações de aSFP no plasma seminal, o movimento espermático pode ser restringido e, assim, prejudicar a qualidade do sêmen criopreservado. Para ocorrer a fertilização *in vitro*, esta proteína precisa ser desligada da membrana espermática, sugerindo que a aSFP atue como fator decapacitante do espermatozoide bovino, contudo, esse efeito é concentração dependente. A alta concentração desta proteína pode ter efeito inibitório sobre a motilidade espermática e a atividade mitocondrial (SCHÖNECK *et al.*, 1996; JOBIM *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2012).

A albumina seminal é uma proteína de 66 kDa, considerada um antioxidante pela capacidade de absorver peróxidos de lipídeos, contribuindo para a proteção e integridade da membrana espermática. Há relatos de que a mesma auxilia na gametogênese e no metabolismo das células de Sertoli. Assim como as BSP's e a clusterina, a albumina também está envolvida no efluxo de colesterol e fosfolipídeos da membrana espermática, estando, portanto, envolvida na capacitação. A albumina apresenta correlação positiva com o percentual de células normais no sêmen de bovinos e o aumento da motilidade. Uma maior expressão desta proteína foi observada em touros de alta congelabilidade (CHACUR & MACHADO NETO, 2007; JOBIM *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2011). Outra proteína relacionada com a proteção espermática é a clusterina, uma glicoproteína de 75-80 kDa expressa na maioria dos tecidos dos mamíferos e está associada com a liberação de restos celulares e apoptose. No bovino, esta proteína é abundante no fígado, cérebro e testículos, estando presente ainda no plasma seminal, membrana espermática e epidídimo de várias

espécies, o que sugere seu papel na maturação espermática. No trato reprodutivo do bovino a clusterina participa de vários processos fisiológicos, ligando-se a espermatozoides anormais e aglutinando-os, o que pode prevenir danos oxidativos e inibir a lise induzida pelo sistema complemento (IBRAHIM *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2012). Porém, em ruminantes o conhecimento preciso sobre as funções da clusterina ainda é escasso. No homem, a clusterina possui sítios de ligação à heparina, indicando que pode regular o transporte e redistribuição de lipídeos no plasma sanguíneo (JOBIM *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2011; JUYENA & STELLETTA, 2012). A clusterina foi identificada em alta concentração no plasma seminal de animais de alta congelabilidade. Esta correlação positiva com a congelabilidade reforça a teoria de que esta proteína tem efeito protetor, por reduzir as crioinjúrias à membrana durante a criopreservação (JOBIM *et al.*, 2004). Já o excesso de clusterina nos espermatozoides tem correlação negativa com a fertilidade, indicando que houve uma espermatogênese imperfeita e/ou maturação epididimária irregular (KUMAR *et al.*, 2012).

### **2.3.2 Proteínas que participam da capacitação espermática**

Algumas moléculas são adsorvidas na superfície da membrana espermática durante o trânsito epididimário, assim como no momento da ejaculação, modulando a capacitação dos espermatozoides. As proteínas de ligação à heparina (HBP), por exemplo, se ligam a sítios específicos e regulam a capacitação mediada por heparina (JOBIM *et al.*, 2009). Em bovinos, as proteínas majoritárias fazem parte da família de proteínas ligadoras de fosfolipídeos do plasma seminal bovino (BSP's). Os principais membros desta família de proteínas são as proteínas BSP A1 e BSP A2, que juntas são conhecidas como PDC-109 (proteína com um grupo amina em uma extremidade ou N-terminal; D-ácido aspártico; e uma carboxila terminal na outra extremidade ou C-terminal, contendo 109 aminoácidos), a BSP A3 e a BSP 30-kDa. Recentemente houve uma mudança na nomenclatura dessas proteínas, a saber: BSP-A1/A2, BSP-A3 e BSP-30 são agora chamadas de BSP1, BSP3 e BSP5, respectivamente, sendo que as BSP's são coletivamente chamadas de *binder of sperm proteins*. Somente a PDC-109 ou BSP1 representa mais que 30% do total de proteínas do plasma seminal bovino (MOURA *et al.*, 2007; MANJUNATH *et al.*, 2009; JUYENA & STELLETTA, 2012; KUMAR *et al.*, 2012). Estas proteínas são secretadas pelas vesículas seminais e ampolas, têm caráter ácido, baixo peso molecular e se caracterizam por apresentar

domínios de fibronectina tipo II, sendo as principais HBP's no plasma seminal bovino (MANJUNATH *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012). As BSP's se ligam ao grupo colina dos fosfolipídeos da membrana espermática durante a ejaculação, promovendo o sequestro de colesterol, diminuindo a relação colesterol/fosfolipídeo na membrana e estimulando a capacitação espermática. No trato reprodutor feminino, assim que o espermatozoide chega ao oviduto, as BSP's interagem com fatores capacitantes como as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e a heparina (THÉRIEN *et al.*, 1998; CHACUR e MACHADO NETO, 2007; KUMAR *et al.*, 2012). Na criopreservação do sêmen, as BSP's se ligam às moléculas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo (componente mais utilizado nas formulações dos meios diluentes para sêmen de bovinos) e à membrana espermática. Estas lipoproteínas também contêm os colina-fosfolipídeos. A ligação ocorre de forma rápida e saturável, sendo demonstrado que mesmo após o congelamento estas proteínas continuam associadas à LDL, sugerindo que esta interação confira um efeito de crioproteção ao espermatozoide (MANJUNATH *et al.*, 2002; JOBIM *et al.*, 2009).

### **2.3.3 Proteínas envolvidas na reação acrossomal e na interação entre gametas**

Proteínas denominadas marcadoras de fertilidade, estão envolvidas na interação entre gametas e atuam como moléculas de ligação à zona pelúcida do ovócito (JOBIM *et al.*, 2009). Os carboidratos da matriz glicoproteica, que forma a zona pelúcida, parecem estar envolvidos na interação entre gametas (FLORMAN & WASSARMAN, 1985; MIRANDA *et al.*, 1997).

A fosfolipase A2 (PLA2) detectada no plasma seminal desempenha importantes funções na maturação espermática, na reação acrossomal e na fase inicial da fecundação, atuando na fusão entre espermatozoide e ovócito, apresentando correlação com a fertilidade em bovinos (SOUBEYRAND *et al.*, 1997; MOURA *et al.*, 2006, 2011).

A prostaglandina D-sintetase (PGDS) tipo lipocalina, uma proteína de 26 kDa, é associada à fertilidade de reprodutores (KILLIAN *et al.*, 1993) e foi encontrada em grande quantidade no sêmen de touros de alta congelabilidade (GERENA *et al.*, 1998; RONCOLETTA *et al.*, 2000). Seu exato papel na reprodução do macho ainda é desconhecido. Todavia, vários fatores indicam que ela pode estar envolvida tanto no desenvolvimento quanto na maturação do espermatozoide (GERENA *et al.*, 1998; KILLIAN *et al.*, 1993).

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína ácida, rica em ácido aspártico, ácido glutâmico e serina, que foi isolada pela primeira vez na matriz óssea bovina. Posteriormente, identificou-se que as fontes primárias dessa proteína no plasma seminal bovino são as vesículas seminais e as ampolas. A OPN se liga ao cálcio e interage com receptores da família das integrinas, que por sua vez são importantes na migração celular pelo epitélio seminífero (MOURA, 2005). A presença de complexos OPN-integrinas no fluido e epitélio do oviduto bovino comprova que esta proteína também desempenha importante papel no momento da fertilização. Estudos mostram que a OPN adere-se à membrana oocitária estando associada ao aumento da taxa de fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário, além de prevenir a polispermia em suínos e bovinos (MOURA, 2005; HAO *et al.*, 2006; ERIKSON *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2007; MONACO *et al.*, 2009). Apesar do fato desta proteína conter domínios de ligação à heparina, seu papel na capacitação espermática ainda é especulativo. Esta glicoproteína foi classificada, ainda, como uma citocina, principalmente, devido à sua participação na adesão e sinalização celular (JOBIM *et al.*, 2009). A correlação positiva da OPN com a congelabilidade do sêmen pode ser atribuída à modulação da função da membrana plasmática do espermatozoide, auxiliando na proteção da mesma durante a criopreservação (JOBIM *et al.*, 2009).

## 2.4 Eletroforese bidimensional

Eletroforese é uma técnica bioquímica que consiste na migração de partículas carregadas eletricamente, quando dissolvidas ou suspensas em um meio eletrolítico, através do qual uma corrente elétrica é aplicada (diferença de potencial). Esta técnica foi desenvolvida pelo químico Arne Tiselius em 1937, para o estudo de proteínas em soro e lhe rendeu o prêmio Nobel em 1948. Inicialmente era realizada em meio líquido e posteriormente foi aperfeiçoada com o uso de um meio suporte. A eletroforese é amplamente utilizada nas diversas áreas da biologia molecular, sendo aplicada na análise de enzimas, de proteínas e de ácidos nucleicos, além de ser útil também nas pesquisas em taxonomia, bioquímica, fisiologia e genética (vegetal, animal e de microrganismos) (BRAMMER, 2001). Eletroforese bidimensional, eletroforese 2-D ou simplesmente 2-D, é hoje a forma de eletroforese mais utilizada para análise e separação de proteínas. Em um material biológico contendo proteínas, como o plasma seminal, é provável que duas ou mais proteínas tenham propriedades

estruturais e bioquímicas razoavelmente semelhantes, assim sendo, tais moléculas serão separadas de forma mais efetiva por uma técnica que se utilize de pelo menos duas propriedades físicoquímicas distintas – daí o termo bidimensional (duas dimensões físicoquímicas). As duas propriedades usadas neste tipo de separação são: ponto isoelétrico e massa molecular. Em uma corrida eletroforética bidimensional em gel, as proteínas são separadas, primeiro em uma dimensão linear, depois em uma dimensão colunar, de modo que todas as moléculas sejam separadas entre si. Dentre as variáveis existentes no processo estão: a intensidade da corrente elétrica, a resistência do meio à migração de partículas e a diferença de potencial (ROCHA *et al.*, 2005).

Na primeira dimensão, denominada de focalização isoelétrica ou simplesmente IEF (Isoelectric focusing), as proteínas são separadas sob alta voltagem conforme seu ponto isoelétrico (pI). O pI é o ponto específico de pH (potencial de Hidrogênio ionizável de uma solução) no qual uma proteína se torna neutra (tem carga total igual a zero), permanecendo estática em solução, quando submetida a uma diferença de potencial elétrico. O processo se inicia quando a amostra biológica (por exemplo, plasma seminal) é aplicada sobre uma fita gelatinosa contendo um gradiente de pH ao longo de seu comprimento. Em seguida, esta fita é submetida ao potencial elétrico, por um determinado tempo. Proteínas com carga positiva migram em direção ao cátodo, enquanto as com carga negativa migram em direção ao ânodo. Assim, cada proteína migrará até o local da fita onde o pH anulará a carga elétrica desta molécula (ponto em que a carga total sobre a proteína se torna 0 – neutra), ou seja, até que seu ponto isoelétrico seja alcançado. Neste ponto, a proteína para de migrar, encerrando assim a primeira etapa da separação. O efeito da focalização isoelétrica é, portanto, manter as proteínas dispostas em uma faixa aproximada dos seus pontos isoelétricos e permitir que estas sejam separadas com uma diferença de carga muito pequena, que pode variar até 0,01 unidade de pH (VOET & VOET, 2006).

Na segunda dimensão, as proteínas serão agora separadas de acordo com suas respectivas massas moleculares relativas (Mr). A fita gelatinosa contendo as proteínas previamente separadas por diferença de pI será anexada linearmente na parte superior de um gel com forma quadrangular, que permitirá a migração destas proteínas, o que originará assim, colunas de segunda dimensão. Para tanto, nesta etapa, um potencial elétrico é aplicado novamente, mas em ângulo de 90 graus a partir da linha formada pela fita gelatinosa no primeiro campo. Nessa fase da separação aplica-se o princípio da peneira molecular. Uma vez que não há gradiente de pH nesse novo gel, pois é utilizado um sistema tampão na preparação

dos géis e também na solução que preenche a cuba eletroforética (recipiente que acondiciona os géis), a corrente elétrica aplicada separa as proteínas com base no peso molecular, no tamanho e na forma de cada uma, influenciando a taxa de migração pela matriz em gel. Proteínas maiores são arrastadas vagarosamente pelo gel e proteínas menores se locomovem mais rápido, se depositando na região mais baixa do gel (BRUNE & ALFENAS, 1998).

Ao final da corrida 2D, as proteínas estarão portanto, separadas no gel de acordo com suas respectivas massas moleculares e pI's, em bandas ou *spots*, que podem ser visualizadas por inúmeros métodos de coloração como o azul brilhante de Coomassie, nitrato de prata, fluorescência utilizando o brometo de etídio ou imunológicos (ROCHA *et al.*, 2005). As imagens dos géis corados podem ser arquivadas em *softwares* específicos, que permitirão diversas análises, como a contagem do número de *spots* por gel e mensuração da intensidade dos spots, dentre outras.

A técnica da eletroforese bidimensional foi proposta por Klose e O'Farrel em 1975 e passou por vários ajustes ao longo dos anos. Inicialmente a corrida eletroforética era feita em géis de agarose (LARSON & SALISBURY, 1954), depois se utilizaram géis de amido (VESSELINOVITCH, 1959), até que finalmente foram substituídos pela poliacrilamida, que é utilizada com sucesso até os dias de hoje. Neste processo evolucionário da técnica, o gel de poliacrilamida, um polímero de ligações cruzadas, foi um advento fundamental. Esta substância configura uma matriz química e fisicamente inerte, na qual as proteínas de menor massa molecular migram com facilidade até a parte inferior do gel, enquanto as de maior massa ficam retidas na parte superior. A porosidade da malha de poliacrilamida também pode ser ajustada de acordo com a concentração deste polímero, permitindo a criação de diferentes gradientes de separação. Quanto mais concentrada a solução de acrilamida, menor será o poro (ROCHA *et al.*, 2005). Além disto, durante o período de aperfeiçoamento da técnica eletroforética, mudanças no método original da IEF foram realizadas para corrigir problemas de instabilidade do gradiente de pH e déficit na incorporação da amostra. Após o desenvolvimento de gradientes de pH imobilizados em gel de poliacrilamida (IPG – Immobilized pH gel), essas limitações foram solucionadas (GÖRG *et al.*, 1985). Isso foi possível através da incorporação covalente de um gradiente de tampão com ácidos e bases em uma tira de gel de poliacrilamida no momento em que a mesma é moldada. Há uma ampla variedade de faixas de pH das tiras de gel. A escolha da faixa de pH que será mais eficiente na separação dos peptídeos é determinada pelas características do tipo de proteína da amostra a ser analisada.

Variações na temperatura, oriundas da condução elétrica, é um ponto crítico que influencia a mobilidade eletroforética. Altas temperaturas podem provocar diferentes gradientes térmicos e distorcer as migrações. Além disso, podem causar danos aos géis. Por isso durante toda a corrida 2D o sistema deve ser resfriado. Isto é feito, geralmente, com auxílio de um dispositivo apropriado imerso no meio tampão presente no interior da cuba eletroforética. Este dispositivo contém uma coluna de água fria que circula por todo o sistema. Ou ainda, outro método para manter a baixa temperatura no sistema é realizar a corrida em meio ambiente refrigerado a 4°C e com auxílio de um *cooler*, por exemplo (BRAMMER, 2001).

No âmbito da fisiologia da reprodução animal esta técnica está se tornando um método promissor na identificação de marcadores de fertilidade e de congelabilidade do sêmen de touros, para demonstrar o potencial genético de um indivíduo ou de uma raça (JOBIM *et al.*, 2004).

## **2.5 Criopreservação do sêmen bovino**

A criopreservação é um método que prepara uma suspensão de células para a estocagem em baixas temperaturas, podendo utilizar a refrigeração ou o congelamento (em temperaturas inferiores a -80°C). A criopreservação do sêmen tem por objetivo interromper completamente o metabolismo da célula espermática para manter suas características por um longo período. Esta técnica preserva a célula espermática para uso futuro, mas muitas vezes pode danificá-la ou até mesmo causar a morte da mesma. O êxito na criopreservação espermática dependerá da manutenção da função das estruturas vitais da célula após o descongelamento (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; WATSON, 1995).

No processo de criopreservação o sêmen passa por momentos distintos. Primeiro o sêmen é diluído, depois passa por uma etapa de resfriamento, prossegue com a fase de congelamento e, finalmente, a etapa de armazenamento e a de descongelamento. Durante essas etapas busca-se minimizar os danos causados pelo processamento às células espermáticas através de um arranjo harmônico na interação entre os espermatozoides e os meios crioprotetores, as curvas de resfriamento, de congelamento e de descongelamento (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

As células passam por uma série de desafios provocados pelas mudanças térmicas, que podem causar danos celulares devido às baixas temperaturas as quais os espermatozoides são expostos. Estes danos são conhecidos como crioinjúrias. As crioinjúrias podem ocorrer em qualquer etapa da criopreservação. Por ser praticamente impossível fazer uma análise detalhada das células quando as mesmas estão em estado semi-sólido e sob frio intenso, as crioinjúrias só são detectadas ao final do processamento. Nesse momento são relatados os prováveis pontos críticos que devem ser modificados no processamento (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990). Se estruturas celulares forem afetadas, diz-se que ocorreu um dano direto, como por exemplo a formação intracelular de cristais de gelo, que podem causar ruptura da membrana, e o aumento intracelular de solutos, resultantes da desidratação celular durante a criopreservação. Mas se houver modificações de ordem biofísica e bioquímica, que alterem as funções espermáticas principalmente as relacionadas à membrana plasmática, o dano é classificado como indireto (HOLT, 2000).

A sensibilidade ao choque térmico varia conforme os fatores intrínsecos e extrínsecos ligados ao espermatozoide, tais como: o grau de maturação celular, a composição e quantidade do plasma seminal, o conteúdo de colesterol na membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos. A relação fosfolípídeo/proteína na membrana plasmática também influencia na sensibilidade ao choque térmico. Durante o resfriamento, por exemplo, sabe-se que o colesterol mantém a estabilidade da membrana plasmática (WATSON, 1981).

À medida que a temperatura do sêmen decresce na etapa de resfriamento as propriedades físicas de todas as membranas espermáticas são alteradas. Os lipídeos migram pelos domínios da membrana plasmática, deixando de interagir com as proteínas específicas e mudando a própria conformação. Ocorre, então, um desequilíbrio da função de permeabilidade seletiva da membrana, permitindo o influxo de cálcio e sódio. Esta situação mimetiza o aumento intracelular do cálcio ocorrido na capacitação espermática, provocando alterações funcionais incompatíveis com a viabilidade celular. Algumas destas modificações metabólicas podem ser irreversíveis, podendo até mesmo culminar no rompimento da célula. Nesta fase de transição de temperatura, a penetração do crioprotetor (substância utilizada a fim de evitar danos aos espermatozoides durante a criopreservação) altera o volume celular e a membrana passa do estado líquido para o estado de gel. Então, a atividade enzimática e a produção de energia também diminuem (JANUSKAUSKAS *et al.*, 1999; WATSON, 1995). Tudo isto torna a curva de resfriamento o principal entrave no sucesso da criopreservação espermática (WATSON, 1995; HOLT, 2000).

Meios diluentes são utilizados a fim de evitar prejuízos à estrutura e função dos espermatozoides, decorrentes dos efeitos deletérios gerados pelas variações térmicas durante o processo de criopreservação. Os meios diluidores são constituídos de diversas substâncias que juntas visam propiciar proteção aos espermatozoides contra as baixas temperaturas. Esta proteção é alcançada através da estabilização do pH do meio, da neutralização de toxinas produzidas pelos espermatozoides, da proteção contra o choque térmico, da manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico da célula espermática, do fornecimento de nutrientes e energia, da estabilização de enzimas e da inibição do crescimento bacteriano (HOLT, 2000; HAFEZ & HAFEZ, 2004; CHACUR *et al.*, 2012). Devido à afinidade dos crioprotetores com a água e a propriedade de formar pontes de hidrogênio, estes são capazes de preparar o metabolismo dos espermatozoides para suportar os fenômenos das fases de resfriamento e de congelamento (AMANN & PICKETT, 1987).

A curva de congelamento também é de extrema importância na manutenção da integridade da membrana, que sofre alterações na estrutura e no volume. No início da fase de congelamento a água do meio extracelular cristaliza primeiro, sendo que a água do meio intracelular ainda se encontra em estado líquido, porém o frio já é intenso (-5°C - 10°C). Com o progressivo congelamento da água fora da célula, a osmolaridade do meio extracelular também aumenta gradativamente devido a alta concentração de solutos resultante (meio hipertônico), fazendo com que haja o egresso da água intracelular. Este processo de desidratação celular é importante para evitar a formação de cristais de gelo no citoplasma, pois os mesmos podem causar injúrias à estrutura da célula (MAZUR, 1984; AMANN & PICKETT, 1987). Mas a desidratação excessiva também é prejudicial à célula. O tempo de transição entre o momento da diminuição de volume intracelular e a restauração do mesmo após a entrada de crioprotetor não deve ser extenso. A alta concentração de solutos por um período prolongado pode causar a desnaturação de macromoléculas e alterações metabólicas irreversíveis. Isto é o que geralmente ocorre se a curva de congelamento for lenta demais. Em contrapartida, se a curva de congelamento for muito rápida, não haverá a desidratação suficiente dos espermatozoides e a formação de cristais de gelo intracelular será iminente, prejudicando a integridade da célula (MAZUR, 1984; GRAHAM, 1995; WATSON, 1995; WATSON, 2000; HOLT, 2000). Já a etapa de armazenamento no nitrogênio líquido, configura o estado de quiescência celular e não ocorrem danos nesta faixa de temperatura (Salamon & Maxwell, 2000).

Além das crioinjúrias na fase do congelamento, danos também podem ocorrer durante a fase de descongelamento, quando o espermatozoide retorna à temperatura fisiológica. Quando a célula é descongelada a uma taxa de descongelamento adequada, deve haver o efluxo do crioprotetor do interior da célula e o influxo de água para a mesma. O aumento da temperatura induz a uma reorganização dos lipídeos e proteínas da membrana, fazendo com que os efeitos decorrentes da migração destas moléculas sejam parcialmente revertidos. A membrana volta ao estado normal de fluidez e reestabelece suas funções. Outro ponto crítico é o momento da reidratação celular. Se a passagem de água para o interior da célula for rápida demais pode ocorrer a ruptura de membranas (WATSON, 1995; HOLT, 2000). Com isso, a fase de descongelamento é igualmente importante na manutenção da viabilidade celular. (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; WATSON, 1995). Segundo Mazur (1984) e Watson (1995), para que haja uma taxa de sobrevivência celular dentro dos limites mínimos aceitáveis, a escolha da taxa de descongelamento deve também considerar a curva de congelamento adotada.

Apesar dos efeitos benéficos do uso dos crioprotetores, citados anteriormente, estes também podem ser tóxicos ao espermatozoide (GRAHAM, 1995). Por isso, várias pesquisas são realizadas com o intuito de aperfeiçoar continuamente os meios diluentes para que atendam às exigências vitais do espermatozoide e para que reduzam sua citotoxicidade e a perda de células durante o processamento. No entanto, os componentes básicos destes meios não têm sido alterados. Para algumas espécies, a gema de ovo e o leite, permanecem como os ingredientes essenciais. A lipoproteína de baixa densidade (LDL), presente na gema de ovo previne o dano celular durante o resfriamento e congelamento. Dentre os mecanismos que melhor explicam esta proteção conferida pela LDL ao espermatozoide citam-se dois. Um deles assume que a associação da LDL à membrana plasmática forma um filme sobre a superfície da bicamada lipídica, formando uma barreira física. Além disso, os fosfolipídeos de membrana perdidos durante a criopreservação seriam substituídos pelos da LDL. Outro mecanismo de crioproteção proporcionado pela gema de ovo é a capacidade da LDL de se ligar, de forma específica e saturável, às proteínas BSP's prevenindo assim o efluxo de colesterol da membrana promovido por estas proteínas. As moléculas de LDL sequestram as BSP's presentes no plasma seminal, sendo que esta ligação ocorre até mesmo após o descongelamento do sêmen (WATSON, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000; MANJUNATH *et al.*, 2002; BERGERON & MANJUNATH, 2006).

