

Quantificação de proteínas do sêmen de touros Guzerá e suas associações com características andrológicas

Dias, J.C.¹; Martins, J.A.M.²; Emerick, L.L.³; Andrade, V.J.⁴ e Vale Filho, V.R.⁴

¹Universidade Federal da Fronteira Sul – campus Laranjeiras do Sul, Brasil. Laranjeiras do Sul, Paraná, Brasil.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

³Universidade Federal Rural da Amazônia. Parauapebas, Pará, Brasil.

⁴Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Cromatografia.
Espermatozoide.
Fertilidade.
Plasma seminal.

ADDITIONAL KEYWORDS

Chromatographic.
Fertility.
Seminal plasma.
Spermatozoa.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 21.12.2017
Aceptado/Accepted: 21.09.2018
On-line: 07.04.2019
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
julianocdias@yahoo.com.br

RESUMO

Avaliaram-se os perfis cromatográficos por gel filtração de proteínas do plasma seminal de 19 touros jovens Guzerá e suas associações com parâmetros andrológicos e testosterona. A concentração de proteínas totais no plasma seminal variou de 2,86 a 78,82 mg/ml, com média de $17,18 \pm 20,49$ mg/ml, com grande variabilidade entre os touros. Tais concentrações estão correlacionadas ($p < 0,05$) com peso corporal e testosterona sérica, mostrando a influência da condição nutricional, e a dependência por testosterona, na secreção dessas proteínas; bem como com a concentração espermática e volume seminal sugerindo que a maior parte das proteínas presente no plasma seminal tem como origem os testículos e as glândulas sexuais acessórias. O perfil por gel filtração das proteínas do plasma seminal apresentou oito diferentes frações, com alguns picos se correlacionando com a idade, peso corporal, circunferência escrotal, características físicas (motilidade e concentração espermáticas) e morfológicas (defeitos espermáticos maiores) do sêmen. Conclui-se que as avaliações das concentrações de proteínas do sêmen de touros jovens Guzerá mostraram-se favoravelmente associadas com algumas características seminais no momento da ejaculação, podendo atuar como marcadores bioquímicos para seleção de touros objetivando altas fertilidades.

Quantification of semen proteins from Guzerat bulls and their associations with andrologic traits

SUMMARY

Chromatographic profile of seminal plasma from 19 young Guzerat bulls, and their associations with andrologic traits and testosterone were evaluated. Total seminal plasma protein concentrations ranged from 2.86 to 78.82 mg/ml, average of 17.18 ± 20.49 mg/ml. The seminal plasma protein profile by gel filtration showed eight different fractions, being some of them correlated to age, body weight, scrotal circumference, physical (sperm motility and concentration) and morphologic (mojar sperm defects) of the semen. These concentrations were correlated ($p < 0.05$) with body weight and testosterone serum levels, showing the influence of the nutritional condition, and the dependence for testosterone, in the secretion of those proteins; as well as with the sperm concentration and seminal volume suggesting that most of the proteins present in the seminal plasma has as origin the testicles and the accessory sex glands. One's can conclude that the evaluations of seminal proteins concentrations of Guzerat young bulls shows favorably association with some seminal traits in the moment of the ejaculation, acting as biochemical markers for selection of bulls aiming at high fertility.

INTRODUÇÃO

Diversos testes complementares veem sendo utilizados para prever a fertilidade de reprodutores, tendo-se em vista as altas correlações com o desempenho reprodutivo, além dos diferentes aspectos da

qualidade seminal mensurados em cada teste. Novas técnicas têm sido desenvolvidas e avaliadas juntamente com as análises de rotina e os testes complementares já utilizados para a avaliação andrológica, buscando maior compreensão de seus resultados (Malmgren 1997; Martins et al. 2006).

Para identificação de touros de alta fertilidade torna-se necessário, além das avaliações andrológicas de rotina, a aplicação de técnicas mais sofisticadas relacionadas à qualidade funcional do espermatozoide, aos mecanismos fisiológicos envolvidos na fertilização e aos processos bioquímicos da fertilidade (Blottner, Nehring & Torner 1990; Moura et al. 2011).

A fertilidade do espermatozoide é resultado de uma soma de fatores, que vão desde sua produção e transporte, até a maturação, em diversas regiões do trato reprodutivo masculino (Killian 1992).

Neste contexto, a avaliação do perfil de proteínas do sêmen de touros, tem aberto novas fronteiras como avaliação reprodutiva complementar (Ax et al. 2002; Fazeli, Moore & Holt 2000). Vários estudos têm mostrado a existência de proteínas do plasma seminal que são fundamentais para os processos biológicos da fecundação (Bellin, Hawkins & Ax 1994; Boe-Hansen et al. 2015; Killian, Chapman & Rogowski 1993; Manjunath et al. 1993).