Os crioprotetores são classificados, de acordo com a capacidade de atravessar a membrana plasmática, em crioprotetores penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes entram na célula, restaurando o volume que foi perdido no processo de desidratação celular gerado no início do congelamento. Nesta categoria de crioprotetores, as moléculas precisam ser pequenas e lipossolúveis, como o glicerol, o etilenoglicol, o propilenoglicol, o dimetilsulfóxido e a dimetilformamida, para que consigam atravessar a membrana e, então, exercer a função de manter a pressão osmótica intracelular e extracelular, reduzindo os efeitos danosos decorrentes da criopreservação. Entre eles, o glicerol tem sido o crioprotetor de escolha que, associado ao meio diluidor à base de Tris-gema de ovo, tem apresentado os melhores resultados na preservação das características seminais durante a criopreservação do sêmen bovino. Os crioprotetores não penetrantes são moléculas grandes e hidrossolúveis, que não atravessam a membrana plasmática, atuando no meio extracelular como solutos. Proteínas (da gema de ovo e do leite desnatado), açúcares, polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e amidas são exemplos de crioprotetores não penetrantes. Além de auxiliarem no controle da pressão osmótica, estes crioprotetores se ligam à bicamada lipídica estabilizando os fosfolípídeos e protegendo a membrana à medida que formam uma barreira física sobre a superfície celular (GRAHAM, 1995; HOLT, 2000).

Na avaliação espermática pós-descongelamento os parâmetros convencionais, como motilidade, vigor e morfologia, têm sido insuficientes para uma análise mais precisa da congelabilidade do sêmen e a avaliação da fertilidade do macho. Nesse ínterim, a viabilidade dos espermatozoides criopreservados tem sido avaliada de forma complementar e acurada pelos exames que aferem a integridade da membrana plasmática e de integridade acrossomal, por meio da associação de fluoróforos ou sondas fluorescentes. O espermatozoide capacitado e/ou com acrossoma reagido tem um tempo de vida limitado, reduzindo assim a fertilidade do animal. A avaliação espermática por método computadorizado (CASA) também é um recurso valioso, fornecendo dados detalhados, precisos e com repetibilidade para diferentes parâmetros acerca da cinética do sêmen humano ou nas espécies animais (WATSON, 1995; JANUSKAUSKAS *et al.*, 1999; CHACUR *et al.*, 2012).

Os reprodutores bovinos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta ou melhor congelabilidade e de baixa ou pior congelabilidade conforme o sêmen tolera os efeitos da criopreservação. Esta tolerância depende, principalmente, de características que são geneticamente determinadas, predispondo a sobrevivência do espermatozoide ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000).

## 2.6 Avaliação das injúrias espermáticas

Usualmente a avaliação do sêmen consiste em análise subjetiva de motilidade, percentual de espermatozoides com morfologia normal e estimativa da concentração de espermatozoides por dose. Porém, estas análises subjetivas são reportadas como imprecisas mesmo quando executadas por técnicos experientes. Com a evolução das biotécnicas, os sistemas de avaliação têm sido cada vez mais eficazes. Entretanto, nenhuma análise laboratorial isolada fornece todas as informações a respeito do potencial espermático (GRAHAM *et al.*, 1990).

### 2.6.1 Avaliação da motilidade espermática

Rotineiramente, o método mais utilizado para análise da cinética espermática é a avaliação subjetiva do percentual de espermatozoides móveis em uma amostra representativa de sêmen, através de microscopia óptica. Com o intuito de se obter uma avaliação mais exata e objetiva da motilidade espermática, foram propostos diversos métodos, tais como: passagem contínua, velocidade avaliada por laser, tempo de exposição à fotomicrografia, exposição múltipla de fotomicrografia, microcinematografia, videomicrografia e sistema de análise computadorizado do movimento espermático (CASA) (WATSON, 1995; JANUSKAUSKAS *et al.*, 1999; CHACUR *et al.*, 2012).

O sistema CASA foi desenvolvido para visualizar, digitalizar e analisar imagens consecutivas dos espermatozoides, fornecendo também resumos estatísticos das subpopulações espermáticas. As imagens obtidas são gravadas e analisadas separadamente por um microprocessador, que reconstrói a trajetória de cada espermatozoide. Além de mensurar o percentual de células móveis, características específicas do movimento espermático são quantificadas. São exemplos de características avaliadas: velocidade média do trajeto (VAP), velocidade retilínea ou progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos de cauda (BCF), linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) (MORTIMER, 2000).

Porém, devido às configurações do sistema CASA, este também apresenta algumas desvantagens. A identificação das células pelo sistema é feita com base em parâmetros pré-estabelecidos de acordo com a espécie animal (medida do número de *pixels* que a cabeça cobre). Eventualmente, o sistema não faz a discriminação entre *debris* celulares ou aglutinações e espermatozoide. Pode ocorrer também a junção da trajetória de dois espermatozoides após colisão entre si. Contudo, os impactos desses problemas não anulam os benefícios do sistema e para alguns deles pode haver alternativas que reduzam as chances de ocorrência (MORTIMER, 1997; MORTIMER, 2000).

### **2.6.2 Avaliação da morfologia espermática**

O exame morfológico da célula espermática também tem sido importante como ferramenta de controle de qualidade do sêmen. O sistema de classificação morfológica do sêmen foi instituído por Langerlöf (1934). Posteriormente, uma modificação acerca da classificação dos defeitos de morfologia foi feita por Rao (1971), que classificou os defeitos em dois grupos: defeitos maiores e menores, de acordo com o prejuízo causado à fertilidade. E em 1973, Bloom subdividiu os defeitos de morfologia em defeitos primários e secundários (CHACÓN *et al.*, 2001).

As principais alterações na morfologia avaliadas na cabeça do espermatozoide são determinadas quanto à forma, tamanho, duplicidade e defeitos de acrossomo. Na peça intermediária quanto à amplitude, dimensão, duplicação, fratura e inserção. E, finalmente, as flagelares quanto a tamanho, calibre, enrolamentos, dobraduras e duplicações, inclusive quanto à presença de gotas citoplasmáticas. Os diversos graus de alterações na morfologia da cauda estão dentre os defeitos espermáticos mais comuns (CHENOWETH, 2005).

Existem diversas técnicas para avaliar a morfologia espermática, por meio de preparação úmida ou por esfregaços corados. Dentre as mais utilizadas tem-se a microscopia de campo claro e/ou de contraste de fases, contraste interdiferencial, preparações utilizando corantes e microscopia eletrônica de transmissão (BARTH & OKO, 1989).

### 2.6.3 Avaliação da integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal do espermatozoide

Visando obter um maior número de informações acerca da qualidade espermática, ultimamente tem se recomendado a realização conjunta de outras técnicas além das citadas para a avaliação de motilidade e morfologia espermática. Nesse ínterim, as análises da integridade de membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide são de grande importância, pois avaliam estruturas fundamentais para a manutenção da viabilidade celular.

Diversas pesquisas basearam-se na hipótese de que a membrana plasmática intacta impediria certos corantes de penetrarem na célula. Inicialmente as avaliações eram feitas em esfregaços secos de corante supravital, como eosina, conjugada ou não com nigrosina e posteriormente com azul de tripan. Outro método, o teste hipo-osmótico, é baseado no princípio do equilíbrio osmótico (WILSON *et al.*, 1969).

Além desses métodos, existem testes que utilizam microscopia de epifluorescência, destacando-se por serem indicadores sensíveis e específicos que avaliam compartimentos específicos da célula. Esses métodos utilizam diversos tipos de sondas fluorescentes, também chamadas de fluoróforos ou fluorocromos para avaliar as células. Dentre os fluoróforos, o brometo de etídeo, citado nos estudos iniciais de microscopia de epifluorescência, devido à grande toxicidade tem sido restringido (HALANGK *et al.*, 1984). Sendo substituído por outros com propriedades semelhantes, tais como o Hoechst 33342 e Hoechst 33258, iodeto de propídeo (IP) e SYBER-14 (GARNER *et al.*, 1999; HARRISON & VICKERS, 1990; CELEGHINI, 2005). O iodeto de propídeo, um fluoróforo de alta intensidade, vem se destacando quanto à facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade de membrana plasmática. Este corante se liga ao DNA de células cuja membrana está lesada, corando o núcleo de vermelho (GRAHAM *et al.*, 1990; GARNER *et al.*, 1999).

Um fluoróforo que vem sendo associado com o iodeto de propídeo para avaliação de integridade de membrana plasmática é o diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA). O C-FDA penetra a membrana plasmática íntegra, ainda no estado não fluorescente. No interior da célula, o C-FDA é hidrolizado por esterases e se torna 6-carboxifluoresceína livre, que é altamente fluorescente. Nesta forma o C-FDA é impermeável à membrana íntegra

ficando retido no interior da célula nessas condições, emitindo fluorescência verde (Figura 2) (HARRISSON & VICKERS, 1990).

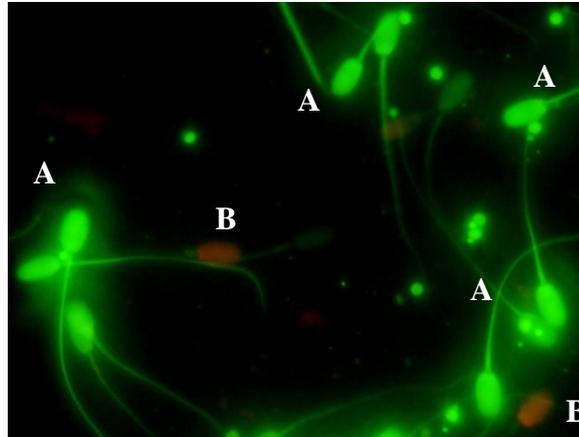


Figura 2: Espermatozoides corados com diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP). Espermatozoides verdes (A): Membrana plasmática íntegra. Espermatozoides vermelhos: (B) Membrana plasmática lesada. Aumento de 100x. Arquivo pessoal.

Para avaliar a integridade acrossomal por meio de microscopia de epifluorescência, assim como para a avaliação de membrana, existem diversos métodos que associam fluoróforos diferentes. Um desses utiliza as proteínas lecitinas, que devem ser conjugadas a fluoresceínas como o isotiocianato de fluoresceína (FITC). As lecitinas conjugadas se ligam a açúcares como a glucose, a manose, a galactose e a N-acetilglucosamina, localizados exclusivamente no acrossoma. O tipo de lecitina utilizada varia conforme a espécie animal. As mais utilizadas são derivadas das leguminosas *Pisum sativum* ou *Arachis hypogaea*. As lecitinas penetram na célula que esteja com acrossoma danificado ou se houver reação acrossomal. A lecitina de *Pisum sativum* (PSA) se liga a glicoproteínas da membrana acrossomal externa e a lecitina de *Arachis hypogaea* (PNA) a componentes enzimáticos da matriz acrossomal. À microscopia de epifluorescência, as lecitinas conjugadas marcam em cor verde amarelada o acrossoma reagido (Figura 3) (CUNHA, 2002).

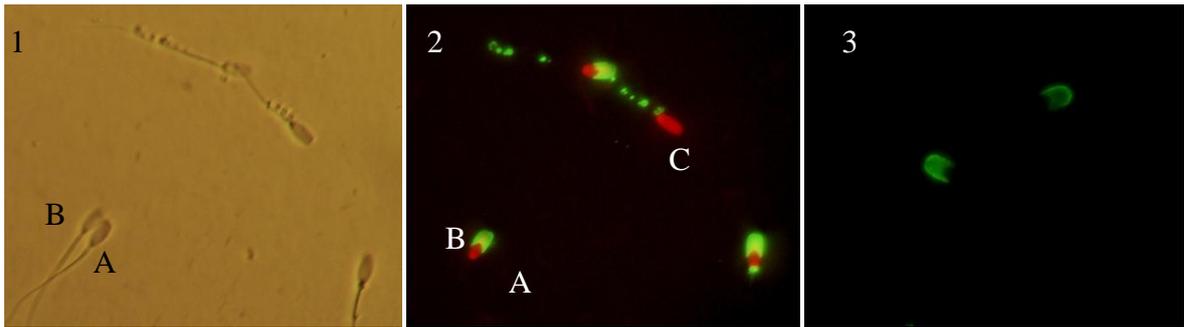


Figura 3: Espermatozoides corados com FITC-PNA e IP. Microscopia de contraste de fase, campo claro (1) e o mesmo campo sob epifluorescência (2), mostrando espermatozoide íntegro (A) visualizado apenas no campo claro (1); e falsa reação acrossomal (B) visualizada no campo claro (1) e sob epifluorescência (2). Espermatozoide com membrana lesada e acrossoma íntegro (C). Reação do acrossomo verdadeira (3). Aumento de 100x. Arquivo pessoal.

Há relatos de que a integridade do acrossoma pode estar associada com a integridade de outras membranas espermáticas e com a motilidade e que o total de espermatozoides íntegros tem correlação com a motilidade, avaliada pelo método subjetivo ou pelo CASA (MOCÉ & GRAHAM, 2008; GILLAN *et al.*, 2008 citados por CARVALHO, 2009).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, U. G. P.; McMANUS, C. Conservation of Pantaneiro cattle. In: **Proceedings of the V global conference on conservation of domestic animal genetic resources**, Brasilia, 20-24 November, 2000, CD ROM.

ABREU, U. G. P.; McMANUS, C.; MORENO-BERNAL, F. E. *et al.* Genetic and environmental factors influencing birth and 205 day weights of Pantaneiro calves. **Archivos de Zootecnia**. v.51, p.83-89, 2002.

ABREU, U. G. P.; SANTOS, S. A.; SERENO, J. R. B.; McMANUS, C. Caracterização Fenotípica e Genética da Precocidade Sexual do Bovino Pantaneiro. **Archivos de Zootecnia**. v. 56, sup. 1, p. 627-631, 2007.

ABREU, U. G. P.; SERENO, J. R. B.; LARA, M. A. C. Evaluación zootécnica del núcleo de conservación in situ del bovino Pantaneiro en el pantanal brasileño. **Archivos de Zootecnia**. v. 49, p. 27-30. 2000.

ADLEROVA1, L.; BARTOSKOVA1, A.; FALDYNA, M. Lactoferrin: a review. **Veterinari Medicina**, 53, (9): 457–468. 2008.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reprod. Fertil. Develop.** Clayton South, v. 16, p.581-588, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; *et al.* **Estrutura da Membrana**. In:\_\_\_\_\_. Fundamento da biologia celular. Porto Alegre: Artmed, 1998, cap.11, p.354-377.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet Sci**, v.7, p.145-173, 1987.

ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**: Ed. Melhoramentos. 1957. 818 p.

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, p. 191 – 200, 1991.

BALL P. J. H.; PETERS, A. R. Bull fertility. In:\_\_\_\_\_ **Reproduction in Cattle**. 3<sup>th</sup> Ed. Padstow, Cornwall, UK: Blackwell Publishing, 2004. p. 28-39.

BARRIOS, B.; *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Madison, v.63, p.1531-1537, 2000.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed. Ames, Iowa: Iowa State University, press, 1989. 285 p.

BEARDEN, H. J.; FUQUAY, J. W. Semen and its components. In:\_\_\_\_\_ **Applied Animal Reproduction**. 4<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. Cap. 12, p. 133-141.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular; Reproduction and Development**. Oct; 73 (10):1338-44, 2006.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaermed.**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BOAVENTURA, M. V.; FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S. **Gado Curraleiro: relação de criadores e aspectos gerais da raça**. Goiânia: ABC Curraleiro/Sebrae/UFG, 2005. 68p.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 13 p. html, 3 fig. (**Embrapa Trigo. Documentos Online; 6**). Disponível: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do06.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm). Acessado: 10 de out. 2013.

BRUNE, W.; ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV. p.574, 1998.

CARDOZO, J.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; *et al.* Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v. 66; p. 841–850. 2006.

CARVALHO, J. O. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões**. 2009. 91p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; *et al.* Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, 2009; 72 (7): 930-948.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S.; PAPA, F. O.; *et al.* Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Vet. e Zootec.**, 19(1): 346-355, 2012.

CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 47-53, jan./jun. 2007.

CHENG, F. P.; WU, J. T.; CHAN, J. P. *et al.* The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v. 61, p. 1605-1616, 2004.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v.64, p.457-468, 2005.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 149p. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

CURY, M. R.; KLEINHANS, F. W.; WATSON, P. F. Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. **Cryobiology**, v. 41, p. 167-173, 2000.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod**, v.59, p 7-11, 1998.

DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; *et al.* Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, p.319-341, 2005.

EDDY, E. M.; The spermatozoon. In: NEILL, J. D. (ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3<sup>th</sup>. Elsevier, St Louis, Missouri, 2006, p. 3-54.

EGITO, A. A.; **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. 2007. 232f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituição de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**. v. 51, p. 39-52. 2002.

EINSPANIER, R., EINSPANER, A., WEMPE, F. *et al.* Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal plasma. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.179, n.2, p.1006-1010, 1991.

ERIKSON, D. W.; WAY, A. L.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**. v.133 p.909-917, 2007.

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

FLORMAN, H. M.; WASSARMAN, P. M. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. **Cell**, Orlando, v. 41, p. 313-324, 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. 2007. **The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture.**

FURMANSKI, P. H. J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. **Nature**, London, v.23, p.721-724, 1995.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAZEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo, 2004. p. 97-110.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 399-404, 1999.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y., *et al.* Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod*, v.58, p.826-833, 1998.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alpha (V) and alpha (5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.468-474, 2007.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S.; WESER, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. **Electrophoresis**, 1985, 6:599-604.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J. K. Response of spermatozoa to freezing. In\_\_\_\_\_ **Proceedings of the techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa**, 1995, Colorado. Colorado: Colorado State University - Fort Collins; 1995. p.83-95.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª ed., Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Determination of the quantity of intact spermatozoa in bull ejaculates. **Archiv Experimentelle Veterinarmedizin**, v. 38, p. 105-114, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 280, p. 1-8, 1990.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HAO, Y.; MATHIALAGAN, N.; WALTERS, E.; *et al.* Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Biol Reprod.**, v.75, p.726-733, 2006.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HIRON, M.; HARSHAN, L. P.; SINGH, A.; *et al.* Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.93, p.124-133, 2006.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**, v.62, p.3-22, 2000.

IBRAHIM, N. M.; TROEDSSON, M. H. T.; FOSTER, D. N.; *et al.* Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**. V.20; n.2. March/April 1999.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; *et al.* Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology** 52:641-656, 1999.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas à congelabilidade do sêmen bovino. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; Belo Horizonte; **Anais...** Belo Horizonte; 2009 (CD-ROM).

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61; p. 255–266. 2004.

JOHNSON, L. A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 303-26, 1994.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. Review. **Journal of Andrology**, Vol. 33, No. 4, July/August 2012.

JUNK, W. J.; CUNHA C. N.; WANTZEN, K. M.; *et al.* Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, **Brazil. Aquatic Science**. v.68, p.278–309, 2006.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod**. 1993; 49:1202–7.

KISO, W. K.; SELVARAJ, V.; NAGASHIMA, J.; *et al.* Lactotransferrin in asian elephant (*Elephas maximus*) seminal plasma correlates with semen quality. **PLoS ONE**, 8(8): e71033. 2013.

KUMAR, P.; KUMAR, D.; SINGH, I.; YADAV, P. S. Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. **Agric. Res.**, Jan/Mar, 2012, 1(1):78–86.

- LANGERLÖF, N. Morphological Studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 19, p. 245-266, 1934.
- LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma. I. Preliminary and electrophoretic studies. **J Biol Chem**. 1954 Feb;206 (2):741-749.
- LEAHY, T.; GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, 47 (4):207-213 (2012).
- MANELLA, C. A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 1-4, 2000.
- MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P. S.; *et al.* New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biol Reprod**, v.80, p.394-397, 2009.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod**. 2002; 67:1250-8.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. L. **Male Reproductive Function and Semen**. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981.
- MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; *et al.* Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brasil. **Livestock Science**, v. 120, p. 204-202, 2009.
- MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, abr./jun. 2011.
- MAXWELL, W. M. C.; DE GRAAF, S. P.; GHAOUI, R. E. H.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society of Reproduction and Fertility**, Suppl v. 64; p.13-38; 2007.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v.247, n.3, pt.1, p. C125-C142, 1984.
- MAZZA, M. C. M.; MAZZA, C. A. S.; SERENO, J. R. B.; *et al.* **Etnobiologia e conservação do bovino Pantaneiro**. EMBRAPA-CPAP - Corumbá. 61, p., 1994.
- MAZZA, C. M. M.; TROVO, J. B. F.; SERENO, J. R. B.; *et al.* Desempenho de bovinos pantaneiros no núcleo de conservação da fazenda Nhumirim, Nhecolândia, Pantanal: Avaliação Preliminar. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa**. n. 11, p.1-5, 1989.
- MENDES. E. D. M.; COMASTRI FILHO, J. A.; CRISPIM, S. M. A. Núcleos de conservação Fazenda Nhumirim. Folder técnico. Corumbá, **EMBRAPA Pantanal**, Novembro, 2012. 13p.
- MILLER, D. J.; AX, R. L. An improved assay for measuring heparin binding to bull sperm. **Journal of dairy science**, Stanfond, v. 71, p. 239-244, 1988.

- MIRANDA, P. V.; GONZALEZ-ECHEVERRÍA, F.; MARÍN-BRIGGILER, C. I. *et al.* Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.3, p.399-404, 1997.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; *et al.* Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 71, p. 450-457, 2009.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. **Journal of Andrology**, p.515-524, 2000.
- MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; *et al.* Proteínas do plasma seminal, funções esperáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)
- 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. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.214-222, 2006.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; *et al.* A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**. 98, 169-88, 2007.
- MOURA, A. A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: the case for osteopontin. **Anim Reprod**, v.2, p.3-10, 2005.
- MOURA, A. A.; SOUZA, C. E. A.; CHAPMAN, D. A.; *et al.* Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v.73, p.2006-2020, 2010.
- MUIÑO-BLANCO; T.; PÉREZ-PÉ; R.; CEBRIÁN-PÉREZ; J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**; v.43; Suppl. 4; p.18-31; 2008.
- NEVES, J. A. **Fundação de Aquidauana e a ocupação do Pantanal: civilização e dependência**. 1980. 150p. Dissertação. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 1980.
- PARKS, J. E., GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
- PELLEGRIN, A. O.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, M. C. M.; LEITE, R. C. **Doenças da reprodução e conservação genética: levantamento no núcleo de conservação do bovino Pantaneiro**. Comunicado Técnico - EMBRAPA. Brasília,1997, p. 4.
- PERRY, A. C.; JONES, R.; NIANG, L. S.; *et al.* Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. **The Biochemical Journal**, London, v. 285, p. 863-870, 1992.

- PRIMO, A. T. El Ganado Bovino Iberico en las Americas: 500 Años Después. **Archivos de Zootecnia**. v. 41, n. 154, p. 421-432, 1992.
- PRUIT, J. A.; ARNS, M. J.; POOL, K. C. Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cold storage (5°C). **Theriogenology**, 1993; 39:291-6.
- RANGEL, P. N.; ZUCCHI, M. I.; FERREIRA, M. E. Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n. 4, p.97-100, abr. 2004.
- RAO, A. R. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tracts in bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Thesis**. Royal Veterinary College of Stockholm, 1971.
- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; *et al.* Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico 136, EMBRAPA**. Brasília, DF, 12p., 2005.
- ROMERO, A.; ROMAO, M. J.; VARELA, P. F., *et al.* The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nat Struct Biol**, v.4, p.783-788, 1997.
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; FRANCESCHINI, P. H.; RAMOS, P. R. R. Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arq Fac Vet. UFRGS**, 2000; 28:323.
- RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H. R.; FRANCHESCHINI, P. H. Proteomics to investigate bull's semen freezability. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2013.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 77-111, 2000.
- SALVADOR, D. F.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M. *et al.* Gel filtrate chromatographic profile of seminal plasma protein in Nelore Bulls and its correlation of andrologic and freezing semen parameters. In: 15th International Congress on Animal Reproduction. **Abstracts**. v.1, p.193, 2004.
- SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, 1996; 45:633-42.
- SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Germ Cells and Fertilization**, p. 63-101. 1993.
- SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam. **EMBRAPA-CNPQC. Documentos**, n.51, p. 1-128, 1993.
- SODHI, N. S.; EHRLICH, P. R., **Conservation biology for all**. New York: Oxford University Press, 2010. 344p.

SOUBEYRAND, S.; KHADIR, A.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Purification of a novel phospholipase A2 from bovine seminal plasma. **J Biol Chem**, v.272, p.222-227, 1997.

STRYER, L. Introdução ao estudo das membranas biológicas. In:\_\_\_\_\_. **Bioquímica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992. cap. 12, p. 230-256.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproduction Biology**. v. 5; p. 279–290. 2005.

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: De Jonge CJ, Barrat CLR. **The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2006. p.1-30.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biol Reprod**, 1998, 59:768–776.

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

VESSELINOVITCH, S. D. Electrophoresis of Bovine Semen. **Can J Comp Med Vet Sci**. 1959 January; 23(1): 10-18, 19-20.

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

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**, 3<sup>rd</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, p. 149-150. 2006.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction; Fertility and Development**. v. 7; p. 871-891. 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v.60/61, p.481-492, 2000.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.483-492, 1981.

WILSON, H. R.; WARNICK, A. C.; GUTIERREZ, J. H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. **Poultry Science**, v. 48, p. 714-717, 1969.

WOLF, D. E.; MAYNARD, V. M.; McKINNON, C. A.; MELCHIOR, D. L. Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 6893-6896, 1990.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; *et al.* Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. **Biology of Reproduction**, 72, 2005, 1262 –1267.

## **CAPÍTULO 2**

## CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS PANTANEIROS E ASSOCIAÇÕES COM OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Paula Lorena Grangeira Souto<sup>1</sup>, Mauricio Fraga Van-Tilburg<sup>2</sup>, Eleonora Araújo Barbosa<sup>1</sup>,  
Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura<sup>2</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, Luciana Keiko  
Hatamoto-Zervoudakis<sup>4</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Escola de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, DF, Brasil, <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, UFC, CE, Brasil, <sup>3</sup>Embrapa Pantanal, MS, Brasil, <sup>4</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UFMT, MT, Brasil, <sup>5</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Brasil. E-mail: alexandre.floriani@embrapa.br

### RESUMO

Estudos de caracterização fisiológica de animais localmente adaptados são essenciais para nortear as ações dos programas de conservação de recursos genéticos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil proteico do plasma seminal de touros Pantaneiros e associa-lo aos parâmetros espermáticos. Ejaculados de dezoito touros Pantaneiros foram obtidos por eletroejaculação. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto à motilidade, vigor e morfologia espermática. O plasma seminal foi obtido por centrifugação do sêmen e as proteínas seminais separadas por meio de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), corados com Coomassie coloidal G-250 e analisados por meio do aplicativo PDQuest<sup>™</sup>. Após análise dos mapas bidimensionais detectou-se  $184,3 \pm 34,0$  spots por gel, além de variações nos perfis individuais. Do total de spots detectados, 13,4% foram expressos em todos os géis e a maioria dos spots proteicos está situada na faixa de alto peso molecular. As proteínas mais abundantes nos mapas proteicos foram associadas à família das BSP's, representando 23,5% da densidade óptica total dos géis. Observou-se a presença de nove grupos proteicos principais em todos os géis, além de outros spots que também se destacaram. Seis spots apresentaram correlações significativas com os parâmetros seminais. As características do perfil proteico do plasma seminal de touros Pantaneiros sugerem heterogeneidade apresentada em seu perfil proteico. As associações encontradas neste estudo indicam a existência de marcadores bioquímicos que podem ser úteis na avaliação do potencial

reprodutivo de touros Pantaneiros. No entanto, é importante confirmar a identidade das proteínas sugeridas neste trabalho por meio de técnicas de sequenciamento ou pelo uso de antígenos específicos.

**Palavras-chave:** bovino, eletroforese, proteômica, recurso genético.

## CHARACTERIZATION OF THE SEMINAL PLASMA PROTEINS OF PANTANEIRO BULLS AND RELATION WITH SPERM PARAMETERS

Paula Lorena Grangeira Souto<sup>1</sup>, Mauricio Fraga Van-Tilburg<sup>2</sup>, Eleonora Araújo Barbosa<sup>1</sup>,  
Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura<sup>2</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, Luciana Keiko  
Hatamoto-Zervoudakis<sup>4</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine, UnB, DF, Brazil, <sup>2</sup>Department of Animal Science, UFC, CE, Brazil, <sup>3</sup>Embrapa Pantanal, MS, Brazil, <sup>4</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine, UFMT, MT, Brazil, <sup>5</sup>Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, DF, Brazil. E-mail: alexandre.floriani@embrapa.br

### ABSTRACT

Physiological characterization studies of locally adapted animals are essential to guide the actions of the genetic resources conservation programs. The aim of this study was to characterize the protein profile of Pantaneiro cattle seminal plasma and associate with semen parameters. Eighteen Pantaneiro bulls had their ejaculates collected by electroejaculation. Semen samples were evaluated such as motility, vigor and spermatic morphology. Seminal plasma samples were obtained by semen centrifugation. Seminal plasma proteins were separated by two-dimensional SDS-PAGE followed by staining with Coomassie blue and analysis of polypeptide maps using PDQuest<sup>™</sup> software. An average of  $184.3 \pm 34.0$  spots was detected in the seminal plasma gels. There was individual variation in the seminal plasma profiles, and 13.4% of all spots were expressed in the gels. The majority of spots was situated in the high molecular weight range. The major proteins present in the maps were associated to BSP's family, representing 23.5% of the total optical density of the gels. It was observed nine major protein groups present in all gels, as well as another spots that also were important. Six spots showed consistent correlations with semen parameters. Characteristics of the seminal plasma of Pantaneiro bulls suggest heterogeneity presented in their protein profile. The associations found in this study indicate the existence of biochemical markers that may be useful in the reproductive potential evaluation of Pantaneiro cattle. However, it is important to confirm the identity of the proteins suggested in this study by sequencing techniques or by the use of specific antigens.

**Keywords:** bovine, electrophoresis, genetic resource, proteomics.

## 1. INTRODUÇÃO

Em um período relativamente curto, de menos de um século, entre a primeira importação de raças exóticas para o Brasil até a expansão das mesmas por todo o território, houve a substituição das raças localmente adaptadas por aquelas consideradas mais “produtivas”. Hoje no Brasil, o rebanho bovino comercial é formado basicamente por animais de raças zebuínas e europeias, sendo que o Nelore constitui a maior parcela, somando cerca de 80% desse rebanho. No entanto, essas raças apresentam alta produtividade em detrimento da variabilidade genética intrapopulacional, o que se deve ao restrito número de indivíduos que são a base formadora dessas raças, principalmente do Nelore. Com isso, essas raças tornam-se vulneráveis para conseguirem sobreviver aos desafios que poderão afligir a agropecuária no futuro. Frente a esta perspectiva, a conservação genética das espécies animais é um ponto fundamental. Considerando que conservação genética das espécies animais é baseada na manutenção da máxima variabilidade dentro das populações e da diversidade entre populações, o bovino Pantaneiro constitui um patrimônio genético importante nesse processo.

O bovino Pantaneiro (*Bos taurus ibericus*) é uma raça localmente adaptada às condições edafoclimáticas do Pantanal brasileiro. Descende de raças ibéricas trazidas para o país no período da colonização (EGITO, 2007; MARIANTE *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012), a raça está em risco de extinção devido ao processo de substituição das raças locais por raças exóticas, iniciada entre os séculos XIX e XX (EGITO *et al.*, 2002).

Por muito tempo a avaliação reprodutiva do macho baseava-se na simples informação dicotômica de que o indivíduo apresentava ou não fertilidade. Há várias décadas os pesquisadores vêm dependendo esforços para desenvolver ensaios laboratoriais que possam prever com acurácia o potencial reprodutivo de um indivíduo. Embora os sistemas de avaliação do sêmen tenham avançado nos últimos anos e se tornado cada vez mais eficazes, esses testes

apenas definem critérios mínimos para a seleção de reprodutores, mas nenhum deles tem provado ser totalmente seguro na predição da fertilidade dos animais. Além disso, nenhuma análise laboratorial isolada fornece todas as informações a respeito do potencial fecundante dos espermatozoides (GRAHAM *et al.*, 1990; AMMAN, 1995). Essa limitação dos testes convencionais pode estar relacionada ao fato de que os mesmos não levam em consideração a habilidade da célula espermática de sofrer alterações fisiológicas importantes durante o processo de fertilização (KILLIAN *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2006).

No âmbito da biologia molecular, novas ferramentas podem auxiliar a predição do potencial reprodutivo animal. Dentre elas, a identificação de marcadores bioquímicos fisiológicos, os quais têm sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas. Análises bioquímicas associadas à avaliação dos parâmetros espermáticos podem ser úteis na identificação de diferenças importantes entre o perfil reprodutivo dos animais. Neste contexto, pesquisas recentes têm demonstrado evidentes associações entre a expressão de proteínas contidas no plasma seminal e a fertilidade dos machos avaliada “*in vivo*” e “*in vitro*” (KILLIAN *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2007; JOBIM *et al.*, 2009). Baseando-se em resultados já obtidos em outras pesquisas, algumas proteínas podem responder a este quesito. Tais proteínas são candidatas a marcadores moleculares da fertilidade. Dentre elas estão: osteopontina, prostaglandina D-Sintetase tipo lipocalina, BSP-30 kDa ou BSP 5, fosfolipase A2 e a P25b (KILLIAN *et al.*, 1993; GERENA *et al.*, 1998; JOBIM *et al.*, 2009). As proteínas do plasma seminal também se expressam em diversos órgãos, com múltiplas funções. O conhecimento sobre os efeitos regulatórios destas proteínas sobre as funções espermáticas ainda não está totalmente esclarecido e as informações são contraditórias. Ademais, os estudos sobre a caracterização do perfil proteico do plasma seminal em raças adaptadas aos trópicos são escassos e podem revelar uma realidade diferente daquela observada em outras raças. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil eletroforético bidimensional das proteínas do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros e associá-lo com os parâmetros espermáticos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento experimental

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA/IB n.º 99697/2012) e foi conduzido durante o período compreendido entre novembro de 2012 e agosto de 2013.

Foram utilizados dezoito touros Pantaneiros hígidos, mantidos em sistema extensivo de pastagem nativa, situados em três propriedades distintas. Cinco touros se localizaram no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira, parte da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal. O campo experimental localiza-se a sudoeste da cidade de Brasília, latitude 15° 55' 26,84" Sul e longitude 48° 2' 0,69" Oeste, em altitudes que variam de 1.050 a 1.250 m. Na região predomina o clima tipo Aw, na classificação climática de Köppen-Geiger, indicando inverno seco e verão chuvoso. A fazenda possui uma área total de 17,63 km<sup>2</sup>, distribuída em áreas de Cerrado, pastagem e agricultura. Outros seis animais situaram-se no Núcleo de Conservação do Bovino Pantaneiro Fazenda Nhumirim, parte da Embrapa Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul. O Núcleo de Conservação do bovino Pantaneiro localiza-se na sub-região da Nhecolândia, bacia hidrográfica do Alto Paraguai, Pantanal Matogrossense, latitude 18° 59' 00" Sul e longitude 56° 39' 00" Oeste, em altitude de 98 m. O clima é definido como tropical sub-úmido, do tipo Aw, com duas estações bem definidas, sendo a estação de cheia de novembro a abril e de seca de maio a outubro (SORIANO & ALVES, 2005). Essa fazenda possui uma área total de 43,10 km<sup>2</sup>, onde predominam áreas de campos secos e inundáveis de pastagens nativa e cultivada, seguidos de cerrado, cordilheiras, vazantes, baías e salinas, que compõem a fitofisionomia local típica do Pantanal. Os últimos sete animais situaram-se no núcleo de criação do bovino Pantaneiro, na Fazenda Santo Augusto, Rochedo, Mato Grosso do Sul, latitude 19° 57' 11" Sul e longitude 54° 53' 33" Oeste, em altitude de 260 m, na região da bacia do rio Prata. Está sobre influência do clima tropical (Aw), com características do clima úmido a sub-úmido. Há uma estação chuvosa durante um a seis meses e deficiência hídrica durante quatro meses. A fazenda possui uma área de 400 hectares e está localizada a 80 km de Campo Grande. O município de Rochedo caracteriza-se pelo verão muito quente e inverno muito frio. A cobertura

vegetal predominante é a pastagem cultivada. Mas há influência do bioma Cerrado, apresentando as seguintes fitofisionomias: Arbóreo denso (Cerradão) e Arbóreo aberto (campo Cerrado). As lavouras representam uma pequena parcela da região.

Ao exame andrológico, os reprodutores Pantaneiros foram classificados como aptos à reprodução, segundo os parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Foram aferidas as características biométricas de desenvolvimento testicular dos animais como circunferência escrotal, comprimento e largura testicular, para o cálculo do volume testicular. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador e cada ejaculado foi fracionado em duas partes: uma fração para avaliação do sêmen e outra para a extração do plasma seminal. A fração destinada a avaliação do sêmen foi submetida às seguintes análises: avaliação das características imediatas (cor, aspecto e volume do ejaculado; motilidade subjetiva e vigor) e mediatas (concentração espermática e morfologia espermática). O plasma seminal foi submetido à eletroforese bidimensional e os géis foram revelados e analisados utilizando-se o software PDQuest™ Advanced versão 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA).

## **2.2 Colheita do sêmen, avaliação dos parâmetros espermáticos e extração do plasma seminal**

Antes de iniciar as atividades experimentais todos os touros foram submetidos a duas colheitas de sêmen, em dias alternados, e os ejaculados obtidos destas colheitas foram descartados. A colheita do sêmen dos dezoito reprodutores Pantaneiros foi realizada nos meses de dezembro de 2012 e janeiro de 2013, utilizando-se um sistema de eletroejaculação (Eletroejaculador Duboi<sup>®</sup>, Campo Grande, MS, Brasil). Cada ejaculado foi fracionado em duas partes: uma fração para o processamento do sêmen e outra para a extração do plasma seminal. A fração destinada ao processamento do sêmen foi conduzida, imediatamente, ao banho-maria a 37°C, sendo retirada uma amostra para análise das características seminais imediatas e mediatas. O sêmen fresco foi avaliado macroscopicamente quanto às características de cor, aparência e volume. Para a avaliação subjetiva da motilidade total e vigor, uma gota de ejaculado foi colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio óptico com contraste de fase (Olympus BX 50, Tokyo, Japan) em aumento de 100x. Para a mensuração da concentração espermática uma amostra de sêmen foi adicionada à solução salina de formol

0,9% na diluição 1:200. A contagem dos espermatozoides foi feita com auxílio de câmara de Neubauer modificada, em microscopia óptica direta. A morfologia do sêmen fresco foi analisada em preparação úmida, em microscopia de contraste de fase sob imersão com aumento de 1.000 x (NASCIMENTO *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2008, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011). Duzentas células foram contabilizadas e avaliadas quanto às anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, segundo a classificação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides normais, com defeitos maiores e com defeitos menores (BLOM, 1973).

A fração do ejaculado destinada à extração do plasma seminal, de cada reprodutor, foi centrifugada a 700 G, por 10 minutos, para separar o plasma dos espermatozoides. Para reduzir o processo de proteólise adicionou-se inibidor de protease (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missouri, USA) às amostras, que posteriormente foram aliquoteadas e armazenadas à temperatura de -196°C (MOURA *et al.*, 2006a,b).

### **2.3 Precipitação das proteínas do plasma seminal**

O plasma seminal foi centrifugado uma segunda vez (10.000 G, 4°C, 60 minutos), com o intuito de remover possíveis *debris* celulares e espermatozoides remanescentes, de acordo com protocolo previamente descrito (MOURA *et al.*, 2006, 2010; SOUZA *et al.*, 2010b; RÊGO *et al.*, 2010).

As amostras foram submetidas a uma etapa para precipitação de proteínas, adicionando-se à amostra um volume de acetona gelada na proporção de 1:10 (v/v). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de -20°C por, pelo menos, 2 horas para que as proteínas precipitassem. As amostras foram centrifugadas a 5.000 G por 60 minutos a 4°C e, em seguida, secadas à temperatura de 4-8°C para a remoção de qualquer resíduo de acetona. O *pellet* formado foi ressuscitado em 50 µL de solução de reidratação (Ureia 7M; Tiourea 2M; Ditiotreitól (DTT) 65 mM; anfólitos livres 2% (IPG buffer, pH 3-10); CHAPS 2%; e traços de azul de bromofenol).

## 2.4 Quantificação de proteínas totais no plasma seminal

Procedeu-se a quantificação da concentração de proteínas totais nas amostras pelo método de Bradford (1976). Inicialmente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões, com concentrações de proteína conhecidas, sendo 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{g}$  de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) por mL. A cada 30  $\mu\text{L}$  de solução padrão, adicionou-se 1,5 mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos de incubação as leituras de absorbância foram realizadas utilizando filtro de comprimento de onda de 595 nm (NanoDrop 2000c Spectrophotometer<sup>®</sup>, Thermo Scientific, Wilmington, USA). A curva de calibração foi estabelecida pelas médias das duplicatas das absorbâncias obtidas, gerando uma equação linear de absorbância versus concentração ( $R^2= 0,990$ ) através da qual foi possível a determinação do teor de proteínas totais em cada uma das amostras experimentais (Anexo B).

Para quantificação dos teores de proteína, as amostras foram previamente diluídas 60 vezes (1:60) em solução tampão fosfato-salino (PBS), também em duplicata, para enquadramento da leitura de absorbância das amostras na curva padrão. Um volume de 30  $\mu\text{L}$  da amostra diluída foi homogeneizado com 1,5 mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos de incubação as leituras de absorbância foram realizadas utilizando filtro de comprimento de onda de 595 nm e a média das duplicatas foram utilizadas para o cálculo do teor de proteína de cada amostra.

## 2.5 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

As amostras de plasma seminal foram submetidas à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes ou SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis) para separar as proteínas de acordo com a massa molecular relativa ( $M_r$ ) e ponto isoelétrico (pI) (O`FARREL, 1975; SOUZA *et al.*, 2010a, b; MOURA *et al.*, 2006, 2007, 2010; RÊGO *et al.*, 2010). Para cada amostra, uma quantidade de solução de reidratação suficiente para um volume final de 340  $\mu\text{l}$  foi adicionada a um volume de plasma seminal contendo 500  $\mu\text{g}$  de proteína. Em seguida, a solução foi homogeneizada e disposta em canaletas individuais da bandeja de reidratação (uma canaleta por amostra). Sobre

esta solução foi disposta uma tira de gel em poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado linear de 3-10 (Immobiline DryStrip gel – IPGs; GE Lifesciences, USA) de 18 cm de comprimento. As tiras foram cobertas com 2 mL de solução de óleo mineral para eletroforese (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare lifesciences, USA). O processo de reidratação das tiras compreendeu no mínimo 16 horas. Ao final da etapa de reidratação, as tiras foram removidas da bandeja, o excesso de óleo foi retirado e estas foram posicionadas no equipamento Ettan™ IPGphor 3 (GE Healthcare Bio-Sciences®, Uppsala, Sweden) e cobertas com solução de óleo mineral para eletroforese. Em seguida a focalização isoelétrica (IEF) foi iniciada com a seguinte programação: Passo I: 250V (500Vh); Passo II: 1.000V (1.000 Vh); Passo III: 8.000V (16.500 Vh); Passo IV: 8.000V (20.000 Vh). Todas as corridas da IEF foram realizadas a 20°C.

Ao término da IEF, imediatamente antes da segunda dimensão, procedeu-se a etapa de equilíbrio das tiras de gel. Nesta etapa as tiras foram saturadas em solução tampão desnaturante contendo o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio (SDS). Um agente redutor, o ditioneitol (DTT), responsável por romper as ligações dissulfeto dos polipeptídeos, também foi adicionado. Quando as proteínas são tratadas com ambos, SDS e DTT, o grau de separação eletroforética no gel de poliacrilamida depende em grande parte do peso molecular da proteína. A etapa de equilíbrio das tiras compreendeu dois passos. No primeiro passo, foi adicionado DTT (100 mg/10 mL) em um volume suficiente de solução tampão de equilíbrio (Tris-HCl (pH 8,8) 50 mM, Glicerol 87% (29,3%), Uréia 6 M, SDS 2%; traços de azul de bromofenol) onde as tiras foram imersas e mantidas sob agitação por 20 minutos (volume de 5 mL/tira). No segundo passo, foi adicionado iodoacetamida (250 mg/10 mL) em um volume suficiente de solução tampão de equilíbrio (5 mL/tira), onde as tiras foram imersas e mantidas sob agitação por mais 20 minutos.

Posteriormente à etapa de equilíbrio das tiras iniciou-se a segunda dimensão. As tiras foram retiradas da solução de equilíbrio, dispostas sobre a superfície dos géis de poliacrilamida 12,5% (25,5 cm x 20,5 cm x 1,5 mm) e seladas com solução de agarose 0,5% com traços de azul de bromofenol, utilizando um sistema vertical de cuba eletroforética (Ettan™ DALTsix, GE Healthcare Bio-Sciences®, Uppsala, Sweden). Foi utilizado marcador de massa molecular LWM (Low Weight Molecular, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) que contém as seguintes proteínas:  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina-BSA (66,0 kDa) e glicogênio fosforilase b (97,0 kDa). As condições da corrida foram: 500 V; 40 mA por

gel; 90W. Esta era interrompida quando o azul de bromofenol, presente na solução de agarose, alcançava o fim do gel, aproximadamente com 7 horas e 30 minutos do início da corrida eletroforética. Todas as corridas foram realizadas a 15°C.

Concluída a segunda dimensão as proteínas foram visualizadas utilizando o método de coloração com Coomassie coloidal. Para tanto, os géis foram fixados *overnight* em solução contendo ácido fosfórico 2% e etanol 30%, em água destilada. Em seguida, os mesmos foram submetidos a três lavagens de 20 minutos cada em solução de ácido fosfórico 2%, em água destilada. E, finalmente, os géis foram imersos em solução para protonação composta de ácido fosfórico 2%, sulfato de amônio 15% e etanol 18%, em água destilada, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 2% de solução à base de Coomassie coloidal Brilhante Blue G-250 à solução para protonação e os géis permaneceram em contato com o corante por cerca de 120 horas (MOURA *et al.*, 2010; RÊGO *et al.*, 2010). Após este período, a solução contendo o corante foi desprezada e os géis lavados com água destilada. Durante todo o processo de coloração os géis foram mantidos em recipiente sob agitação suave.

## 2.6 Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando o ImageScanner™ III LabScan™ 6.0 (GE Healthcare Bio-Sciences®, Uppsala, Sweden) na resolução de 300 dpi, utilizando o modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas em formato de arquivo *TIFF* e analisadas utilizando o aplicativo PDQuest™ Advanced versão 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA). O gel mais representativo foi denominado gel de referência. Uma imagem foi criada automaticamente com base nos géis de todos os indivíduos, sendo denominada gel *Master*. Os *spots* consistentemente presentes nos mapas também foram adicionados ao gel sintético (MOURA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010; Van-Tilburg *et al.*, 2013). O alinhamento correto de cada *spot* expresso nos géis individuais com o seu correspondente no gel *Master* foi determinado utilizando proteínas em regiões-chave dos géis, como referência de localização, após intensas comparações. A quantificação dos *spots* foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total, de acordo com o aplicativo (MOURA *et al.*, 2006). Os valores experimentais de pH e de massa molecular (Mr) (referente ao marcador proteico utilizado) foram inseridos em *spots* específicos nas imagens, permitindo ao software a estimativa dos respectivos valores para os demais *spots*.

## 2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System<sup>®</sup> 9.0, 2002). Foi realizada a estatística descritiva dos dados através da obtenção de médias, desvios-padrão e erros-padrão (PROC MEANS MEAN STDDEV STDERR). Realizaram-se correlações de Pearson e de Spearman (PROC CORR PEARSON SPEARMAN option) entre os parâmetros seminais e as intensidades dos *spots* proteicos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Resultados

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias e os desvios-padrão da biometria testicular e dos parâmetros seminais dos reprodutores Pantaneiros.