O objetivo do presente estudo foi descrever o perfil de proteínas do plasma seminal de touros jovens da raça Guzerá, buscando associações com características andrológicas e níveis séricos de testosterona.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Palestina, município de Unaí, noroeste do estado de Minas Gerais, na região conhecida como "Serra do Bebedouro", tendo como coordenadas geográficas 16°35'S de latitude e 46°47'W de longitude, situada em área de Cerrado.

Dezenove touros Guzerá, com idades variando de 24 a 34 meses, foram selecionados andrológicamente para avaliação do perfil proteico do sêmen. Avaliaram-se os aspectos clínico-andrológicos, circunferência escrotal (CE) e biometria testicular (comprimento e largura), além dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), sendo então os animais submetidos à classificação andrológica por pontos (CAP), segundo Vale Filho (1997).

As medidas de circunferência escrotal (CE) foram obtidas por meio de fita métrica posicionada na região de maior diâmetro da bolsa escrotal; e a biometria testicular: comprimento e largura dos testículos direito e esquerdo, foram obtidas com o auxílio de paquímetro, sendo cada testículo medido individualmente. Foi realizada, também, a verificação da consistência testicular, pontuada em uma escala de um a cinco, conforme proposto por Vale Filho (1997).

Quanto ao sêmen foram avaliados os aspectos físicos (volume seminal, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermáticos) e morfológicos, classificados em defeitos maiores (DM), menores (Dm) e totais (DT). As coletas de sêmen foram realizadas com auxílio de aparelho de eletroejaculação e as avaliações físicas do sêmen realizadas imediatamente após as coletas. Para a avaliação morfológica, o sêmen foi fixado em solução de formol salino e transportado em temperatura ambiente até os laboratórios de andrologia

da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram avaliados os perfis proteicos do plasma seminal e das proteínas aderidas à membrana espermática, utilizando-se dos procedimentos bioquímicos de purificação e análise de proteínas, estabelecendo-se o perfil cromatográfico destas proteínas bem com suas correlações com os demais parâmetros andrológicos e concentrações séricas de testosterona.

As análises das concentrações séricas de testosterona foram realizadas em radioimunoensaio de fase sólida pelo método direto. Para avaliação das concentrações séricas de testosterona, os animais foram submetidos a coletas de sangue, por punção da veia jugular, utilizando-se o sistema de coleta a vácuo, em tubos de vidro de cinco mililitros (mL), sem anticoagulante. Após a coleta, a amostra de sangue foi centrifugada a 300g por 20 minutos e o soro sanguíneo obtido armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C), até o momento da análise.

Para análise do perfil proteico, uma alíquota de um mL de sêmen de cada touro foi coletada e diluída em solução tampão (ST) (Tris base 40mM, CaCl₂ 2mM, Azida Sódica 0,01%, Pepstatina A 1µM, PMSF 1mM) com inibidores de protease na proporção de 1:1, com envasamento em tubos criogênicos estéreis e congelamento da amostra em nitrogênio líquido (Bellin, Hawkins & Ax 1994).

O material após descongelamento foi diluído em ST (1:3) e centrifugado a 1.200g por 15 minutos a 4°C, para retirada do plasma seminal e separação dos espermatozoides das amostras (Bellin, Hawkins & Ax 1994). O material (pellet) contendo os espermatozoides foi incubado com três mL de ST contendo Triton X-100 0,1% por um período de uma hora a 4°C. Posteriormente o material foi centrifugado em ultracentrífuga a 50.000g por 30 minutos a 4°C, para retirada das proteínas aderidas à membrana espermática. Logo após foram congeladas a -20°C para posteriores análises cromatográficas (Bellin, Hawkins & Ax 1994; Miller, Winer & Ax 1990). Do plasma seminal foi retirada uma alíquota para dosagem de proteínas totais (PT) segundo a metodologia de Lowry et al. (1951) e imediatamente congelado -20°C para posterior processamento.

As amostras de proteínas do plasma seminal foram separadas de acordo com o seu peso molecular por meio de cromatografia líquida de gel filtração. Para isso, uma coluna Superose - 12 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) foi acoplada em sistema de cromatografia líquida de performance rápida (FPLC System, Pharmacia, Uppsala, Suécia) e previamente equilibrada com ST. Em seguida, 500 µL de amostra de cada animal foram submetidos à separação proteica por eluição em fluxo constante de 0,5 mL/min para obtenção das diferentes frações ou picos de proteínas presente no material analisado. As áreas sob os picos cromatográficos foram integradas e registradas pelo programa do FPLC e analisadas comparativamente entre touros. Para verificação da estimativa dos pesos moleculares em cada pico ou fração distinta de proteína, foi feita a calibração da coluna com seis diferentes proteínas de pesos moleculares crescente. Para verificação da esti-

mativa dos pesos moleculares em cada pico ou fração distinta de proteína, foi feita a calibração da coluna com seis diferentes proteínas de pesos moleculares crescente. De acordo com a regressão logarítmica do valor do peso molecular das proteínas em função do tempo de retenção na coluna foi realizado o cálculo aproximado dos pesos moleculares das proteínas de cada pico.