**Tabela 1: Médias e desvios-padrão dos valores de biometria testicular e dos parâmetros seminais de reprodutores bovinos Pantaneiros (n=18)**

	CE (cm)	VTC (cm <sup>3</sup> )	VE (mL)	CONC (x10 <sup>6</sup> /mL)	MOT (%)	VIGOR (0-5)	DMai (%)	DMen (%)	DTot (%)
<i>Média</i>	38,5	878,2	8,5	534,6	77,0	3,4	14,0	3,0	17,0
<i>Desvio-padrão</i>	2,3	145,0	3,6	205,0	9,0	0,6	7,0	1,0	7,0

CE= circunferência escrotal, VTC= volume testicular (cilindro), VE= volume do ejaculado, CONC= concentração espermática, MOT= motilidade, DMai= defeitos maiores, DMen= defeitos menores, DTot= defeitos totais

Os animais apresentaram concentração média de proteínas totais de  $36,9 \pm 15,5$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , variando de  $10,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  a  $69,7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . A análise dos mapas bidimensionais detectou uma média de  $184,3 \pm 34,0$  *spots* por gel, com uma variação de 108 a 237 *spots*. Os géis apresentaram diferenças individuais nos padrões de expressão das proteínas, estando presentes cadeias polipeptídicas com pesos moleculares entre 12,3 e 138,9 kDa. Dos *spots* estudados, 37 (13,4%) foram expressos em todos os géis, 123 (44,4%) estavam presentes em no mínimo 50% dos géis e 25 (9,0%) estavam ausentes em apenas um gel. O restante dos *spots* (33,2%) esteve presente em menos da metade dos géis. É possível classificar os *spots* quanto à intensidade nos géis 2-D em dois grupos: um de baixo peso molecular (*spots* abaixo de 30 kDa), que são claramente mais intensos que o outro de alto peso molecular (*spots* acima de 30 kDa). Neste estudo, 35% dos *spots* se localizaram na faixa de menor massa molecular experimental (Mr= 12,3 – 29,4 kDa) e 65%, na faixa de maior massa molecular experimental (Mr= 30,0 – 138,9 kDa).

Analisando os mapas bidimensionais deste estudo nota-se a expressão de proteínas majoritárias ou principais, presentes em todos os géis, resguardadas as diferenças individuais na intensidade e no padrão de expressão dos *spots*. Foram encontrados nove grupos de proteínas majoritárias em todos os géis (Figura 1).

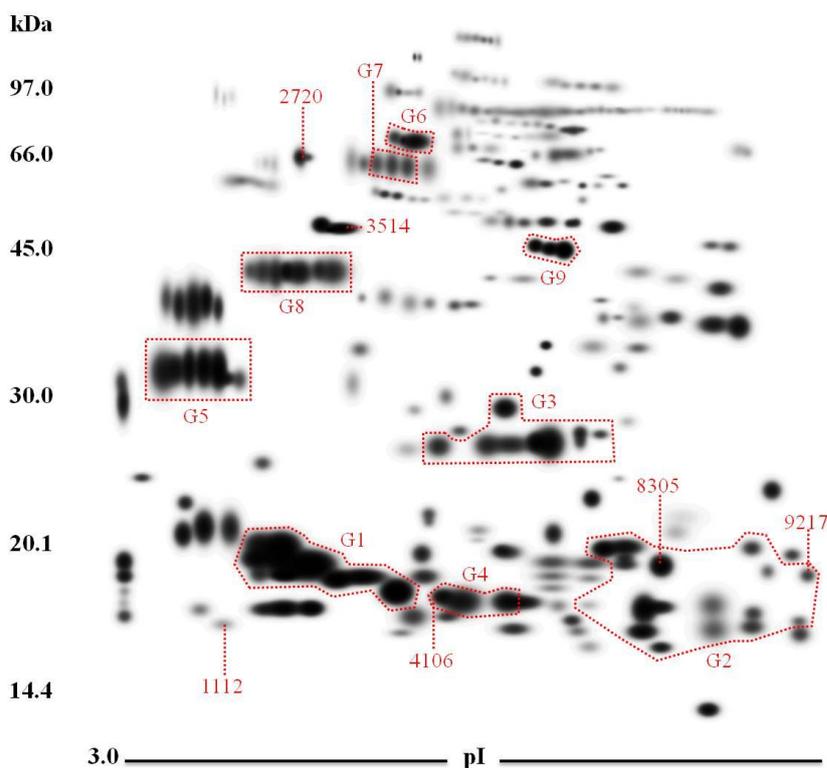


Figura 1: Gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest™ (Bio-Rad Laboratories, USA), baseado na combinação dos *spots* de todos os géis utilizados no experimento. Os grupos de proteínas majoritárias estão em destaque: Grupo 1 (G1), Grupo 2 (G2), Grupo 3 (G3), Grupo 4 (G4), Grupo 5 (G5), Grupo 6 (G6), Grupo 7 (G7), Grupo 8 (G8) e Grupo 9 (G9).

O resultado da análise de correlação entre a densitometria das proteínas expressas nos géis e os parâmetros seminais dos touros Pantaneiros apresentaram associações consistentes e significativas com seis *spots* (Tabela 2). Os *spots* 1112 (15,3 kDa, pI= 3,9), 3514 (49,8 kDa, pI= 5,2), 2720 (69,1 kDa, pI 4,8) e 9217 (17,2 kDa, pI 9,9) apresentaram correlação negativa com defeitos maiores e o *spot* 2720 também apresentou correlação negativa com motilidade e vigor. Enquanto o *spot* 4106 (16,4 kDa, pI 6,2) apresentou correlação negativa com defeitos menores. Os defeitos totais apresentaram correlação negativa com os *spots* 8305 (17,7 kDa, pI 8,5) e 9217.

**Tabela 2 – Correlação entre a densitometria dos *spots* expressados nos géis 2D-PAGE e os parâmetros do sêmen de reprodutores bovinos Pantaneiros**

	<i>Spot 1112</i>	<i>Spot 4106</i>	<i>Spot 8305</i>	<i>Spot 3514</i>	<i>Spot 2720</i>	<i>Spot 9217</i>
<b>MOT</b>	NS	NS	NS	NS	<b>** -0,57</b>	NS
<b>VIGOR</b>	NS	NS	NS	NS	<b>** -0,74</b>	NS
<b>DMAI</b>	<b>** -0,68</b>	NS	NS	<b>** -0,69</b>	<b>** -0,65</b>	<b>* -0,75</b>
<b>DMEN</b>	NS	<b>** -0,75</b>	NS	NS	NS	NS
<b>DTOT</b>	NS	NS	<b>* -0,62</b>	NS	NS	<b>* -0,70</b>

\*Coeficientes de correlação de Pearson, \*\*Coeficientes de correlação de Spearman (P<0,05)

Nota: MOT= motilidade total, DMAI= defeitos maiores, DMEN= defeitos menores, DTOT= defeitos totais. NS= Não significativo. Os números dos *spots* referem-se àqueles mostrados na Figura 1.

### 3.2 Discussão

No presente estudo os animais foram classificados como aptos à reprodução, ao exame andrológico e realizou-se a caracterização do perfil bidimensional das proteínas do plasma seminal associado aos parâmetros seminais de dezoito touros Pantaneiros. Os valores médios de proteínas totais do plasma seminal mensurados neste experimento estão em acordo com observações realizadas por Romitto (2003) em touros Simental e Nelore, e por Folhadella e colaboradores (2013) em touros Gir, diferindo do encontrado em reprodutores taurinos e zebuínos por Jobim e colaboradores (2003) e Oberst e colaboradores (2002), que não observaram grande variação entre touros.

Foram detectados 277 *spots* em todos os mapas eletroforéticos bidimensionais do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros. Os resultados deste estudo foram similares ao constatado por Roncoletta e colaboradores (2013) em estudo com Nelore e Angus (225 *spots*) e por Silva (2011) em touros Brahman ( $167,7 \pm 26$  *spots* por gel). Esta quantidade de *spots* pode ser considerada relativamente alta a reportada por Jobim e colaboradores (2003), trabalhando com *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, cujo estudo detectou 12 bandas proteicas. Esta diferença pode estar relacionada à técnica empregada. Os últimos autores utilizaram NEPHGE (Eletroforese em gel com pH não equilibrado), com 100 µg de proteína e os géis foram corados com solução de Coomassie R-250. Em contraposição, Roncoletta e colaboradores (2013) e Silva (2011) empregaram metodologia bastante semelhante à deste estudo. Silva (2011) utilizou uma quantidade maior de proteínas das amostras de plasma seminal (750 µg) e tiras de maior

comprimento (24 cm, pH 3 – 11), o que proporcionaria a maior resolução possível. Roncoletta e colaboradores (2013) utilizaram tiras do mesmo comprimento das utilizadas neste estudo, porém com faixa de pH mais estreita para proteínas do plasma seminal (18 cm, pH 4 – 7) e os géis foram corados com prata.

As variações individuais no padrão de expressão das proteínas no plasma seminal dos reprodutores Pantaneiros também foram notadas por outros autores como Welter (2006) estudando touros da raça Nelore e Jobim e colaboradores (2003) estudando *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Roncoletta e colaboradores (2013) observaram um perfil proteico mais homogêneo em taurinos do que em zebuínos.

O intervalo dos valores de massa molecular experimental das proteínas expressas nos géis deste estudo foi semelhante ao descrito por Silva (2011) em touros Brahman, por Welter (2006) em touros Nelore (11,2 – 124,1 kDa), que utilizou método de separação de proteínas por eletroforese unidimensional e por Oliveira (2007), que ainda reportou pesos moleculares abaixo de 10 kDa em touros Tabapuã (6,0 – 125,0 kDa). De acordo com os valores experimentais de peso molecular (Mr), ponto isoelétrico (pI) e intensidade dos *spots* apresentados no presente estudo, foram sugeridas prováveis famílias de proteínas correlatas, baseando-se em estudos previamente publicados.

As proteínas do Grupo 1 (Mr= 15,8 – 18,6 kDa e pI= 4,3 – 5,8) apresentaram densidade óptica superior a todos os outros grupos de *spots*, representando 23,5% da intensidade total dos géis, sendo as proteínas mais abundantes no plasma seminal de touros Pantaneiros. Estes peptídeos possivelmente correspondem às proteínas da família das BSP's, a qual inclui as três proteínas ácidas majoritárias do plasma seminal bovino, a saber: BSP-A1 (Mr= 16,5 kDa e pI= 4,7 – 5,0) e BSP-A2 (Mr= 16,0 kDa e pI= 4,9 – 5,2), atualmente chamadas de BSP 1, e BSP-A3 (Mr= 15,0 kDa e pI= 4,8 – 5,2), atualmente chamada de BSP 3. Estes resultados, obtidos na técnica de 2D-PAGE, foram corroborados por imunodeteção apresentando várias isoformas das BSP's (DESNOYERS *et al.*, 1994). Estas proteínas cobrem a superfície espermática após a ejaculação e acredita-se que as mesmas desempenham um papel importante nas modificações da membrana durante a capacitação espermática, interagindo com os colina-fosfolipídeos, com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e com os glicosaminoglicanos (GAGs) similares a heparina presentes nos fluidos folicular e no oviduto do trato reprodutor da fêmea (MANJUNATH & SAIRAM, 1987; DESNOYERS *et al.*, 1994). Segundo Thérien e colaboradores (1997), as BSP's em conjunto com as HDL, podem acelerar o processo de capacitação espermática. As HDL sozinhas requerem pelo menos oito horas de

incubação para estimular a reação acrossômica, mas na presença da BSP1 (antiga BSP-A1/A2) esse tempo é reduzido para cinco horas. Isso pode ser explicado pela hipótese de que as BSP's ligadas ao espermatozoide interagem com as HDL e mediam o efluxo de colesterol e fosfolípidos da membrana, resultando no decréscimo da taxa de colesterol/fosfolípido, ocasionando a capacitação. A exposição dos espermatozoides a outras proteínas de ligação a heparina (HBP de 14, 18, 24 e 31 kDa) também reduz o tempo requerido para a capacitação mediada por heparina para quatro horas. É provável que as BSP's interajam simultaneamente com as HDL e com os GAGs similares a heparina. Além disso, segundo Sánchez-Luengo e colaboradores (2004), com a ligação da BSP1 aos colina-lípidos, há um incremento dos sítios para ligação da heparina na superfície do espermatozoide. Com a saturação desses sítios, a heparina contribui para a indução da reação acrossômica. Segundo Miller e colaboradores, (1990) a heparina liga-se a espermatozoides de várias espécies de mamíferos em um modo pH-Ca<sup>2+</sup>-temperatura dependente, podendo-se afirmar que esta ligação assemelha-se a uma interação ligante-receptor, com vários graus de afinidade. Vale ressaltar que a ligação à heparina *in vitro* é um processo exotérmico e reversível. Apesar dos estudos demonstrarem que as BSP's são as principais proteínas de ligação à heparina, e que este é o glicosaminoglicano mais potente para capacitar espermatozoides bovinos, os mecanismos bioquímicos acerca do processo de capacitação induzida pela heparina ainda não estão totalmente esclarecidos.

No presente estudo foram detectados dois *spots* (*spot* 2114: Mr= 15,9 e pI= 4,6 e *spot* 2115: Mr= 15,9 e pI=4,9) que parecem equivaler à proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP) que é descrita com massa molecular teórica de 15,3 kDa e ponto isoelétrico teórico de 5,1. A localização de ambos os *spots* nos géis deste estudo é evidentemente análoga ao obtido por Assumpção e colaboradores (2005), que identificaram dois *spots* como sendo esta proteína em touros Nelore (Mr= 17,3 kDa e pI= 6,4 e Mr= 17,3 kDa e pI= 6,6). As spermadesinas são um grupo de polipeptídeos de 12 – 16 kDa que têm alta similaridade de sequência de aminoácidos e são encontradas no plasma seminal ou associadas perifericamente à superfície do espermatozoide de suínos, bovinos e equinos. Algumas propriedades biológicas da aSFP como atividade mitogênica ou estimulação da liberação de progesterona podem ser demonstradas em culturas de células bovinas em diferente sistemas, mas sua função original no trato reprodutivo masculino ainda não é totalmente conhecida, apesar dos resultados já obtidos nos estudos *in vitro* (SCHÖNECK *et al.*, 1996; ASSUMPCÃO *et al.*, 2005).

As principais proteínas alcalinas detectadas no plasma seminal dos reprodutores Pantaneiros foram as proteínas do Grupo 2 (Mr= 14,4 – 18,5 kDa e pI= 7,7 – 9,9). Dentre os

*spots* pertencentes a este grupo destaca-se o *spot* 8003 (Mr= 14,4 e pI= 8,5), presente em 100% dos géis. Jobim e colaboradores (2003) relacionaram uma banda proteica de 14 – 16 kDa e pI 8,0 – 8,5 à ribonuclease seminal bovina (BS-RNase), uma proteína de 13,6 kDa e pI 8,98, produzida pelas vesículas seminais. Esta enzima pertence à superfamília das ribonucleases tipo-pancreáticas e é classificada como uma das principais proteínas básicas do plasma seminal bovino, sendo esta espécie a única a produzi-la (SCHEIT, 1986; CALVETE *et al.*, 1996). Assumpção e colaboradores (2005) identificaram um precursor da ribonuclease seminal com Mr= 17,2 e pI= 8,6 em touros Nelore. Shivaji e colaboradores (1989) demonstraram que esta proteína cobre a superfície do espermatozoide bovino na ejaculação. A ribonuclease é expressa em diversos tecidos e suas funções como agente antitumoral já são bem estabelecidas, mas no plasma seminal seu papel ainda é obscuro (CALVETE *et al.*, 1996). Porém, em ensaios laboratoriais, especula-se que a BS-RNase parece ser provida de uma efetiva atividade imunossupressora, sugerindo que tenha funções acerca da proteção do espermatozoide contra o sistema imunológico da fêmea (ALESSIO, 1999; RUSSO *et al.*, 2002). Ainda neste grupo, os *spots* 7102 (Mr= 16,0 e pI= 7,7) e 7303 (Mr=18,4 e pI 7,9), que juntos representam 1,32% da intensidade total dos géis, podem corresponder à proteína TIMP-2 (inibidor tecidual de metaloproteinase 2) que tem um valor de pH menor que o da BS-RNase. Jobim e colaboradores (2003) relacionaram uma banda proteica de 16 – 18 kDa e pI 7,0 – 7,5 à TIMP-2, baseado na semelhança dos pesos moleculares e pontos isoelétricos. A TIMP-2 é uma proteína de 16 e 21 kDa e pI 6,93 que foi identificada pela primeira vez no plasma por Calvete e colaboradores em 1996 e posteriormente por Mortarino e colaboradores em 1998, ambos autores foram os primeiros a observarem a ligação da TIMP-2 ao espermatozoide. A proteína de ligação à heparina HBP-24, relacionada à fertilidade de reprodutores, apresentou 90% de homologia com a TIMP-2. Assumpção e colaboradores (2005) identificaram um precursor da TIMP-2 com Mr= 21,7 kDa e pI= 6,7 no plasma seminal de touros Nelore.

Os *spots* do Grupo 3 (Mr= 24,3 - 27,1 e pI= 6,2 - 7,9) representam 8,04% da intensidade total das proteínas detectadas nos géis. Nesse ínterim, Jobim e colaboradores (2003) encontraram duas bandas proteicas relevantes: uma banda proteica (20 – 24 kDa, pI 7,2 – 7,5) representando 8,54% das proteínas quantificadas nos géis, que foi relacionada à proteína P6, uma proteína de 20 kDa, classificada como uma das principais proteínas básicas do plasma seminal. Esta proteína é secretada pelas vesículas seminais e é idêntica à MCP-1 bovina (Monocyte chemoattractant protein-1), uma importante quimiocina que recruta monócitos para os vasos sanguíneos. A outra banda proteica obtida neste mesmo estudo (Mr= 25 – 26 kDa e

pI= 6,0 – 6,5) foi relacionada à prostaglandina D-sintetase tipo lipocalina, uma proteína de 26 kDa, pI 6,2 relacionada à alta fertilidade de reprodutores bovinos e à congelabilidade do sêmen. Killian e colaboradores (1993) identificaram uma proteína associada à fertilidade (Mr= 26 kDa, pI= 6,2) no plasma seminal bovino que se assemelha à proteína de ligação à heparina de caráter básico, com 24 kDa, descrita por Miller e colaboradores (1990).

A prostaglandina D-sintetase é a principal proteína secretada pelo epidídimo de mamíferos, incluindo o bovino, sendo reconhecida como uma molécula multifuncional. As funções mais prováveis desta proteína nos testículos e epidídimos parecem estar relacionadas, por exemplo, à facilitação do transporte de moléculas importantes para a espermatogênese, como o hormônio tireoide T3 e o ácido retinoico, já que ambas as moléculas têm mostrado ligar-se à proteína *in vitro*, e à regulação e manutenção das funções do epitélio epididimário, devido à sua alta capacidade de ligação à testosterona. Baseado nisso, sugere-se que a proteína desempenhe um papel fundamental no desenvolvimento e maturação do espermatozoide (GERENA *et al.*, 2000a, b; SAMY *et al.*, 2000; FOUCHÉCOURT *et al.*, 2002). Porém, não há relatos da correlação dessa proteína com as características físicas do sêmen (SORRENTINO *et al.*, 1998, citados por CHACUR & MACHADO NETO, 2007). Entretanto, Moura e colaboradores (2006a) relataram isoformas da prostaglandina D-sintetase no fluido da cauda do epidídimo (Mr= 24 – 27 kDa, pI= 6,3 – 5,8) cuja intensidade média foi 2,2 a 3,2 vezes maior em touros de baixa fertilidade. Segundo estes autores, esta proteína poderia influenciar a fertilidade do macho através da mediação da ação de moléculas hidrofóbicas no espermatozoide durante o trânsito epididimário ou ao armazenamento na cauda do epidídimo. Embora estes resultados pareçam contraditórios, uma possível explicação seria de que as proteínas secretadas pelas glândulas sexuais acessórias poderiam modificar algumas dessas isoformas durante a ejaculação (SOUZA *et al.*, 2011).

No Grupo 4, os *spots* 4103 (Mr= 16,2 kDa e pI= 6,4), 4106 (Mr= 16,4 kDa e pI= 6,2) e 5103 (Mr= 16,1 kDa e pI= 6,9) têm Mr e pI aproximados à dois *spots* encontrados por Romitto (2003), além de possuírem localização semelhante nos géis, a saber: o *spot* 70 em touros Nelore (Mr= 16,9 kDa e pI= 6,4) e o *spot* 156 em touros Simental (Mr= 18,5 kDa e pI= 6,3). A autora relacionou estes dados com um *spot* de 17,4 kDa e pI 6,4 detectado por Roncoletta (2003) que foi designado como marcador para baixa fertilidade naquele estudo. No estudo de Romitto (2003) a intensidade do *spot* encontrado nos touros Nelores foi maior nas amostras de animais ligados a parâmetros de melhor desempenho reprodutivo, enquanto que a intensidade do *spot* encontrado nos touros Simental, concordando com Roncoletta (2003), foi

maior nas amostras de animais ligados a parâmetros de baixo desempenho reprodutivo. Outro peptídeo, também com peso molecular e pI próximos aos observados nos três *spots* supracitados deste estudo, foi descrito por Killian e colaboradores (1993) como uma proteína associada a baixa fertilidade em touros de 16 kDa e pI 6,7.

O Grupo 5 deste estudo revelou seis *spots* em cadeia de peptídeos com uma faixa de peso molecular relativo de 29,34 – 30,43 kDa e pI de 3,53 – 4,16. Esta cadeia de peptídeos se assemelha quanto à localização, ao peso molecular e ao ponto isoelétrico aos *spots* relacionados à proteína BSP5 (antiga BSP-30 kDa) em estudo do plasma seminal de touros Brahman por Silva (2011) e a uma cadeia composta por cinco *spots* identificada no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros Holandeses como isoformas da BSP-30 kDa por Moura e colaboradores (2007). Desnoyers e colaboradores (1994) também identificaram a BSP-30 kDa por 2D-PAGE a 28 kDa e pI 3,9 – 4,6 e obtiveram resultado similar utilizando imunodeteção, por Western blot. Estes autores observaram certa heterogeneidade da BSP-30 kDa e atribuíram isto principalmente ao teor de ácido siálico da proteína.

Os *spots* do Grupo 6: *spot* 4725 (Mr= 76,2 kDa e pI= 5,8), *spot* 3704 (Mr= 77,6 kDa e pI= 5,7) e *spot* 3706 (Mr= 75,6 kDa e pI= 5,9) estavam presentes em todos os géis e se expressaram de forma heterogênea entre animais. De acordo com outros estudos existentes na literatura estes peptídeos podem se tratar da proteína clusterina (KUMAR *et al.*, 2012). Esta proteína foi identificada no fluido das glândulas sexuais acessórias de touros Holandeses por Moura e colaboradores (2007) com Mr= 70 kDa e pI= 5,7. Ibrahim e colaboradores (1999) identificaram esta proteína a 74 kDa no fluido da cauda do epidídimo de bovinos. Segundo estes autores, dois tipos de clusterina parecem existir no fluido da cauda do epidídimo bovino, mas o grau de glicosilação faz com que ambos migrem para aproximadamente o mesmo peso molecular. Entretanto, Jobim e colaboradores (2004) reportaram um *spot* de 18 – 20 kDa e pI 4,8–5,2 como sendo a clusterina, a partir da comparação com uma proteína do plasma seminal sequenciada por Mortarino e colaboradores (1998) com estrutura similar ao precursor da clusterina bovina em um peso molecular de 25,35 kDa e pI 5,54. A clusterina está envolvida em diversos eventos bioquímicos, principalmente na espermatogênese, tais como: prevenção de danos espermáticos causados por reações oxidativas e precipitação de proteínas, mediação da aglutinação de espermatozoides anormais e controle da lise induzida pelo complemento. Porém, as funções desta proteína no trato reprodutivo do macho ainda não estão completamente estabelecidas (IBRAHIM *et al.*, 1999; MOURA *et al.*, 2007).

Dentre os três *spots* do Grupo 7 ( $M_r = 65,5 - 66,5$  kDa e  $pI = 5,5 - 5,9$ ) dois estavam presentes em 100% dos géis e um esteve ausente em apenas um gel (*spot* 3702,  $M_r = 66,5$  kDa e  $pI = 5,5$ ). Estes *spots* exibiram  $M_r$ ,  $pI$  e localização nos géis semelhantes à albumina. A albumina foi imunoidentificada com  $M_r = 66$  kDa e  $pI = 5,4$  por Oberst e colaboradores (2002) em taurinos e zebuínos utilizando anticorpo monoclonal específico, que não reagiu com nenhuma outra banda proteica presente na amostra avaliada. Os reprodutores taurinos apresentaram maior homogeneidade na expressão da proteína que os zebuínos. Roncoletta (1999), também observou maior homogeneidade no perfil proteico do plasma seminal de reprodutores taurinos do que nas amostras de zebuínos. Isto pode ser atribuído à seleção genética artificial que a subespécie taurina vem sendo submetida ao longo do tempo (OBERST *et al.*, 2002). Fato oposto ocorreu neste estudo no qual foram observadas variações individuais nas densidades ópticas dos *spots* mencionados, ou seja, a expressão dessa proteína se deu de forma mais heterogênea.

Os peptídeos do Grupo 8 ( $M_r = 41,7 - 42,3$  e  $pI = 4,4 - 5,1$ ) e do Grupo 9 ( $M_r = 45,2 - 46,1$  e  $pI = 7,2 - 7,5$ ) apresentaram grande variabilidade individual na intensidade dos *spots*. Os três *spots* que compõem o Grupo 9 estavam presentes em 67% dos animais. Dentre os que constituem o Grupo 8, quatro estavam ausentes em apenas um gel e dois estiveram presentes em 86% dos géis. Outros estudos também constataram grandes variações entre géis na intensidade de certas proteínas e por este motivo a análise destas bandas proteicas não foi realizada (FRAZER *et al.*, 1996; RONCOLETTA *et al.*, 1999). Em razão da grande variabilidade observada nas bandas proteicas com pesos acima de 40 kDa, tanto em taurinos quanto em zebuínos, Oberst e colaboradores (2002) quantificaram apenas três proteínas ( $M_r = 195$  kDa,  $pI = 6,5 - 7,5$ ;  $M_r = 66$  kDa,  $pI = 5,4$ ;  $M_r = 55$  kDa,  $pI = 4,5$ ), presentes em 100% das amostras analisadas, porém nenhuma proteína dentro da faixa de  $M_r$  e  $pI$  dos Grupos 8 e 9 deste estudo foi identificada. Chacur e colaboradores (2011) encontraram uma banda proteica com peso molecular de 44 kDa, presente em 18,18% dos touros Tabapuã na seca e em 72,7% dos touros na estação chuvosa. Vierula e Rajaniemi (1983), citados por Chacur e colaboradores (2011), relataram que as proteínas de 40 e 44 kDa se aderem à membrana interna do acrossomo e participam da reação acrossômica, colaborando com o influxo de cálcio neste processo. Os dois “trens” supracitados (Grupos 8 e 9) estão nesta faixa de peso molecular relatada por estes autores. Porém, não foi observada nos géis de perfis bidimensionais do plasma seminal de outras raças a expressão desses peptídeos de acordo com o padrão encontrado nesse estudo.

Ainda se destacam neste estudo os *spots* 3513 ( $M_r = 49,5$  kDa e  $pI = 5,1$ ) e 3514 ( $M_r = 49,8$  kDa e  $pI = 5,2$ ). Romitto (2003) observou em touros Nelore dois *spots* – o primeiro com  $M_r = 49,4$  kDa e  $pI = 5,9$  e o segundo com  $M_r = 49,2$  kDa e  $pI = 5,9$  – que foram relacionados potencialmente à alta fertilidade. Wolfe e colaboradores (1993) constataram o desaparecimento de uma banda de 49 kDa após a insolação escrotal de bovinos de corte, sugerindo o papel desta proteína como marcadora para boa fertilidade.

Há várias pesquisas que demonstram a influência, tanto positiva quanto negativa, das proteínas no plasma seminal sobre a fertilidade do macho e os parâmetros seminais. Em função disso, buscou-se no presente trabalho estudar as relações existentes entre as intensidades dos *spots* proteicos e os parâmetros espermáticos dos touros Pantaneiros. Assim, foram observadas correlações significativas com seis *spots* (Tabela 2). Os *spots* 1112, 3514, 2720 e 9217, apresentaram alta correlação negativa com defeitos maiores. Não foram associadas possíveis proteínas correspondentes ao *spot* 1112, expresso em 39% dos géis e ao *spot* 2720, ausente em apenas um gel. Este último também apresentou correlação negativa com motilidade e vigor, ou seja, as maiores intensidades desse *spot* ocorreram nos animais que apresentaram menores valores para esses parâmetros espermáticos. Baseado nos estudos de Wolfe e colaboradores (1993) e de Romitto (2003), conforme supracitado, o *spot* 3514 pode corresponder a uma proteína associada à alta fertilidade do macho, o que pode explicar a correlação negativa desse *spot* com defeitos maiores. A diminuição de defeitos maiores e totais foi associada à presença dos *spots* 9217 e 8305, ambos possivelmente condizem com a ribonuclease seminal bovina (BS-RNase). Estudos relatam que embora todos os membros da superfamília das ribonucleases desempenhem obrigatoriamente a função de catalisadores da clivagem do RNA, eles diferem na especificidade do substrato e também realizam diversas funções biológicas. A ribonuclease seminal bovina é altamente específica para os híbridos RNA e DNA/RNA de cadeia dupla. No entanto esta proteína também apresenta atividades relativas à antigenicidade espermática, embriotoxicidade, imunossupressão e funções antitumorais e antivirais (CHAKRABARTI *et al.*, 2004). Também tem sido demonstrado que a proteína pode desestabilizar a bicamada lipídica carregada negativamente (VESCIA & TRAMONTANO, 1981; LACCETTI *et al.*, 1994; MANCHEÑO *et al.*, 1994). Especula-se que a correlação negativa com os defeitos de morfologia espermática parece ocorrer devido ao efeito citotóxico seletivo dessa proteína, atuando em células espermáticas anormais mediante mecanismo ainda não elucidado. Mas vale ressaltar que assim como outras características atribuídas a esta enzima, tais como antigenicidade espermática e atividade imunossupressora, o

seu efeito citotóxico ainda é um resultado obtido de ensaios laboratoriais projetados para suas, ainda desconhecidas, ações fisiológicas (ALESSIO, 1999; RUSSO *et al.*, 2002). O *spot* 4106 (16,35 kDa e pI 6,24), descrito dentre os peptídeos do Grupo 4, apresentou correlação negativa com defeitos menores. Esse *spot* mostrou-se semelhante a uma proteína associada à baixa fertilidade de reprodutores e, portanto, seria esperado que se correlacionasse positivamente com defeitos de morfologia espermática. Apesar disso, o resultado observado nesse estudo foi similar ao encontrado por Romitto (2003) em touros Nelore. Esta autora encontrou resultados divergentes nas duas raças pesquisadas: o *spot* encontrado em touros Nelore foi relacionado negativamente a parâmetros de baixo desempenho reprodutivo, inclusive defeitos maiores, enquanto que em touros Simental essa relação foi positiva. Os valores de Mr e pI do *spot* encontrado em touros Nelore no estudo de Romitto (2003) foram bastante próximos aos valores observados no *spot* 4106 deste estudo. Diante desses resultados inconstantes, especula-se que talvez esse peptídeo não seja adequado para ser utilizado na classificação da fertilidade em touros.

A análise de correlação entre as proteínas do plasma seminal e os defeitos morfológicos das células espermáticas podem permitir uma melhor avaliação do potencial reprodutivo do touro, pois se sabe que espermatozoides morfológicamente anormais no sêmen correlacionam-se com a subfertilidade e a infertilidade do macho (SAACKE, 2008; FRENEAU, 2011).

Neste estudo foi descrito pela primeira vez o perfil eletroforético bidimensional das proteínas do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros e sua relação com os parâmetros seminais. Estes achados poderão contribuir em trabalhos de conservação desse valioso recurso genético, seja com informações que contribuam para a realização de novas pesquisas ou como subsídio para a validação de marcadores de fertilidade para serem usados em programas de melhoramento.

## 4 CONCLUSÕES

Os mapas bidimensionais de reprodutores Pantaneiros esboçaram variações individuais na expressão dos *spots* proteicos. Devido à análise do perfil das proteínas do plasma seminal de touros Pantaneiros (*Bos taurus ibericus*) ter detectado *spots* semelhantes aos encontrados tanto em *Bos taurus taurus* quanto em *Bos taurus indicus*, é possível supor que a raça tenha características únicas que reflitam esta heterogeneidade apresentada em seu perfil proteico.

A maior parte das proteínas expressadas nos mapas proteicos do presente estudo está situada na faixa considerada de alto peso molecular. As proteínas seminais mais abundantes parecem pertencer à família das BSP's. As associações encontradas entre os peptídeos do plasma seminal e os parâmetros seminais indicam a existência de proteínas candidatas a marcadores bioquímicos que podem ser úteis na avaliação do potencial reprodutivo de touros Pantaneiros. No entanto, é importante confirmar a identidade das proteínas sugeridas neste trabalho por meio de técnicas de sequenciamento ou pelo uso de antígenos específicos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, G. Evolution of oligomeric proteins: the unusual case of a dimeric ribonuclease. **Eur. J. Biochem.** 266, 699-708 (1999).

AMANN, R. P.; Evaluation of sperm quality: can we pick the winners? In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11. Belo Horizonte, 1995. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. V. 1, p. 206-212.

ASSUMPÇÃO, T. I.; FONTES, W., SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O. Proteome analysis of Nelore Bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. **Protein & Peptide Letters**, 12, 813-817, 2005.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaermed.**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Anal Biochem.** 72, 248-254, 1976.

CALVETE, J.; VARELA, P.; SANZ, L.; *et al.* Procedure for large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. **Protein Expr Purif.** 1996; 8:48-56.

CHACUR, M. G. M.; CASTILLO, A. M. N.; GUABERTO, L. M. Influência das estações seca e chuvosa no plasma seminal (SDS-PAGE) e características do ejaculado de touros *Bos taurus indicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1565-1574, out./dez. 2011.

CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 47-53, jan./jun. 2007.

CHAKRABARTI, K. S.; SANJEEV, B. S.; VISHVESHWARA, S. Stability and dynamics of domain-swapped bovine-seminal ribonuclease. **Chemistry e Biodiversity**, V. 1, p. 802-818. 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

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

EGITO, A. A.; **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação.** 2007. 232f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituição de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**. v. 51, p. 39-52. 2002.

FOLHADELLA, I. M.; CASTRO, T. S.; SALVADOR, D. F.; *et al.* Identificação de proteínas do plasma seminal de touros da raça Gir. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.64-71, jan./mar. 2013.

FOUCHÉCOURT, S.; CHARPIGNY, G.; REINAUD, P.; *et al.* Mammalian lipocalin-type prostaglandin D2-synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, vol. 66, n. 2 458-467, 2002.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M.; BROOKS, C. L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half- milliliter straws. **Theriogenology** 46:1103-1115. 1996.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.35, n.2, p.160-170, abr./jun. 2011.

GERENA, R. L.; EGUCHI, N.; URADE, Y., KILLIAN, G. J. Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D-synthase in the adult murine testis and epididymis. **Journal of Andrology**, vol. 21, n. 6, 2000a.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; EGUCHI, N. *et al.* Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D-synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction**, vol. 62 n. 3, 547-556, 2000b.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y., *et al.* Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v.58, p.826-833, 1998.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

IBRAHIM, N. M.; TROEDSSON, M. H. T.; FOSTER, D. N.; *et al.* Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**. V.20; n.2. March/April 1999.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas à congelabilidade do sêmen bovino. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; Belo Horizonte; **Anais...** Belo Horizonte; 2009 (CD-ROM).

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; *et al.* Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese

bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 21-30, 2003.

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61; p. 255–266. 2004.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod.** 1993; 49:1202–7.

KUMAR, P.; KUMAR, D.; SINGH, I.; YADAV, P. S. Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. **Agric. Res.**, Jan/Mar, 2012, 1(1):78–86.

LACCETTI, P.; SPALLETTI-CERNIA, D.; PORTELLA, G.; *et al.* Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of lewis lung carcinoma. **Cancer Res.**54:4253-4256. 1994.

LEAHY, T.; GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, 47 (4):207–213, 2012.

MANCHEÑO, J. M.; GASSET, M.; OÑADERRA, M.; *et al.* Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 199, n. 1, p.119-124, 1994.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochem. J.** 241, 685-692, 1987.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; McMANUS, C.; LOPES, M. A.; PAIVA, S. R. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brasil. **Livestock Science**, v. 120, p. 204-202, 2009.

MENDES. E. D. M.; COMASTRI FILHO, J. A.; CRISPIM, S. M. A. Núcleos de conservação Fazenda Nhumirim. Folder técnico. Corumbá, **EMBRAPA Pantanal**, Novembro, 2012. 13p.

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**, Madison, v.42, p.899-915, 1990.

MOREIRA, N. H.; NASCIMENTO, N. V.; BARBOSA, E. A.; *et al.* Congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros em diferentes épocas do ano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19, 2011, Recife. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2011. p. 137.

MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A.; *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, 1998;19:797–801.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; *et al.* A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci.** 98, 169-88, 2007.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, Vol. 27, No. 4, July/August 2006a.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; *et al.* Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J. Androl.** 27, 201-211, 2006b.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E. A.; CHAPMAN, D. A.; *et al.* Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v.73, p.2006-2020, 2010.

NASCIMENTO, N. V.; MARIANTE, A. S.; SILVA, A. V. R. *et al.*, Monitoramento do sêmen de bovino da raça Junqueira estocado no banco brasileiro de germoplasma animal. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica - FUNCREDI, 2008. p.528.

OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; CIMAROSTI, H. I.; *et al.* Imunoidentificação de albumina e osteopontina no plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 21-28, 2002.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, A. M. N. C. **Efeito da sazonalidade no perfil proteico do plasma seminal e influência do probiótico no quadro espermático em touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 82f. Dissertação de mestrado. Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2007.

RAMOS, A. F.; FINO, T. C. M.; NASCIMENTO, N. V.; MARIANTE, A. S. Efeito da alta e baixa concentração de gema de ovo no congelamento de sêmen caprino sem remoção do plasma seminal. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica - FUNCREDI, 2008. p.526.

RAMOS, A. F.; NASCIMENTO, N. V.; SILVA, A. V. R.; *et al.* Qualidade do sêmen bovino estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: Simposio Iberoamericano Sobre Conservación e Utilización de Recursos Zoogenéticos, 10, 2009, Palmira, Colombia. **Memórias...** Palmira, Colômbia: Universidad Nacional de Colombia, 2009. p.499-502.

RÊGO, J. P. A.; SOUSA, F.; SOUZA, C. E. A.; *et al.* Reproductive Criteria of Tropically-Adapted Morada Nova Rams from Brazil. **43<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**. Portland, 30 July–3 August, 2010. USA.

ROMITTO, G. C. **Perfil bidimensional das proteínas de plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. 2003. 192f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H.; *et al.* Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** vol.36, n.2, São Paulo, 1999.

RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros.** 2003. 104f. Tese (doutorado em medicina veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H. R.; FRANCHESCHINI, P. H. Proteomics to investigate bull's semen freezability. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2013.

RUSSO, A.; ANTIGNANI, A.; GIANCOLA, C.; ALESSIO, G. Engineering the refolding pathway and the quaternary structure of seminal ribonuclease by newly introduced disulfide bridges. **The journal of biological chemistry.** V.277, 50, (13), 48643–48649, December, 2002.

SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, 70 (2008) 473–478.

SAMY, E. T.; LI, J. C.; GRIMA, J.; *et al.* Sertoli cell prostaglandin D2-synthetase is a multifunctional molecule: its expression and regulation. **Endocrinology**, 141(2):710-21. Feb. 2000.

SÁNCHEZ-LUENGO, S.; AUMÜLLER, G.; ALBRECHT, M. *et al.* Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. **Journal of Andrology**, Vol. 25, No. 2, March/April 2004.

SCHEIT, K. H. The major basic protein of bull seminal vesicle secretion. **Biol Chem Hoppe Seyler** 1986; 3:229–33.

SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, 1996; 45:633–42.

SHIVAJI, S.; RUKMINI, V.; GUPTA, P. D.; BHARGAVA, P. M. Localization of bovine seminal plasma RNA-A BS1, on the surface of bovine spermatozoa. **Cell Mol Biol.** 1989; 3:285–91.

SILVA, M. M. **Proteínas do plasma seminal de touros *Bos indicus* e associações com parâmetros seminais.** 2011. 71f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, Departamento de zootecnia, Fortaleza, 2011.

SORIANO, B. M. A.; ALVES, M. J. M. **Boletim agrometeorológico ano 2002 para a sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato grosso do Sul, Brasil.** Série documentos, EMBRAPA-CPAP. 76: 1-28, 2005.

SORRENTINO, C.; SILVESTRINI, B.; BRAGHIROLI, L.; Rat prostaglandin D2 synthetase: its tissue distribution, changes during maturation and regulation in the testis and epididymis. **Biology of Reproduction**, New York, v.59, p.843-853, 1998.

SOUZA, C. E. A.; ARAUJO, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; *et al.* Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, 45, 644-653, 2010a.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; LIMA-SOUZA, A. C.; KILLIAN, G. J. Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.3, p.535-543, 2011

SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; *et al.* Identification of the major proteins of ram seminal plasma using a proteomic approach. In: 35th Annual Meeting of the American Society of Andrology, 2010, Houston, Texas. **Journal of Andrology**. Shumburg, IL, USA: American Society of Andrology, p. 63-64. 2010b.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

VAN-TILBURG, M. F.; RODRIGUES, M. A. M.; MOREIRA, R. A. *et al.* Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**. 79 (2013) 1247–1261.

VESCIA, S.; TRAMONTANO, D. Antitumoral action of bovine seminal ribonuclease. **Mol. Cell Biochem**. V. 36, pl125-128, 1981.

VIERULA, M.; RAJANIEMI, H. Effect of seminal plasma and calcium on the stability of the surface protein composition of ejaculated bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, Washington, v. 15, n. 3, p. 435-445, 1983.

WELTER, B. M. **Proteínas do plasma seminal e sua relação com características espermáticas e nível sérico de testosterona em touros da raça Nelore**. 2006. 34f. Dissertação de mestrado. Faculdade de medicina veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

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, (5), 1083-1091. November, 1993.

## **CAPÍTULO 3**

## PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS PANTANEIROS E SUA RELAÇÃO COM A CONGELABILIDADE DO SÊMEN

Paula Lorena Grangeira Souto<sup>1</sup>, Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura<sup>2</sup>, Mauricio Fraga Van-Tilburg<sup>2</sup>, Eleonora Araújo Barbosa<sup>1</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>4</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Escola de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, DF, Brasil, <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, UFC, CE, Brasil, <sup>3</sup>Embrapa Pantanal, MS, Brasil, <sup>4</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE, Brasil, <sup>5</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Brasil. E-mail: alexandre.floriani@embrapa.br

### RESUMO

Estudos acerca de animais localmente adaptados são essenciais para nortear as ações dos programas de conservação de recursos genéticos animais. O objetivo deste trabalho foi correlacionar o perfil eletroforético bidimensional das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros. Utilizou-se ejaculados de dezoito touros Pantaneiros, divididos em dois grupos: de melhor e de pior congelabilidade. As amostras de sêmen pré-criopreservação foram avaliadas quanto à motilidade, vigor e morfologia espermática e as amostras de sêmen pós-criopreservação, avaliadas quanto à cinética pelo CASA, morfologia, integridade de membrana e acrossoma. As amostras de plasma seminal foram obtidas por centrifugação do sêmen e as proteínas seminais foram separadas por meio de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), corados com Coomassie coloidal G-250 e analisados por meio do aplicativo PDQuest<sup>TM</sup>. Foram detectados 277 *spots* nos mapas bidimensionais do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros. Nove *spots* apresentaram associações consistentes e significativas com os parâmetros seminais pós-criopreservação. Destes *spots*, cinco apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de melhor e pior congelabilidade do sêmen. A análise multivariada apontou cinco *spots* correlacionados positivamente com os parâmetros de boa congelabilidade do sêmen. Houve diferenças no perfil proteico do plasma seminal entre os reprodutores de melhor e de pior congelabilidade do sêmen e a análise dos géis revelou uma heterogeneidade nos perfis individuais. Devido à associação dos *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 e 2227 a proteínas encontradas em amostras de sêmen de alta congelabilidade e também relacionadas a eventos

benéficos sobre as funções espermáticas, sugere-se que a presença dos mesmos está ligada à melhor congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros.

**Palavras-chave:** conservação, criopreservação, eletroforese, proteínas.

## SEMINAL PLASMA PROTEOMICS AND ITS RELATIONSHIP WITH THE SEMEN FREEZABILITY FROM PANTANEIRO BULLS

Paula Lorena Grangeira Souto<sup>1</sup>, Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura<sup>2</sup>, Mauricio Fraga Van-Tilburg<sup>2</sup>, Eleonora Araújo Barbosa<sup>1</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>4</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine UnB, DF, Brazil, <sup>2</sup>Department of Animal Science, UFC, CE, Brazil, <sup>3</sup>Embrapa Pantanal, MS, Brazil, <sup>4</sup>Embrapa Coastal Tableland, SE, Brazil, <sup>5</sup>Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, DF, Brazil. E-mail: paulalgsouto@gmail.com

### ABSTRACT

Studies on locally adapted breeds are essential to guide the actions of the programs for conservation of animal genetic resources. The aim of this study was to correlate the two-dimensional electrophoretic profile of seminal plasma proteins with semen freezability from Pantaneiro bulls. We used ejaculates from eighteen Pantaneiro bulls divided into two groups: best and worst freezability. The sperm parameters motility, viability and morphology were evaluated before cryopreservation and also were evaluated after cryopreservation and further were evaluated CASA kinetics, integrity membrane and acrosome. Seminal plasma samples were obtained by semen centrifugation and seminal proteins were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels were stained with colloidal Coomassie G-250 and analyzed using the PDQuest™. Were detected 277 *spots* in two-dimensional maps of the seminal plasma of Pantaneiro bulls. Nine *spots* showed consistent and significant associations with semen parameters after cryopreservation. Five these *spots* showed differences ( $P < 0.05$ ) between freezability groups. The multivariate analysis showed five *spots* positively correlated with the semen parameters for good freezability. There were differences in the seminal plasma protein profile between bulls of best and worst semen freezability. The analysis of the gels also revealed heterogeneity in individual profiles. Due the association of *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 and 2227 with proteins found in animals with high freezability of semen and it relating to beneficial events on sperm functions, it is suggested that their presence is linked to better semen freezability of Pantaneiro bulls.

**Keywords:** conservation, cryopreservation, electrophoresis, proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

Descendente de raças espanholas, o bovino Pantaneiro (*Bos taurus ibericus*) é uma raça localmente adaptada às condições edafoclimáticas do Pantanal brasileiro (EGITO, 2007; MARIANTE *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012). A criopreservação de gametas permite preservar esse material genético por longo período. No entanto, apesar dos avanços nas técnicas de criopreservação, ainda há perdas em torno de 50% de espermatozoides viáveis e os resultados quanto a qualidade e o potencial fecundante de espermatozoides criopreservados são inconstantes mesmo em animais com boa avaliação do sêmen pré-criopreservação (SALAMON & MAXWELL, 2000; MARIANTE *et al.*, 2011).

Reprodutores podem ser classificados segundo o grau de congelabilidade do sêmen em bons ou maus congeladores. Esta característica se deve, principalmente, à predisposição genética para a tolerância espermática ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000). A existência de diversos fatores que interferem em eventos fisiológicos do animal envolvidos nos eventos da criopreservação dificulta a predição da congelabilidade do sêmen (MUER *et al.*, 1988; MAXWELL & JOHNSON, 1997). Dentre esses fatores, pesquisas recentes relatam a associação de algumas proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen em bovinos (RONCOLETTA *et al.*, 2000; JOBIM *et al.*, 2009; RONCOLETTA *et al.*, 2013). As proteínas do plasma seminal também se expressam em diversos órgãos, com múltiplas funções, mas o conhecimento sobre os efeitos regulatórios destas proteínas sobre as funções espermáticas ainda não está totalmente esclarecido.

Uma proteína de 26 kDa, identificada através de imunodeteção como sendo a prostaglandina D-sintetase tipo lipocalina, foi mais presente no plasma seminal de reprodutores bovinos com melhor congelabilidade do sêmen (RONCOLETTA *et al.*, 2000) e depois também foi correlacionada com a fertilidade de touros (KILLIAN *et al.*, 1993). Por meio da técnica de

eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), atual método de escolha para separar e caracterizar proteínas, já foram descritos prováveis marcadores proteicos para a congelabilidade e fertilidade do sêmen de várias espécies, revelando resultados promissores (HIRON *et al.*, 2006; CASAS *et al.*, 2009; KILLIAN *et al.*, 1993; CARDOZO *et al.*, 2006; TREIN, 2011). Utilizando a 2D-PAGE a proteína ácida do fluído seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina, foram relacionadas com a alta congelabilidade do sêmen bovino (JOBIM *et al.*, 2009). Identificou-se por meio de anticorpo policlonal específico, as proteínas ligadoras de fosfolipídeos BSP A1/A2 no plasma seminal de bovinos, sugerindo que essas proteínas possam ser utilizadas como marcadores para alta congelabilidade do sêmen (MATTOS *et al.*, 2004). Porém, um trabalho demonstrou um decréscimo das BSP's pós-criopreservação, o que pode indicar uma função ainda desconhecida destas proteínas (NAUC & MANJUNATH, 2000).

A análise proteômica do plasma seminal e sua relação com os parâmetros do sêmen criopreservado permite apontar potenciais marcadores bioquímicos que podem ser utilizados como ferramenta para prever a congelabilidade do sêmen. Em adição, haverá uma contribuição para a melhoria da qualidade do material estocado em bancos de germoplasma. De acordo com a necessidade, esses bancos poderão ser acessados a fim de se utilizar esta reserva gênica para uso posterior no manejo reprodutivo dos núcleos de conservação ou em programas de melhoramento genético. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil eletroforético bidimensional das proteínas do plasma seminal e relacioná-lo com a congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento experimental

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA/IB n.º 99697/2012) e foi conduzido durante o período compreendido entre novembro de 2012 e agosto de 2013.

Foram utilizados dezoito touros Pantaneiros hígidos, mantidos em sistema extensivo de pastagem nativa. Estes animais estão situados em três propriedades distintas. Cinco touros se localizam no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira, parte da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal. O campo experimental localiza-se a sudoeste da cidade de Brasília, latitude 15° 55' 26.84" Sul e longitude 48° 2' 0.69" Oeste, em altitudes que variam de 1.050 a 1.250 m. Na região predomina o clima tipo Aw, na classificação climática de Köppen-Geiger, indicando inverno seco e verão chuvoso. A fazenda possui uma área total de 17,63 km<sup>2</sup>, distribuída em áreas de Cerrado, pastagem e agricultura. Outros seis animais situam-se no Núcleo de Conservação do Bovino Pantaneiro Fazenda Nhumirim, parte da Embrapa Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul. O Núcleo de Conservação do bovino Pantaneiro localiza-se na sub-região da Nhecolândia, bacia hidrográfica do Alto Paraguai, Pantanal Matogrossense, latitude 18° 59' 00" Sul e longitude 56° 39' 00" Oeste, em altitude de 98 m. O clima é definido como tropical sub-úmido, do tipo Aw, com duas estações bem definidas, sendo a estação de cheia de novembro a abril e de seca de maio a outubro (SORIANO & ALVES, 2005). Essa fazenda possui uma área total de 43,10 km<sup>2</sup>, onde predominam áreas de campos secos e inundáveis de pastagens nativa e cultivada, seguidos de cerrado, cordilheiras, vazantes, baías e salinas, que compõem a fitofisionomia local típica do Pantanal. Os últimos sete animais situam-se no núcleo de criação do bovino Pantaneiro, na Fazenda Santo Augusto, Rochedo, Mato Grosso do Sul, latitude 19° 57' 11" Sul e longitude 54° 53' 33" Oeste, em altitude de 260 m, na região da bacia do rio Prata. Está sobre influência do clima tropical (Aw), com características do clima úmido a sub-úmido. Há uma estação chuvosa durante um a seis meses e deficiência hídrica durante quatro meses. A fazenda possui uma área de 400 hectares e está localizada a 80 km de Campo Grande. O município de Rochedo caracteriza-se pelo verão muito quente e inverno muito frio. A cobertura

vegetal predominante é a pastagem cultivada. Mas há influência do bioma Cerrado, apresentando as seguintes fitofisionomias: Arbóreo denso (Cerradão) e Arbóreo aberto (campo Cerrado). As lavouras representam uma pequena parcela da região.

Ao exame andrológico os reprodutores Pantaneiros foram classificados como aptos à reprodução, segundo os parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de eletroejaculador. Cada ejaculado foi fracionado em duas partes: uma fração para o processamento do sêmen e outra para a extração do plasma seminal.

A fração destinada ao processamento de sêmen foi submetida às seguintes análises pré-criopreservação: avaliação das características imediatas (cor, aspecto e volume do ejaculado; motilidade subjetiva e vigor) e mediatas (concentração espermática e morfologia espermática); e às seguintes análises pós-criopreservação: cinética espermática por método computadorizado, morfologia espermática, avaliação da integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal.

O plasma seminal dos dezoito reprodutores foi submetido à eletroforese bidimensional e os géis revelados e analisados utilizando-se o software PDQuest™ Advanced versão 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA).

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o grau de congelabilidade, a saber: grupo de pior congelabilidade (Grupo I) e grupo de melhor congelabilidade (Grupo II). O parâmetro utilizado para esta classificação foi a motilidade pós-criopreservação obtida por leitura computadorizada (CASA). Os indivíduos que apresentaram motilidade pós-criopreservação superior a 30% foram alocados no grupo de melhor congelabilidade e os que apresentaram valor inferior foram alocados no grupo de pior congelabilidade.

## **2.2 Colheita e processamento do sêmen**

Antes de iniciar as atividades experimentais todos os touros foram submetidos a duas colheitas de sêmen, em dias alternados, e os ejaculados obtidos destas colheitas foram descartados. A colheita do sêmen dos dezoito reprodutores Pantaneiros foi realizada nos meses de dezembro de 2012 e janeiro de 2013, com auxílio de um sistema de eletroejaculação (Eletroejaculador Duboi<sup>®</sup>, Campo Grande, MS, Brasil). Cada ejaculado foi fracionado em duas

partes: uma fração para o processamento do sêmen e outra para a extração do plasma seminal. A fração destinada ao processamento do sêmen foi conduzida, imediatamente, ao banho-maria a 37°C, sendo retirada uma amostra para análise das características seminais imediatas e mediatas. O sêmen fresco foi avaliado macroscopicamente quanto às características de cor, aspecto e volume. Para a avaliação subjetiva da motilidade total e vigor, uma gota de ejaculado foi colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio óptico com contraste de fase (Olympus BX 50, Tokyo, Japan) em aumento de 100x. Para a mensuração da concentração espermática uma amostra de sêmen foi adicionada à solução salina de formol 0,9% na diluição 1:200. A contagem dos espermatozoides foi feita com auxílio de câmara de Neubauer modificada, em microscopia óptica direta. A morfologia do sêmen fresco foi analisada em preparação úmida, em microscopia de contraste de fase sob imersão com aumento de 1.000 x (NASCIMENTO *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2008, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011). Duzentas células foram contabilizadas e avaliadas quanto às anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, segundo a classificação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides normais, com defeitos maiores e com defeitos menores (BLOM, 1973).

A fração do ejaculado destinada à extração do plasma seminal, de cada reprodutor, foi centrifugada a 700 G, por 10 minutos, para separar o plasma dos espermatozoides. Para reduzir o processo de proteólise adicionou-se inibidor de protease (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) às amostras, que posteriormente foram aliquotadas e armazenadas à temperatura de -196°C (MOURA *et al.*, 2006a,b).

O restante do ejaculado foi pré-diluído, na diluição 1:2, com meio de congelamento à base de Tris-gema de ovo-glicerol 7% (20% de diluidor Tris base (Dilutris®, Semencon – Produtos agropecuários Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil); 60 % de água destilada; e 20% de gema de ovo). Para o congelamento do sêmen foi adicionado ao ejaculado pré-diluído, meio de congelamento na quantidade que permitisse que cada dose de sêmen possuísse  $40 \times 10^6$  spz/mL. O ejaculado diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e permaneceu sob refrigeração a 5°C por quatro horas para estabilização. Em seguida, as palhetas foram transferidas para um recipiente isotérmico contendo vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) onde foram mantidas a uma distância de quatro centímetros do nível de nitrogênio, por vinte minutos. Ao término desta etapa, as palhetas atingiram uma temperatura aproximada de -70°C e foram imersas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão de criobiológico (NASCIMENTO *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011).

## 2.3 Avaliações do sêmen pós-criopreservação

Três palhetas de cada reprodutor foram descongeladas em banho-maria a 37°C por trinta segundos e avaliadas na hora zero quanto às características de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma; e posteriormente, realizou-se a avaliação da morfologia espermática.

### 2.3.1 Avaliação da cinética e morfologia espermática

A cinética espermática foi avaliada por sistema computadorizado (Computer-assisted semen analysis - CASA). Para isso, dez microlitros da amostra de sêmen foram depositados na lâmina de leitura (Makler<sup>®</sup> Counting chamber, Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel, 10 µm) previamente aquecida a 37°C e avaliados no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences, previamente configurado (*setup*) para análise de sêmen bovino (Anexo C). Foram selecionados aleatoriamente três campos para a leitura e análise. Os seguintes parâmetros de cinética espermática foram mensurados: motilidade total (%; Mot), velocidade média do trajeto (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALH), frequência de batimentos de cauda (Hz; BCF), linearidade (%; LIN), espermatozoides rápidos (%; RAP) e espermatozoides estáticos (%; Static).

A análise morfológica do sêmen descongelado foi feita seguindo-se a mesma metodologia empregada na análise do sêmen fresco, qual seja: preparação úmida, em microscopia de contraste de fase sob imersão com aumento de 1.000 x (NASCIMENTO *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2008, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011). Duzentas células foram contabilizadas e avaliadas quanto às anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, segundo a classificação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides normais, com defeitos maiores e com defeitos menores (BLOM, 1973).

### 2.3.2 Avaliação da integridade da célula espermática

A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal da célula espermática foi realizada pelo método de microscopia de epifluorescência. Os fluoróforos utilizados foram: iodeto de propídeo (Molecular Probes<sup>®</sup>, Eugene, Oregon, USA); diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com lecitina de *Arachis hypogaea* (PNA) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missouri, USA). As soluções estoque de fluoróforos, após o preparo, foram alíquotadas em microtubo ao abrigo da luz e mantidas a -20°C. As soluções estoque de formaldeído e citrato de sódio foram mantidas sob refrigeração a 5°C. Toda as soluções de trabalho foram preparadas no dia da utilização.

#### 2.3.2.1 Avaliação da integridade acrossomal

A integridade do acrossomo foi avaliada utilizando a associação de isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com lecitina de *Arachis hypogaea* (PNA) e iodeto de propídeo (IP) de acordo com a técnica descrita por Kirk (2001), modificada por Landim-Alvarenga, citado por Cunha (2002). Uma alíquota de sêmen (10 µL) foi adicionada à 30 µL da solução de trabalho (Anexo D) e incubada por 10 minutos em microtubo protegido da luz. Uma alíquota de 10 µL desta solução incubada foi depositada em uma lâmina coberta com uma lamínula, avaliada em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 80i, Japan) utilizando filtro B-2A (comprimento de onda de 450-490 nm de excitação e 515 nm de barreira). Primeiramente foi realizada a contagem das células em campo claro e em seguida o mesmo campo foi visualizado sob epifluorescência. Foram contabilizadas 200 células por lâmina, classificadas em acordo com o proposto por Landim-Alvarenga, citado por Cunha (2002), em quatro categorias: a) Reação acrossomal verdadeira – emitindo apenas fluorescência verde; b) Falsa reação do acrossomo – emitindo fluorescência verde na região acrossomal e vermelha no núcleo; c) Espermatozoides com membrana lesada e acrossoma íntegro – emitindo apenas fluorescência vermelha; d) Espermatozoides íntegros (membrana íntegra e acrossoma íntegro) - células não coradas, visíveis apenas no campo claro.

### 2.3.2.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática, utilizou-se a associação dos fluoróforos diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP), de acordo com a descrição de Harrison e Vickers (1990), havendo uma adaptação na preparação da solução fixadora de formaldeído, que apresentou melhor resultado na concentração 5 mg/mL em vez de 2,5 mg/mL. Uma alíquota de sêmen (10 µL) foi adicionada à 30 µL da solução de trabalho (Anexo E) e incubada por 10 minutos em microtubo protegido da luz. Uma alíquota de 10 µL desta solução incubada foi depositada em uma lâmina coberta com uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse Ci, Japan) utilizando filtro B-2A (comprimento de onda de 450-490 nm de excitação e 515 nm de barreira). Foram contabilizadas 200 células por lâmina, sendo classificadas em duas categorias: membrana íntegra (células com presença de coloração verde na cabeça) e membrana lesada (células com presença de coloração verde e vermelha na cabeça; e células com coloração vermelha na cabeça).

### 2.4 Precipitação das proteínas do plasma seminal

O plasma seminal foi centrifugado uma segunda vez (10.000 g, 4°C, 60 minutos), com o intuito de remover possíveis *debris* celulares e espermatozoides remanescentes, de acordo com protocolo previamente descrito (MOURA *et al.*, 2006, 2010; SOUZA *et al.*, 2010b; RÉGO *et al.*, 2010).

As amostras foram submetidas à uma etapa para precipitação de proteínas, que é recomendada em certos casos como, por exemplo, quando se utiliza o método de eletroejaculação para a colheita do sêmen. Neste caso, o ejaculado tem maior chance de ser contaminado com substâncias que podem interferir no processo de eletroforese como os sais presentes na urina, por exemplo. Neste processo, adicionou-se à amostra um volume de acetona gelada na proporção de 1:10 (v/v). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de -20°C por, pelo menos, 2 horas para que as proteínas precipitassem. As amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 60 minutos a 4°C e, em seguida, secadas à temperatura de 4-8°C para a remoção de qualquer resíduo de acetona. O *pellet* formado foi ressuspensionado em 50 µL

de solução de reidratação (Ureia 7M; Tiourea 2M; Ditioneitol (DTT) 65 mM; anfólitos livres 2% (IPG buffer, pH 3-10); CHAPS 2%; e traços de azul de bromofenol).

## 2.5 Quantificação de proteínas totais no plasma seminal

Procedeu-se a quantificação da concentração de proteínas totais nas amostras pelo método de Bradford (1976). Inicialmente, uma curva analítica de calibração foi obtida a partir de soluções padrões, com concentrações de proteína conhecidas, sendo 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1.500 e 2.000 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) por mL. A cada 30 µL de solução padrão, adicionou-se 1,5 mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos de incubação as leituras de absorbância foram realizadas a 595 nm (NanoDrop 2000c Spectrophotometer®, Thermo Scientific, Wilmington, USA). A curva de calibração foi estabelecida pelas médias das duplicatas das absorbâncias obtidas, gerando uma equação linear de absorbância versus concentração ( $R^2= 0,990$ ) através da qual foi possível a determinação do teor de proteínas totais em cada uma das amostras experimentais (Anexo B).

Para quantificação dos teores de proteína nas amostras estas foram previamente diluídas 60 vezes (1:60) em solução tampão fosfato-salino (PBS), também em duplicata, para enquadramento da leitura de absorbância das amostras na curva padrão. Um volume de 30 µL da amostra diluída foi homogeneizado com 1,5 mL do reagente de Bradford. Após 10 minutos de incubação as leituras de absorbância foram realizadas a 595 nm e a média das duplicatas foram utilizadas para o cálculo do teor de proteína de cada amostra.

## 2.6 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

As amostras de plasma seminal foram submetidas à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes ou SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis) para separar as proteínas de acordo com a massa molecular relativa ( $M_r$ ) e ponto isoelétrico (pI) (O`FARREL, 1975; SOUZA *et al.*, 2010a, b; MOURA *et al.*, 2006, 2007, 2010; RÊGO *et al.*, 2010). Para cada amostra, uma quantidade de solução de reidratação suficiente para um volume final de 340 µl foi adicionada a um volume de plasma seminal contendo 500 µg de proteína. Em seguida, a solução foi homogeneizada e

disposta em canaletas individuais da bandeja de reidratação (uma canaleta por amostra). Sobre esta solução foi disposta uma tira de gel em poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado linear de 3-10 (Immobiline DryStrip gel – IPGs; GE Lifesciences, USA) de 18 cm de comprimento. As tiras foram cobertas com 2 mL de solução de óleo mineral para eletroforese (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare lifesciences, USA). O processo de reidratação das tiras compreendeu no mínimo 16 horas. Ao final da etapa de reidratação, as tiras foram removidas da bandeja, o excesso de óleo foi retirado e estas foram posicionadas no equipamento Ettan™ IPGphor 3 (GE Healthcare Bio-Sciences®, Uppsala, Sweden) e cobertas com solução de óleo mineral para eletroforese. Em seguida a focalização isoeletrica (IEF) foi iniciada com a seguinte programação: Passo I: 250V (500Vh); Passo II: 1.000V (1.000 Vh); Passo III: 8.000V (16.500 Vh); Passo IV: 8.000V (20.000 Vh). Todas as corridas da IEF foram realizadas a 20°C.

Ao término da IEF, imediatamente antes da segunda dimensão, procedeu-se a etapa de equilíbrio das tiras de gel. Nesta etapa as tiras são saturadas em solução tampão desnaturante contendo o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio (SDS). O SDS desnatura as proteínas da amostra e forma complexos SDS-proteína carregados negativamente. Devido à presença de SDS na amostra e no gel, a carga elétrica intrínseca das proteínas não se torna um fator de interferência na corrida eletroforética. Um agente redutor, o ditioneitol (DTT), responsável por romper as ligações dissulfeto dos polipeptídeos, também é adicionado. Quando as proteínas são tratadas com ambos, SDS e DTT, o grau de separação eletroforética no gel de poliacrilamida depende em grande parte do peso molecular da proteína. A etapa de equilíbrio das tiras compreende dois passos. No primeiro passo, é adicionado DTT (100 mg/10 mL) em um volume suficiente de solução tampão de equilíbrio (Tris-HCl (pH 8,8) 50 mM, Glicerol 87% (29,3%), Uréia 6 M, SDS 2%; traços de azul de bromofenol) onde as tiras são imersas e mantidas sob agitação por 20 minutos (volume de 5 mL/tira). No segundo passo, é adicionado iodoacetamida (250 mg/10 mL) – que evita a reoxidação das proteínas – em um volume suficiente de solução tampão de equilíbrio (5 mL/tira), onde as tiras são imersas e mantidas sob agitação por mais 20 minutos.

Posteriormente à etapa de equilíbrio das tiras iniciou-se a segunda dimensão. As tiras foram retiradas da solução de equilíbrio, dispostas sobre a superfície dos géis de poliacrilamida 12,5% (25,5 cm x 20,5 cm x 1,5 mm) e fixadas com solução de agarose 0,5% com traços de azul de bromofenol, utilizando um sistema vertical de cuba eletroforética (Ettan™ DALTsix, GE Healthcare Bio-Sciences®, Uppsala, Sweden). Foi utilizado marcador

de massa molecular LWM (Low Weight Molecular, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) que contém as seguintes proteínas:  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), albumina sérica bovina-BSA (66,0 kDa) e glicogênio fosforilase b (97,0 kDa). As condições da corrida foram: 500 V; 40 mA por gel; 90W. Esta era interrompida quando o azul de bromofenol, presente na solução de agarose, alcançava o fim do gel, aproximadamente com 7 horas e 30 minutos do início da corrida eletroforética. Todas as corridas foram realizadas a 15°C.

Concluída a segunda dimensão as proteínas foram visualizadas utilizando o método de coloração com Coomassie coloidal. Para tanto, os géis foram fixados *overnight* em solução contendo ácido fosfórico 2% e etanol 30%, em água destilada. Em seguida, os mesmos foram submetidos a três lavagens de 20 minutos cada em solução de ácido fosfórico 2%, em água destilada. E, finalmente, os géis foram imersos em solução para protonação composta de ácido fosfórico 2%, sulfato de amônio 15% e etanol 18%, em água destilada, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 2% de solução à base de Coomassie coloidal Brilhante Blue G-250 à solução para protonação e os géis permaneceram em contato com o corante por cerca de 120 horas (MOURA *et al.*, 2010; RÊGO *et al.*, 2010). Após este período, a solução contendo o corante foi desprezada e os géis lavados com água destilada. Durante todo o processo de coloração os géis foram mantidos em recipiente sob agitação suave.

## 2.7 Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando o ImageScanner™ III LabScan™ 6.0 (GE Healthcare Bio-Sciences®, Uppsala, Sweden) na resolução de 300 dpi, utilizando o modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas em formato de arquivo *TIFF* e analisadas utilizando o aplicativo PDQuest™ Advanced versão 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA). O gel mais representativo foi denominado gel de referência. Uma imagem foi criada automaticamente com base nos géis de todos os indivíduos, sendo denominada gel *Master*. Os *spots* consistentemente presentes nos mapas também foram adicionados ao gel sintético (MOURA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010; VAN-TILBURG *et al.*, 2013). O alinhamento correto de cada *spot* expresso nos géis individuais com o seu correspondente no gel *Master* foi determinado utilizando proteínas em regiões-chave dos géis, como referência de localização, após intensas comparações. A quantificação dos *spots* foi dada em partes por

milhão (ppm) da densidade óptica integrada total, de acordo com o aplicativo (MOURA *et al.*, 2006). Os valores experimentais de pH e de massa molecular (Mr) (referente ao marcador proteico utilizado) foram inseridos em *spots* específicos nas imagens, permitindo ao software a estimativa dos respectivos valores para os demais *spots*.

## 2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System<sup>®</sup>, version 9.0, 2002). Os resultados foram submetidos à análise de variância (PROC ANOVA) e ao teste de normalidade (PROC UNIVARIATE NORMAL). Realizou-se a estatística descritiva dos dados obtendo-se médias, desvios-padrão e erros-padrão (PROC MEANS MEAN STDDEV STDERR). As médias das variáveis que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk nem foram normalizadas após transformação matemática dos dados [ $Z = \log(x+1)$ ], foram analisadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY WILCOXON correct=no; EXACT option). As médias das variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo Teste T de Student (PROC TTEST). Foram realizadas correlações de Pearson e de Spearman (PROC CORR PEARSON SPEARMAN option) entre os parâmetros seminais e as intensidades dos *spots*, majoritários e significativos. Os dados também foram submetidos à análise multivariada (PROC FACTOR).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Resultados

A Tabela 1 mostra as médias e desvios-padrão dos parâmetros seminais pré-criopreservação e pós-criopreservação de reprodutores bovinos Pantaneiros. Nos dois momentos, pré-criopreservação e pós-criopreservação, houve diferença significativa entre grupos para os parâmetros de morfologia espermática: defeitos maiores e defeitos totais. Em ambos os parâmetros, o Grupo I (pior congelabilidade) apresentou valores mais elevados que o Grupo II (melhor congelabilidade). Não houve diferença entre grupos quanto aos parâmetros de motilidade, vigor e defeitos menores do sêmen fresco.

No momento pós-criopreservação, o grupo de melhor congelabilidade apresentou médias superiores ( $P < 0,05$ ) às médias do grupo de pior congelabilidade nos seguintes parâmetros: motilidade, vigor, VCL, ALH, espermatozoides rápidos, MIAI e MI. O grupo I obteve maior percentual de espermatozoides estáticos ( $P < 0,05$ ). Não foi observada diferença significativa entre os grupos para os seguintes parâmetros de cinética espermática: VAP, VSL, BCF e LIN.

**Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros seminais pré-criopreservação e pós-criopreservação de reprodutores bovinos Pantaneiros por grupo de congelabilidade**

Parâmetro seminal	Momento	<sup>i</sup> Grupo I (n=10)	<sup>ii</sup> Grupo II (n=8)
Motilidade total (%)	pré-criopreservação	76,0 ± 7,5	79,3 ± 11,2
Vigor (0-5)	pré-criopreservação*	3,3 ± 0,6	3,7 ± 0,5
Defeitos maiores (%)	pré-criopreservação	20,3 ± 6,4 <sup>a</sup>	11,1 ± 5,3 <sup>b</sup>
Defeitos Menores (%)	pré-criopreservação	2,8 ± 1,0	2,9 ± 1,7
Defeitos Totais (%)	pré-criopreservação	22,5 ± 7,3 <sup>a</sup>	13,9 ± 4,7 <sup>b</sup>
Motilidade total (%)	pós-criopreservação	18,9 ± 7,1 <sup>b</sup>	35,63 ± 3,81 <sup>a</sup>
Vigor (0-5)	pós-criopreservação	2,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,78 ± 0,17 <sup>a</sup>
Defeitos Maiores (%)	pós-criopreservação	34,4 ± 9,0 <sup>a</sup>	22,4 ± 5,5 <sup>b</sup>
Defeitos Menores (%)	pós-criopreservação	5,7 ± 3,1	5,8 ± 2,0
Defeitos Totais (%)	pós-criopreservação	40,0 ± 7,8 <sup>a</sup>	28,3 ± 6,0 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	pós-criopreservação	68,3 ± 13,3	81,1 ± 14,1
VSL (µm/s)	pós-criopreservação	60,8 ± 11,6	68,3 ± 11,0
VCL (µm/s)	pós-criopreservação	108,6 ± 26,3 <sup>b</sup>	135,5 ± 26,1 <sup>a</sup>
ALH (µm)	pós-criopreservação	4,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	5,9 ± 0,8 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	pós-criopreservação	32,7 ± 4,7	32,6 ± 3,6
LIN (%)	pós-criopreservação	56,2 ± 8,4	53,2 ± 3,5
Sptz Rápidos (%)	pós-criopreservação	13,0 ± 6,6 <sup>b</sup>	28,6 ± 6,0 <sup>a</sup>
Sptz Estáticos (%)	pós-criopreservação	71,1 ± 11,1 <sup>a</sup>	47,4 ± 7,5 <sup>b</sup>
MIAI (%)	pós-criopreservação	13,7 ± 4,2 <sup>b</sup>	30,1 ± 7,7 <sup>a</sup>
Membrana íntegra (%)	pós-criopreservação*	13,3 ± 2,9 <sup>b</sup>	28,5 ± 6,5 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferem entre grupos (p<0,05) pelo Teste T de Student e Teste Exato de Wilcoxon\*

Sptz= Espermatozoide; MIAI: membrana íntegra acrossoma íntegro ou espermatozoide íntegro

<sup>i</sup> Grupo I: pior congelabilidade; <sup>ii</sup> Grupo II: melhor congelabilidade

O Grupo I apresentou menor (P<0,05) concentração de proteínas totais (29,3 ± 12,6 µg/µl) do que o Grupo II (46,4 ± 13,9 µg/µl). Neste estudo foram detectados 277 *spots* em todos os mapas eletroforéticos bidimensionais do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros (Figura 1). Os resultados da análise de correlação entre a densitometria dos *spots* expressados nos géis e os parâmetros seminais pós-criopreservação de touros Pantaneiros revelaram associações consistentes e significativas com nove *spots*. Destes *spots*, cinco

apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de melhor e pior congelabilidade do sêmen (Figura 2 e Tabela 2).

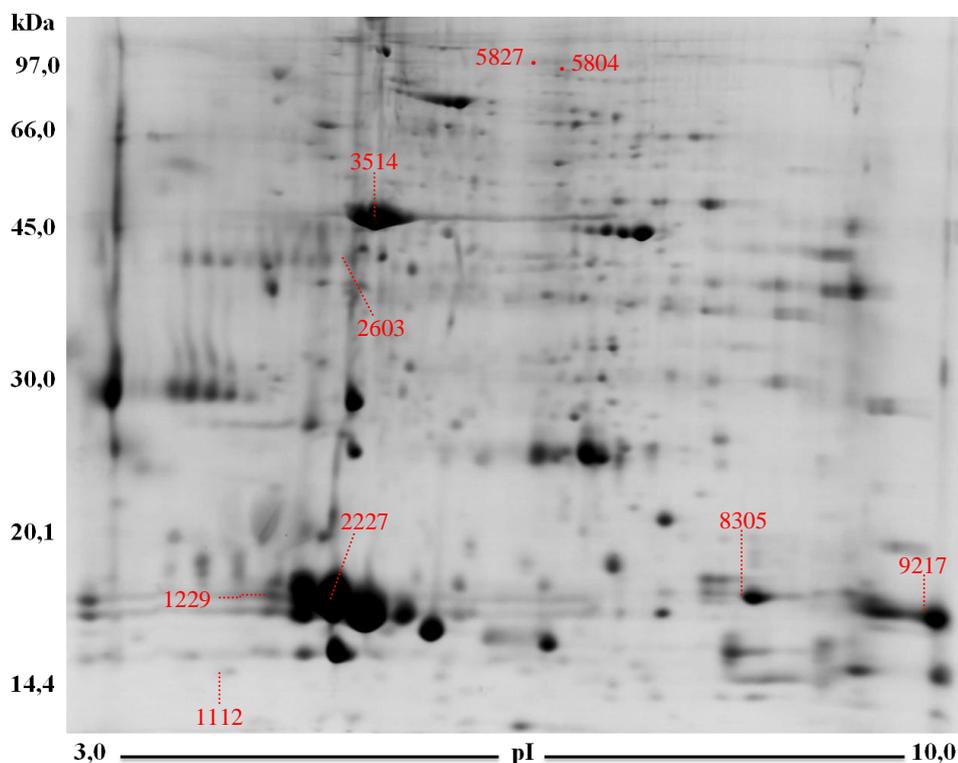


Figura 1: Gel de eletroforese bidimensional SDS-PAGE 12,5% das proteínas do plasma seminal de touros Pantaneiros, corado com Coomassie coloidal blue G-250.

Analisando a frequência dos *spots* que apresentaram diferença significativa quando relacionados à congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros, pode-se verificar que: o *spot* 9217 ( $M_r = 17,2$  kDa e  $pI = 9,9$ ) estava presente em todos os géis; o *spot* 1229 ( $M_r = 17,9$  kDa e  $pI = 4,3$ ) estava presente em 90% dos géis do grupo de pior congelabilidade e em 100% dos géis do grupo de melhor congelabilidade; e os *spots* 2603 ( $M_r = 42,0$  kDa e  $pI = 5,1$ ), 5804 ( $M_r = 84,1$  kDa e  $pI = 6,9$ ) e 5827 ( $M_r = 85,1$  kDa e  $pI = 6,6$ ) estavam presentes em 80% dos géis do grupo de pior congelabilidade e em 100% dos géis do grupo de melhor congelabilidade. Os cinco *spots* apresentaram intensidade superior ( $P < 0,05$ ) no grupo de melhor congelabilidade. Além disso, contrariamente ao observado nos *spots* que não apresentaram diferença entre grupos ( $P > 0,05$ ), nota-se uma expressão mais homogênea e dicotômica desses cinco *spots* entre os géis e entre grupos de congelabilidade.

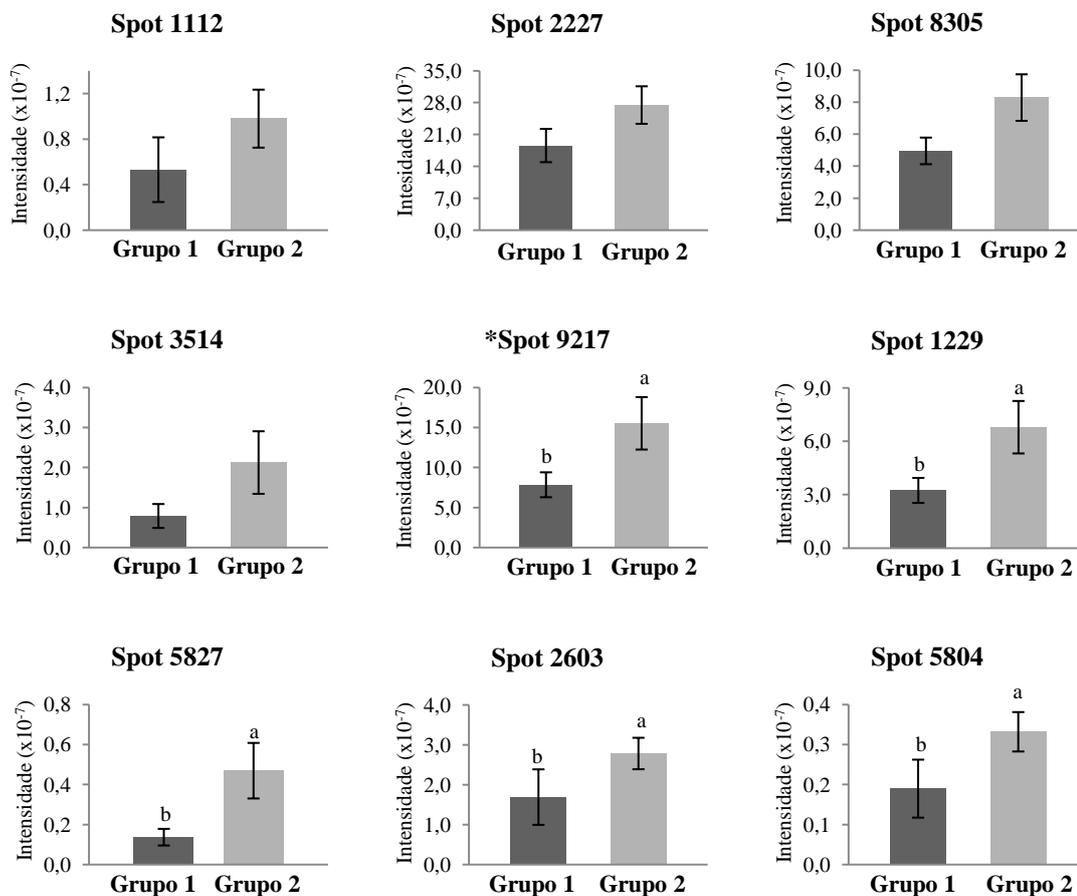


Figura 2: Intensidade (médias e erros-padrão) dos *spots* que apresentaram correlações consistentes e significativas com os parâmetros seminais pós-criopreservação de touros Pantaneiros.

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre grupos pelo teste Exato de Wilcoxon e pelo teste T de Student\*. Grupo I= Pior congelabilidade; Grupo II: Melhor congelabilidade. Os números dos spots são referentes aos mostrados na Figura 1.

Analisando a frequência dos *spots* que não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quando relacionados à congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros, mas que demonstraram correlações consistentes e significativas ( $P < 0,05$ ) com os parâmetros seminais pós-criopreservação (Tabela 2), pode-se verificar que: os *spots* 2227 ( $M_r = 17,7$  kDa e  $pI = 4,9$ ) e 8305 ( $M_r = 17,7$  kDa e  $pI = 8,5$ ) estavam presentes em 100% dos géis nos dois grupos; o *spot* 1112 ( $M_r = 15,3$  kDa e  $pI = 3,9$ ) estava presente em 50% dos géis do grupo de pior congelabilidade e em 75% dos géis do grupo de melhor congelabilidade; e o *spot* 3514 ( $M_r = 49,7$  kDa e  $pI = 5,2$ ) estava presente em 60% dos géis do grupo de pior congelabilidade e em 100% dos géis do grupo de melhor congelabilidade. Foram observadas diferenças marcantes e

individuais nas densidades ópticas desses seis *spots* dentro e entre grupos de congelabilidade, ou seja, houve uma expressão mais heterogênea dos mesmos.

**Tabela 2 – Correlação entre a densitometria dos *spots* expressados nos géis 2D-PAGE e os parâmetros seminais pós-criopreservação de reprodutores bovinos Pantaneiros**

	Spot 1112	Spot 2227	Spot 8305	Spot 3514	Spot 9217	Spot 1229	Spot 2603	Spot 5804	Spot 5827
<b>Mot</b>	<b>**0,50</b>	<b>*0,48</b>	<b>*0,61</b>	<b>**0,60</b>	<b>*0,57</b>	<b>**0,46</b>	<b>**0,65</b>	NS	<b>**0,50</b>
<b>Vigor</b>	<b>**0,55</b>	NS	<b>*0,58</b>	<b>**0,70</b>	<b>*0,51</b>	NS	<b>**0,67</b>	NS	NS
<b>DMai</b>	NS	NS	NS	<b>** -0,50</b>	<b>* -0,47</b>	NS	<b>** -0,47</b>	<b>** -0,49</b>	<b>** -0,55</b>
<b>DMen</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>DTot</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<b>** -0,47</b>
<b>MIAI</b>	NS	<b>*0,56</b>	NS	NS	<b>*0,64</b>	<b>**0,50</b>	<b>**0,63</b>	NS	NS
<b>MI</b>	NS	<b>**0,50</b>	NS	NS	<b>**0,54</b>	NS	<b>**0,48</b>	NS	NS
<b>VAP</b>	NS	<b>*0,49</b>	NS	NS	NS	NS	<b>**0,58</b>	NS	NS
<b>VSL</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<b>**0,60</b>	NS	NS
<b>VCL</b>	<b>**0,50</b>	<b>*0,57</b>	NS	NS	NS	NS	<b>**0,63</b>	NS	NS
<b>ALH</b>	<b>**0,62</b>	<b>*0,59</b>	NS	NS	NS	<b>**0,54</b>	<b>**0,70</b>	NS	<b>**0,50</b>
<b>BCF</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>LIN</b>	<b>** -0,53</b>	<b>* -0,53</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Rap</b>	<b>**0,53</b>	<b>*0,62</b>	<b>*0,52</b>	<b>**0,57</b>	<b>*0,56</b>	<b>**0,48</b>	<b>**0,69</b>	NS	<b>**0,53</b>
<b>Stat</b>	NS	<b>* -0,48</b>	<b>* -0,58</b>	<b>** -0,59</b>	<b>* -0,52</b>	NS	<b>** -0,65</b>	NS	NS

\*Coeficientes de correlação de Pearson, \*\*Coeficientes de correlação de Spearman (P<0,05)

Nota: Mot= motilidade total, DMai= defeitos maiores, DMen= defeitos menores, DTot= defeitos totais, MIAI= espermatozoides íntegros, MI= membrana íntegra, Rap= espermatozoides rápidos, Stat= espermatozoides estáticos. NS: Não significativo. Os números dos spots são referentes aos mostrados na Figura 1.

Na Figura 3 observa-se a representação gráfica das variáveis mensuradas no sêmen criopreservado em relação aos principais *spots* deste estudo. Analisando o comportamento das variáveis em um plano bidimensional tem-se que os dois fatores (fator 1 e fator 2) contribuíram com 57,66% para a explicação da variabilidade total dos dados. No fator 1, observa-se uma correlação negativa entre dois dos parâmetros de cinética espermática (BCF e linearidade) e o *spot* 1229. No fator 2 observa-se uma correlação positiva entre os parâmetros com marcador em cinza escuro, a saber: vigor, variáveis de cinética espermática (motilidade,

espermatozoides rápidos, ALH, VCL, VAP e VSL), membrana íntegra, espermatozoides íntegros com os *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 e 2227.

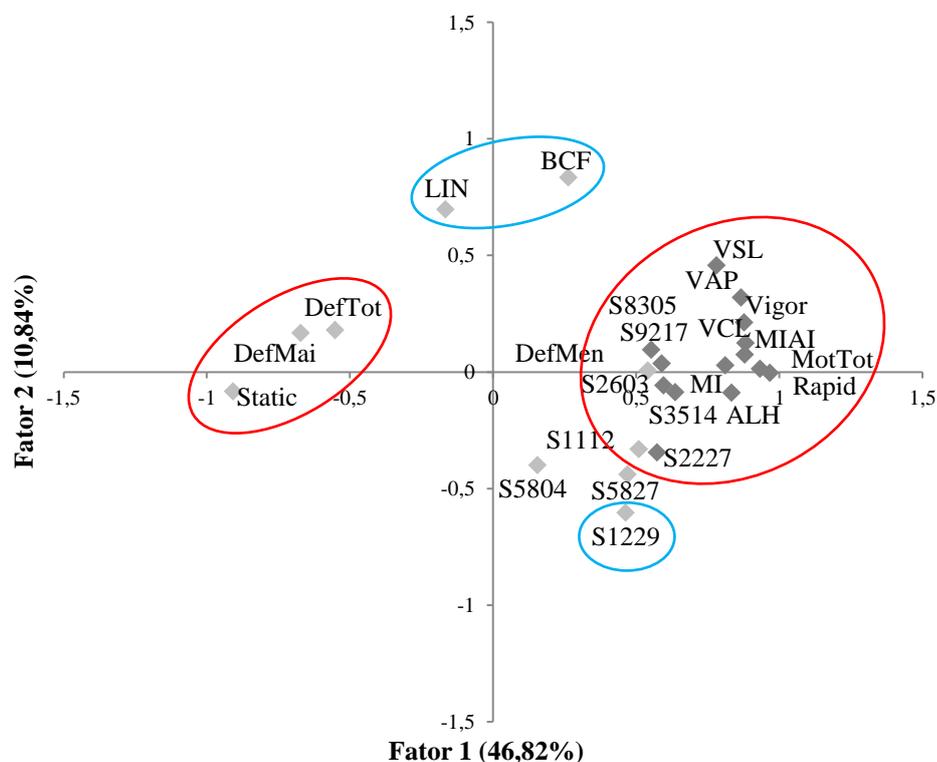


Figura 3 - Análise multivariada fatorial entre os *spots* expressos nos mapas bidimensionais do plasma seminal e os parâmetros pós-criopreservação de touros Pantaneiros.

### 3.2 Discussão

Os parâmetros seminais de viabilidade, motilidade e morfologia espermática de touros Pantaneiros foram significativamente afetados pela criopreservação. Porém, observou-se que o efeito da criopreservação foi diferente entre os animais, o que possibilitou o agrupamento dos reprodutores nos grupos de melhor e de pior congelabilidade. A congelabilidade do sêmen tem sido relacionada a variações individuais entre animais ou entre ejaculados no mesmo animal, principalmente quanto a diferenças na composição proteica do plasma seminal (WATSON, 1995; JOBIM *et al.*, 2004; RONCOLETTA *et al.*, 2013).

Os valores médios de proteínas totais do plasma seminal mensurados neste experimento foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) no grupo de melhor congelabilidade. Esses resultados estão em acordo com o encontrado por Roncoletta (1999). No entanto, Jobim e colaboradores (2003), trabalhando com amostras de plasma seminal de reprodutores *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, não encontraram diferença significativa ( $P = 0,6878$ ) entre os grupos de menor e maior congelabilidade. Moustafa e Mészáros (1980) observaram que quanto maior a concentração de proteínas totais, menor a motilidade espermática pós-descongelamento. Barreto e colaboradores (2008) testaram o efeito da adição de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa sobre a congelabilidade do sêmen e concluíram que houve prejuízo aos parâmetros espermáticos pós-criopreservação. Todavia, a literatura ainda é contraditória quanto aos efeitos estimulantes ou inibitórios do plasma seminal, principalmente no tocante à fração proteica, sobre a função espermática em bovinos (LEAHY & GRAAF, 2012).

A intensidade de cinco *spots* foi significativamente superior ( $P < 0,05$ ) nas amostras do grupo de melhor congelabilidade em relação ao grupo de pior congelabilidade. Não foi observada variabilidade nas intensidades desses *spots* indicando uniformidade na expressão dos mesmos. Com base nos valores experimentais de massa molecular e ponto isoelétrico esses *spots* podem corresponder a proteínas do plasma seminal bovino descritas na literatura, conforme discutido adiante.

O *spot* 9217 ( $M_r = 17,2$  kDa e  $pI = 9,9$ ) pode pertencer à família da ribonuclease seminal bovina (BS-RNase). Esta enzima é classificada como uma das principais proteínas básicas do plasma seminal bovino, sendo esta espécie a única a produzi-la (SCHEIT, 1986; CALVETE *et al.*, 1996). Assumpção e colaboradores (2005) identificaram um precursor da ribonuclease seminal com  $M_r = 17,2$  e  $pI = 8,6$  em touros Nelore. A ribonuclease é expressa em diversos tecidos e suas funções como agente antitumoral já são bem estabelecidas, mas no plasma seminal seu papel ainda é obscuro (CALVETE *et al.*, 1996; ASSUMPCÃO *et al.*, 2005). O referido *spot* apresentou correlação positiva com os seguintes parâmetros do sêmen descongelado: motilidade, vigor, MIAI, membrana íntegra e espermatozoides rápidos; e correlação negativa com: defeitos maiores e espermatozoides estáticos. Segundo Roncoletta (1999) e Roncoletta e colaboradores (2002), citados por Romitto (2003) a proteína de 14,4 kDa identificada em eletroforese unidimensional como a ribonuclease, poderia interferir no metabolismo espermático, principalmente no tocante à criopreservação dos espermatozoides. Tem sido demonstrado que a BS-RNase pode desestabilizar a bicamada lipídica carregada

negativamente (VESCIA & TRAMONTANO, 1981; LACCETTI *et al.*, 1994; MANCHEÑO *et al.*, 1994), o que pode explicar sua influência na congelabilidade do sêmen bovino. Já em outro estudo de Roncoletta (2003) utilizando eletroforese bidimensional a ribonuclease não foi um diferencial para a congelabilidade do sêmen. Especula-se que a correlação positiva com os parâmetros seminais que refletem a boa congelabilidade do sêmen possa ser associada ao efeito citotóxico seletivo dessa proteína, atuando em células espermáticas anormais mediante mecanismo ainda não elucidado. Mas vale ressaltar que, assim como outras características atribuídas a esta enzima, tais como antigenicidade espermática e atividade imunossupressora, a citotoxicidade ainda está sendo estudadas em testes laboratoriais e seus mecanismos fisiológicos ainda são desconhecidos (ALESSIO, 1999; RUSSO *et al.*, 2002).

De acordo com os valores de massa molecular, de ponto isoelétrico e também a localização nos mapas bidimensionais semelhantes às características das proteínas BSP's, o *spot* 1229 ( $M_r = 17,9$  kDa e  $pI = 4,3$ ) pode se tratar de uma isoforma dessa família, provavelmente a BSP1 ou BSP3 (antigas BSP-A1/A2 e BSP-A3, respectivamente). Em um estudo para investigar a congelabilidade do sêmen bovino utilizando a proteômica, Roncoletta e colaboradores (2013) encontraram dois *spots* estatisticamente diferentes nos grupos de alta e de baixa congelabilidade do sêmen de taurinos e zebuínos. Assim como neste estudo, ambos os *spots* apresentaram densidade óptica superior ( $P < 0,01$ ) no grupo de alta congelabilidade. Os valores de peso molecular e ponto isoelétrico desses dois *spots* (SP220:  $M_r = 18,2$  kDa e  $pI = 5,3$  e SP213:  $M_r = 17,9$  e  $pI = 4,8$ ), principalmente os do *spot* SP213, são similares ao encontrado para o *spot* 1229. Dos peptídeos relatados por Assumpção e colaboradores (2005) no plasma seminal de touros Nelore, três apresentaram-se mais próximos das características do *spot* 1229, conforme supracitado. Estes autores identificaram os seguintes precursores: BSP-A3 ( $M_r = 17,3$  kDa e  $pI = 5,3$ ) e PDC-109 ( $M_r = 17,9$  e  $pI = 5,5$  e  $M_r = 17,7$  e  $pI = 5,6$ ). Trein (2011) identificou duas proteínas do plasma seminal equino, a saber: HSP-1 com 13,9 kDa e  $pI$  3,8 e HSP-2 com 18 kDa e  $pI$  5,0 – 5,2. A primeira apresentou intensidade superior nas amostras de garanhões do grupo de baixa congelabilidade, já a segunda apresentou intensidade superior nas amostras de reprodutores de alta congelabilidade. Essas proteínas são homólogas às BSP's encontradas em bovinos e também possuem domínios de fibronectina tipo II. O *spot* 1229, deste estudo, tem peso molecular e  $pI$  aproximados aos da proteína expressa no grupo de garanhões de alta congelabilidade no estudo realizado por Trein (2011). Jobim e colaboradores (2003) também observaram uma banda proteica com  $M_r = 15 - 17$  kDa e  $pI$  4,5 – 5,5 com densidade óptica superior em reprodutores bovinos de alta congelabilidade, que posteriormente foi

imunoidentificada como BSP-A1/A2 (atual BSP1) (MATTOS *et al.*, 2004). Diferentemente do observado no presente estudo, Jobim e colaboradores (2003) não verificaram a ocorrência de variações individuais no padrão de expressão dessas proteínas. Jobim e colaboradores (2004) detectaram um *spot* de 13–14 kDa e pI 4,0 – 4,5 que também foi associado às BSP's e estava presente com maior intensidade nas amostras de touros de alta congelabilidade do sêmen. Sugere-se que uma maior quantidade dessas proteínas no plasma seminal poderia conferir maior proteção à membrana espermática durante o processo de criopreservação (JOBIM *et al.*, 2004). Segundo Bergeron e Manjunath (2006) o maior mecanismo de crioproteção espermática atribuída à LDL da gema de ovo e/ou a caseína do leite (componentes mais utilizados nos meios de criopreservação do sêmen) é a interação com as BSP's. Essa interação parece ser crítica para a preservação da integridade da membrana espermática durante o processamento e armazenamento do sêmen. O sequestro de BSP's pelas moléculas de LDL e/ou caseína parece minimizar ou até mesmo abolir o efeito de desestabilização da membrana causada por essas proteínas pela remoção de colesterol e fosfolípidos da bicamada lipídica. Então, esta interação pode prevenir a capacitação espermática prematura, mantendo também a motilidade e viabilidade do espermatozoide durante o armazenamento. Talvez essa seja a justificativa para a correlação positiva da intensidade do *spot* 1229 com motilidade, MIAI e espermatozoides rápidos. Segundo Januskauskas e colaboradores (2000) o ALH não é considerado um parâmetro muito informativo quanto à funcionalidade do espermatozoide. Em geral, o deslocamento lateral de cabeça do espermatozoide não é desejado, pois pode interferir no movimento progressivo da célula. Contudo, ainda não existem valores de limites máximos e mínimos estabelecidos para que se possa dizer o quanto o ALH pode influenciar na motilidade ou mesmo na capacidade de penetração do espermatozoide no oócito (CELEGHINI, 2005). Porém, Chacur e colaboradores (2012) encontraram maior média de ALH ( $P < 0,05$ ) em touros zebuínos alocados no grupo de congelabilidade muito boa do que nos touros de congelabilidade regular, quando utilizaram o diluente Tris. Neste estudo, o grupo de melhor congelabilidade também apresentou média de ALH superior ( $P < 0,05$ ). Além disso, esse grupo apresentou maior expressão do *spot* 1229 ( $P < 0,05$ ) e este, por sua vez, foi correlacionado positivamente com o ALH.

O *spot* 2603 ( $M_r = 42,0$  kDa e  $pI = 5,1$ ) apresentou correlação positiva com os seguintes parâmetros: motilidade, vigor, MIAI, membrana íntegra, VAP, VSL, VCL, ALH e espermatozoides rápidos. E apresentou correlação negativa com: defeitos maiores e espermatozoides estáticos. Souza e colaboradores (2009) relataram uma proteína de 45 kDa e

pI 5,5 no plasma seminal caprino e sugeriram que a mesma teria função de proteger o espermatozoide contra danos causados ao acrossoma. Moura e colaboradores (2010) observaram resultados semelhantes aos deste estudo em ovinos da raça Santa Inês. Estes autores encontraram dois *spots*: um de 43,4 kDa e pI 5,30 e outro de 44,4 kDa e pI 5,33; que apresentaram correlação positiva com a quantidade de espermatozoides íntegros e com membrana íntegra. Com base nos resultados obtidos neste experimento e na extrapolação de resultados encontrados em outras espécies pode-se dizer que a presença do *spot* 2603 parece estar relacionada com a manutenção da viabilidade e cinética espermática durante a criopreservação, assim como com a diminuição de defeitos de morfologia e de espermatozoides estáticos. Sendo assim, sugere-se que sua presença pode resultar em melhor congelabilidade do sêmen.

Dois *spots* tiveram pesos moleculares e pontos isoelétricos semelhantes. O *spot* 5804 ( $M_r = 84,1$  kDa e  $pI = 6,9$ ) apresentou correlação negativa apenas com defeitos maiores. E o *spot* 5827 ( $M_r = 85,1$  kDa e  $pI = 6,6$ ) apresentou correlação positiva com motilidade, espermatozoides rápidos e ALH; e correlação negativa com defeitos totais e defeitos maiores. Estes *spots* estão dispostos em cadeia nos géis e segundo a literatura pesquisada podem corresponder a mais de uma proteína com pesos moleculares e pI aproximados. Souza e colaboradores (2012) identificaram uma proteína de 76,1 kDa e pI 6,5 em carneiros Santa Inês como  $\beta$ -galactosidase. O fluido da cauda do epidídimo, que possui pH variando de 6,6 – 6,8, é rico em  $\beta$ -galactosidases e uma série de glicosidases (DACHEUX, 2005 citado por MOURA *et al.*, 2011). No epidídimo de ratos observaram-se duas isoformas dessa proteína: uma com cerca de 80 kDa, encontrada no interior do acrossomo (SKUDLAREK *et al.*, 1993 citado por RÊGO, 2010) e outra com 84 kDa encontrada no fluido da cauda do epidídimo. A primeira isoforma parece estar envolvida na clivagem de carboidratos da zona pelúcida, após a reação acrossômica; e a segunda parece estar envolvida, como outras glicosidases, na clivagem de glicoproteínas da membrana espermática, que é parte do processo de maturação (SRIVASTAVA & OLSON, 1991; TULSIANI *et al.*, 1993 citados por RÊGO, 2010). Kiso e colaboradores (2013), trabalhando com elefantes asiáticos, identificaram uma cadeia de peptídeos, em uma faixa de pI 5 – 10 e a aproximadamente 80 kDa, como a lactoferrina nas amostras de plasma seminal em mais de 85% dos ejaculados com boa motilidade, em contrapartida, esta proteína não foi detectada em mais de 90% dos ejaculados com baixa motilidade. À semelhança do resultado encontrado por Kiso e colaboradores (2013), os *spots* 5804 e 5827 detectados neste experimento apresentaram densidade óptica superior ( $P < 0,05$ ) no

grupo de melhor congelabilidade do sêmen, além de demonstrarem correlação positiva com parâmetros de boa qualidade seminal. A lactoferrina é uma glicoproteína de cerca de 80 kDa da família das transferrinas, capaz de se ligar e transferir íons  $\text{Fe}^{3+}$  e desempenhar várias funções biológicas, incluindo a proteção contra o estresse oxidativo, que é uma fonte potencial de danos aos espermatozoides. Chacur e colaboradores (2006) observaram a existência de uma banda de 80 kDa, provavelmente a lactoferrina, presente em 16,6% dos touros aptos e em 83,3% dos parcialmente aptos à reprodução. Esta proteína também foi identificada no plasma seminal de carneiros com 76,6 kDa e pI 6,9 (SOUZA *et al.*, 2012) e mostrou efeitos benéficos sobre a motilidade espermática, percentual de espermatozoides móveis e frequência de batimento flagelar *in vitro* em carneiros e equinos (BEZERRA JÚNIOR *et al.*, 2013).

Este estudo verificou a ocorrência de *spots* que apesar de não apresentarem diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos de congelabilidade de touros Pantaneiros, foram correlacionados de forma consistente e significativa com os parâmetros espermáticos pós-criopreservação e tiveram maior presença no grupo de melhor congelabilidade. Tais *spots* são discutidos abaixo.

O *spot* 3514 ( $M_r = 49,8$  kDa e  $pI = 5,2$ ) correlacionou-se positivamente com motilidade, vigor e espermatozoides rápidos; e negativamente com defeitos maiores e espermatozoides estáticos. Romitto (2003) observou dois *spots* potencialmente relacionados à alta fertilidade em touros Nelore: um com 49,4 kDa e pI 5,9 e outro com 49,2 kDa e pI 5,9. Wolfe e colaboradores (1993) constataram o desaparecimento de uma banda de 49 kDa após a insolação escrotal de bovinos de corte, sugerindo o papel desta proteína como marcadora de bom desempenho reprodutivo. Assim, o *spot* 3514 pode corresponder a uma proteína associada positivamente com fertilidade do macho e com a congelabilidade.

O *spot* 8305 ( $M_r = 17,7$  kDa e  $pI = 8,5$ ) correlacionou-se positivamente com motilidade, vigor e espermatozoides rápidos; e negativamente com espermatozoides estáticos. Este *spot* pode pertencer à família da ribonuclease seminal bovina (BS-RNase), assim como o *spot* 9217, que apresentou diferença significativa de intensidade entre os grupos, como mencionado anteriormente.

O *spot* 2227 ( $M_r = 17,7$  kDa e  $pI = 4,9$ ) correlacionou-se positivamente com motilidade, MIAI, membrana íntegra, VAP, VCL, ALH e espermatozoides rápidos; e negativamente com linearidade e espermatozoides estáticos. E o *spot* 1112 ( $M_r = 15,3$  kDa e  $pI = 3,9$ ), de forma similar ao *spot* 2227, correlacionou-se positivamente com motilidade, vigor, VCL, ALH e espermatozoides rápidos, ao passo que correlacionou-se negativamente com

linearidade. Ambos os *spots* podem pertencer à família das BSP's, assim como o *spot* 1229 discutido acima.

Os *spots* 2603 e 2227 apresentaram correlação com um maior número de parâmetros do sêmen pós-criopreservação em relação aos outros *spots*.

A análise multivariada, que explica 57,66% da variabilidade total dos dados deste experimento, mostra o *spot* 1229 associado negativamente ao BCF e linearidade, ambos parâmetros relacionados à cinética espermática. Além disso, os *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 e 2227 aparecem associados positivamente aos principais parâmetros que refletem a qualidade do sêmen criopreservado. Estes *spots*, conforme já discutido, podem corresponder à proteínas associadas à proteção espermática contra danos ao acrossoma e à membrana plasmática e que estão presentes em animais de alta congelabilidade e de bom desempenho reprodutivo. Os parâmetros seminais e *spots* citados para o fator 2 apresentaram correlação negativa com defeitos maiores, defeitos totais e espermatozoides estáticos. Dentre os *spots* que foram correlacionados positivamente com as variáveis de cinética e integridade espermática os *spots* 9217 e 2603 apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de congelabilidade. Estes *spots* podem corresponder à proteína BS-RNase e à uma proteína ainda não identificada cuja presença foi relacionada a animais com melhor congelabilidade do sêmen. Apesar dos outros três *spots* não terem apresentado diferença significativa entre grupos de congelabilidade, a presença dos mesmos foi superior no grupo de melhor congelabilidade e, além disso, foram correlacionados positivamente com parâmetros que demonstram boa congelabilidade do sêmen. Analisando-se estes três *spots* o *spot* 3514 parece ser o mais relevante devido às médias  $\pm$  erros-padrão de densidade óptica entre grupos terem sido mais discrepantes (2,6 vezes mais intenso no grupo de melhor congelabilidade e também obteve maior carga fatorial na análise multivariada) em relação aos outros dois *spots*.

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que existem diferenças no perfil proteico do plasma seminal de reprodutores Pantaneiros de melhor e de pior congelabilidade do sêmen. Outro ponto importante neste trabalho foi a observação de variação individual no perfil proteico do plasma seminal até mesmo entre os animais alocados em um mesmo grupo de congelabilidade do sêmen. Talvez isto possa ser atribuído ao fato de que pouca ou nenhuma seleção para o melhoramento genético foi efetuada na raça ao longo dos séculos resultando assim em um perfil mais heterogêneo, já que perfis mais homogêneos foram relatados em raças que já sofreram um afinamento genético. Este é um primeiro passo para

provar que a proteômica pode ser uma ferramenta útil na predição da congelabilidade do sêmen desses animais.

#### 4 CONCLUSÕES

Sugere-se que a presença dos *spots* 8305, 9217, 2603, 3514 e 2227 está associada à melhor congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros. No entanto, é importante confirmar a identidade das proteínas sugeridas neste trabalho por meio de técnicas de sequenciamento ou pelo uso de antígenos específicos. Além disso, novos estudos com outros reprodutores Pantaneiros são necessários para tornar essas sugestões definitivas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, G. Evolution of oligomeric proteins: the unusual case of a dimeric ribonuclease. **Eur. J. Biochem.** 266, 699-708 (1999).

ASSUMPÇÃO, T. I.; FONTES, W., SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O. Proteome analysis of Nelore Bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. **Protein & Peptide Letters**, 12, 813-817, 2005.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; *et al.* Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.12, p.2115-2119, 2008.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular; Reproduction and Development**. Oct; 73 (10):1338-44, 2006.

BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; MARTINS, G. R.; BARROSO, I. C.; *et al.* Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.100-112, 2013.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaarmed.**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Anal Biochem.** 72, 248-254, 1976.

CALVETE, J.; VARELA, P.; SANZ, L.; *et al.* Procedure for large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. **Protein Expr Purif.** 8:48-56. 1996.

CARDOZO, J.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; *et al.* Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v. 66; p. 841-850. 2006.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; *et al.* Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, 2009; 72 (7): 930-948.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S.; PAPA, F. O.; *et al.* Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Vet. e Zootec.**, 19(1): 346-355, 2012.

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 (*Bos taurus indicus*). **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 87-93, jan.-jun. 2006.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2002. 149p. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2002.

DACHEUX, J. L.; CASTELLA, S.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v.63, p.319-341, 2005.

EGITO, A. A.; **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação.** 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituição de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**. v. 51, p. 39-52. 2002.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HIRON, M.; HARSHAN, L. P.; SINGH, A.; *et al.* Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.93, p.124-133, 2006.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; *et al.* Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v.52, p.641-658, 2000.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Rev Bras Reprod Anim Supl.**, Belo Horizonte, n.6, p.25-31, dez. 2009.

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; *et al.* Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 21-30, 2003.

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61; p. 255–266. 2004.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol Reprod**. 1993; 49:1202–7.

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

LACCETTI, P.; SPALLETTI-CERNIA, D.; PORTELLA, G.; *et al.* Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of lewis lung carcinoma. **Cancer Res**.54:4253-4256. 1994.

LEAHY, T.; GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, 47 (4):207–213 (2012).

MANCHEÑO, J. M.; GASSET, M.; OÑADERRA, M.; *et al.* Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 199, n. 1, p.119-124, 1994.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; *et al.* Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brasil. **Livestock Science**, v. 120, p. 204-202, 2009.

MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, abr./jun. 2011.

MATTOS, R. C; JOBIM, M. I. M; OBERST, E. R.; *et al.* BSP A1/A2: a seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. **Abstracts**. v.2, p.462, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, v. 48, v. 2, p. 209-219, 1997.

MENDES. E. D. M.; COMASTRI FILHO, J. A.; CRISPIM, S. M. A. Núcleos de conservação Fazenda Nhumirim. Folder técnico. Corumbá, **EMBRAPA Pantanal**, Novembro, 2012. 13p.

MOREIRA, N. H.; NASCIMENTO, N. V.; BARBOSA, E. A.; *et al.* Congelabilidade do sêmen de touros Pantaneiros em diferentes épocas do ano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19, 2011, Recife. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2011. p. 137.

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; *et al.* Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; *et al.* A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci.** 98, 169-88, 2007.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, Vol. 27, No. 4, July/August 2006a.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; *et al.* Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J. Androl.** 27, 201-211, 2006b.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E. A.; CHAPMAN, D. A.; *et al.* Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v.73, p.2006-2020, 2010.

MOURA, P. P.; FRANCO, M. M.; SILVA, T. A. S. N.; *et al.* Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.5, p.1154-1159, mai, 2010.

MOUSTAFA, A. R.; MÉZÁROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing-and-thawing. **Acta Veterinariae Academiae Scientiarum Hungaricae.** 28:403-408. 1980.

MUER, S. K.; ROY, S. B.; MOHAN, G.; DHOBLE, R. L. Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. **Theriogenology**, v. 30, n. 5, p. 1005-1011, 1988.

NASCIMENTO, N. V.; MARIANTE, A. S.; SILVA, A. V. R. *et al.*, Monitoramento do sêmen de bovino da raça Junqueira estocado no banco brasileiro de germoplasma animal. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica - FUNCREDI, 2008. p.528.

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

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

RAMOS, A. F.; FINO, T. C. M.; NASCIMENTO, N. V.; MARIANTE, A. S. Efeito da alta e baixa concentração de gema de ovo no congelamento de sêmen caprino sem remoção do plasma seminal. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2008, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica - FUNCREDI, 2008. p.526.

RAMOS, A. F.; NASCIMENTO, N. V.; SILVA, A. V. R.; *et al.* Qualidade do sêmen bovino estocado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. In: Simposio Iberoamericano Sobre

Conservación e Utilización de Recursos Zoogenéticos, 10, 2009, Palmira, Colombia. **Memórias...** Palmira, Colômbia: Universidad Nacional de Colombia, 2009. p.499-502.

RÊGO, J. P. A.; SOUSA, F.; SOUZA, C. E. A.; *et al.* Reproductive Criteria of Tropically-Adapted Morada Nova Rams from Brazil. **43<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**. Portland, 30 July–3 August, 2010. USA.

ROMITTO, G. C. **Perfil bidimensional das proteínas de plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. 2003. 192f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H.; *et al.* Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** vol.36, n.2, São Paulo, 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; FRANCESCHINI, P. H.; 14 kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull semen freezability. **Theriogenology**. V. 57, n.1, p.479, 2002.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; FRANCESCHINI, P. H.; RAMOS, P. R. R. Caracterização da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. **Arq Fac Vet. UFRGS**, 2000; 28:323.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H. R.; FRANCHESCHINI, P. H. Proteomics to investigate bull's semen freezability. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2013.

RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros**. 2003. 104f. Tese (doutorado em medicina veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2003.

RUSSO, A.; ANTIGNANI, A.; GIANCOLA, C.; ALESSIO, G. Engineering the refolding pathway and the quaternary structure of seminal ribonuclease by newly introduced disulfide bridges. **The journal of biological chemistry**. V.277, 50, (13), 48643–48649, December, 2002.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 77-111, 2000.

SCHEIT, K. H. The major basic protein of bull seminal vesicle secretion. **Biol Chem Hoppe Seyler** 1986; 3:229–33.

SKUDLAREK, M. D.; TULSIANI, D. R.; NAGDAS, S.K.; ORGEBIN-CRIST, M. C.  $\beta$ -D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 49, p. 204-213, 1993.

SORIANO, B. M. A.; ALVES, M.J.M. **Boletim agrometeorológico ano 2002 para a sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato grosso do Sul, Brasil**. Série documentos, EMBRAPA-CPAP, 76: 1-28, 2005.

SOUZA, A. F.; LEITÃO, M. C. G.; BATISTA, A. M., *et al.* Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1166-1172, 2009.

SOUZA, C. E. A.; ARAUJO, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; *et al.* Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, 45, 644-653, 2010a.

SOUZA, C. E. A., RÊGO, J. P. A.; LOBO, C. H.; *et al.* Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams, **J. Prot.** p.21 (2012), doi:10.1016/j.jprot.2012.05.039. 2012.

SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; *et al.* Identification of the major proteins of ram seminal plasma using a proteomic approach. In: 35th Annual Meeting of the American Society of Andrology, 2010, Houston, Texas. **Journal of Andrology**. Shumburg, IL, USA: American Society of Andrology, p. 63-64. 2010b.

SRIVASTAVA, A.; OLSON, G. E. Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, v. 29, p. 357-364, 1991.

TREIN, C. R. **Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida do plasma seminal equino e sua relação com a congelabilidade do sêmen**. 2011. 118f. Tese de doutorado. Faculdade de veterinária, Programa de pós-graduação em medicina animal: equinos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TULSIANI, D. R. P. *et al.* Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididimal maturation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 48, p.41-428, 1993.

VESCIA, S.; TRAMONTANO, D. Antitumoral action of bovine seminal ribonuclease. **Mol. Cell Biochem**. V. 36, p1125-128, 1981.

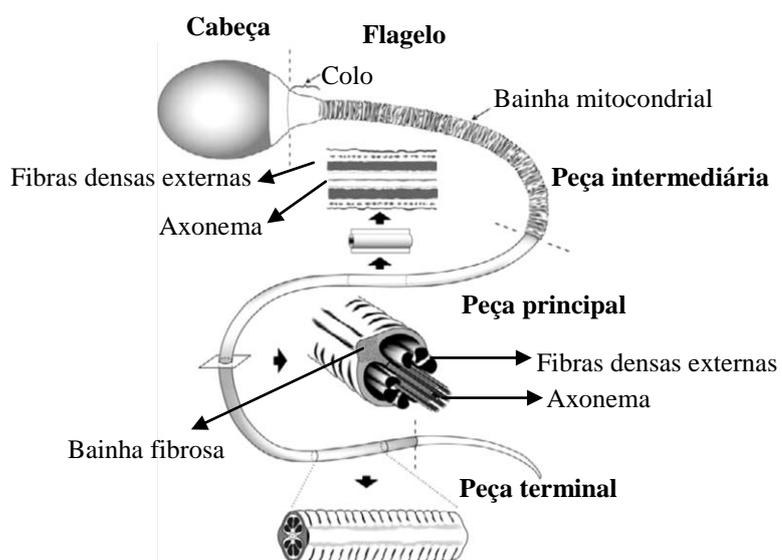
WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction; Fertility and Development**. v. 7; p. 871-891. 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v.60/61, p.481-492, 2000.

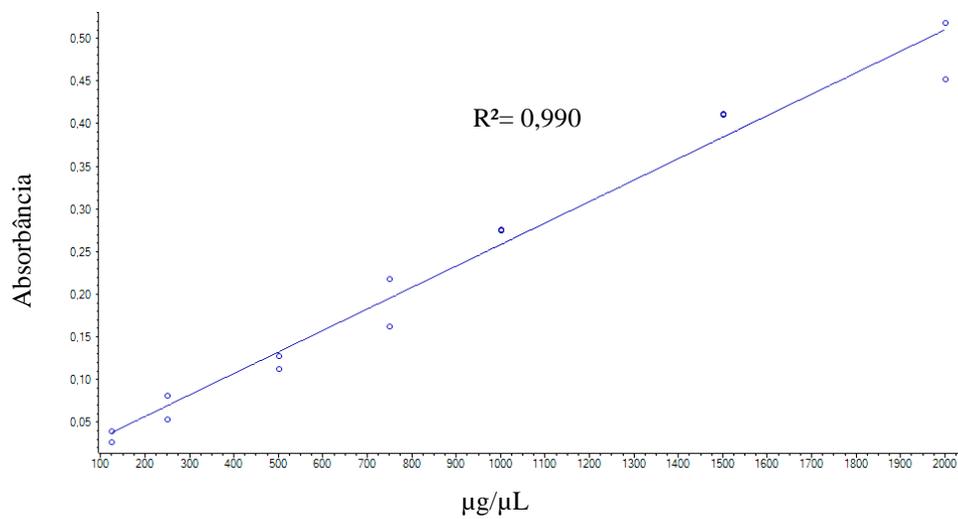
WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDELL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration, **Theriogenology**, V.40, (5), 1083-1091. November, 1993.

## ANEXOS

### Anexo A. Principais estruturas do espermatozoide de mamíferos (NEILL, 2006)



**Anexo B. Curva padrão da absorbância versus concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) gerada para a quantificação de proteína total nas amostras de plasma seminal.**



### Anexo C. *Setup* - Hamilton Thorne Biosciences (IVOS-Ultimate 12)

<b>Característica</b>	<b>Ajuste</b>
➤ Captura de imagens	
Número de imagens adquiridas por campo .....	30
Taxa de aquisição das imagens .....	60 Hz
➤ Detecção da célula	
Contraste mínimo da célula .....	80
Tamanho mínimo da célula .....	5 pix
➤ Células progressivas	
Velocidade de trajeto (VAP) .....	50,0 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR) .....	70 %
➤ Valor de corte VSL para células lentas.....	10 $\mu\text{m/s}$
➤ Padrão	
Tamanho da célula .....	5 pix
Intensidade da célula .....	70
➤ <i>Setup</i> óptico	
Intensidade .....	2000 – 220
Fotômetro .....	50-55
➤ Tipo de câmara .....	Makler®
➤ Temperatura .....	37°
➤ Seleção de campos .....	Manual

## Anexo D. Solução para avaliação da integridade acrossomal

### D.1 Solução estoque de FITC-PNA – Solução I

- FITC-PNA.....1 mg
- Tampão fosfato salina (PBS).....1 mL

**Obs:** alíquotas em volumes de 10 µL, conservadas a -20°C, protegidas da luz

### D.2 Solução estoque de IP (0,75 mM) – Solução II

- Iodeto de propídeo.....10 mg
- Solução salina 0,9%.....20 mL

**Obs:** alíquotas em volumes de 10 µL, conservadas a -20°C, protegidas da luz

### D.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 37-40%.....100 µL
- Solução salina 0,9%.....7,9 mL

### D.4 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio .....3 g
- Solução salina 0,9%.....100 mL

### D.5 Solução de trabalho

- Solução I.....20 µL
- Solução II.....10 µL
- Solução III.....10 µL
- Solução IV.....960 µL

**Obs:** preparo diário, armazenamento a 4°C, protegido da luz

## Anexo E. Solução para avaliação da integridade de membrana plasmática

### E.1 Solução estoque de C-FDA – Solução I

- C-FDA .....9,2 mg
- DMSO .....20 mL

**Obs:** alíquotas em volumes de 10 µL, conservadas a -20°C, protegidas da luz

### E.2 Solução estoque de IP (0,75 mM) – Solução II

- IP.....10 mg
- Solução salina 0,9%.....20 mL

**Obs:** alíquotas em volumes de 10 µL, conservadas a -20°C, protegidas da luz

### E.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 37-40%.....100 µL
- Solução salina 0,9%.....7,9 mL

### E.4 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio .....3 g
- Solução salina 0,9%.....100 mL

### E.5 Solução de trabalho de C-FDA

- Solução I.....20 µL
- Solução II.....10 µL
- Solução III.....10 µL
- Solução IV.....960 µL

**Obs:** preparo diário, armazenamento a 4°C, protegido da luz