As médias e os desvios-padrão das áreas dos picos cromatográficos da gel filtração e da concentração de proteínas totais no plasma seminal foram analisadas de forma descritiva utilizando-se dos recursos computacionais do pacote estatístico Sas (1996). As associações entre os perfis proteicos do sêmen dos touros com os parâmetros reprodutivos e níveis séricos de testosterona foram avaliadas por correlações de Pearson (r) entre os dados (Sas 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais no plasma seminal variou de 2,86 a 78,82 mg/mL, com média de $17,18 \pm 20,49$ mg/mL, com grande variabilidade entre os touros; assim como observado em animais das raças Nelore (Assunção et al. 2003; Romitto 2003; Salvador 2005), Gir (Folhadella et al. 2013) e Brahman (Rego et al. 2015).

Comparando-se a variação encontrada nos resultados de proteína total do plasma seminal dos animais da raça Guzerá, com animais da raça Nelore (Romitto 2003; Salvador 2005) e Simental (Romitto 2003), criados em manejo extensivo e com os resultados descritos por Roncoletta (2003) em touros doadores de sêmen, em centrais de coleta e processamento de sêmen, observa-se que a variabilidade nas concentrações das proteínas do plasma seminal é maior para touros criados a pasto. Pode-se sugerir que tal fato se deva ao efeito do manejo nutricional, geralmente mais satisfatório e controlado

em centrais de coleta e processamento de sêmen. Salvador (2005) sugeriu ainda, que a maior concentração de proteínas totais no plasma seminal descrito por Roncoletta (2003), pode ser explicada pelo fato do autor ter trabalhado com touros adultos.

Registrou-se correlação positiva e significativa ($r = 0,46$, $p = 0,0462$) entre a concentração de proteínas do plasma seminal e o peso corporal nos animais estudados (Tabela I), sugerindo que a condição nutricional é fator que influencia diretamente as proteínas do plasma seminal. Desta forma, pode-se especular que o aumento na concentração nas proteínas do plasma seminal, tenha como origem o maior aporte de aminoácidos aos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, pelo aumento desses aminoácidos circulantes na corrente sanguínea em animais com melhor condição nutricional (González 2000).

Verificou-se correlação positiva e significativa entre a concentração de proteínas do plasma seminal e o volume ejaculado ($r = 0,58$, $p = 0,0108$), indicando que parte dessas proteínas tem origem nas glândulas sexuais acessórias, uma vez que estas glândulas são as responsáveis pela maior fração do ejaculado.

Amostras de sêmen coletadas por eletroejaculação geralmente apresentam maior volume e menores concentrações espermática (Marco-Jiménez, Vicente & Viudes-de-Castro 2008) e de proteínas do plasma seminal (Rego et al. 2015) quando comparadas com aquelas obtidas por vagina artificial.

A concentração total de proteína do plasma seminal de carneiros não foi influenciada pelo método de coleta de sêmen, entretanto algumas proteínas do plasma seminal apresentaram mudanças significativas na sua expressão, sugerindo que o perfil proteico do plasma seminal pode sofrer alterações em função do método utilizado para a coleta do sêmen (Marco-Jiménez, Vicente & Viudes-de-Castro 2008). Tais características não puderam ser observadas neste estudo já que todos os animais foram submetidos a mesma técnica de coleta.

Rego et al. (2015) avaliando o método de coleta de sêmen, eletroejaculação e vagina artificial interna, no perfil de proteínas do plasma seminal de touros Brahman, verificaram efeito do método na concentração de proteínas do plasma seminal e no perfil proteico do sêmen. Os autores sugeriram que a estimulação elétrica sobre as glândulas acessórias na coleta por eletroejaculação levaria a maior secreção por essas glândulas, com aumento no volume de sêmen e, conseqüente, redução nas concentrações de espermatozoides no sêmen e de proteínas no plasma seminal; fato contrário ao observado neste estudo, já que a correlação positiva entre o volume de sêmen e a concentração de proteínas do plasma, indica que o aumento na secreção das glândulas acessórias levaria ao aumento na concentração dessas proteínas.

Já a correlação positiva e significativa entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a concentração espermática ($r = 0,65$, $p = 0,0025$), indicam que parte dessas proteínas tem origem nos testículos, e que o aumento na concentração espermática levaria ao aumento das proteínas do sêmen.

Tabela I. Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós congelamento, em touros Guzerá (Pearson correlations between concentrations of seminal plasma protein and age, body weight, serum testosterone concentrations and seminal traits pre and post freezing in Guzerat bulls).

| | PPS |
|---|----------------|
| Idade (meses) | 0,27 (0,2523)* |
| Peso corporal (Kg) | 0,46 (0,0462) |
| Circunferência escrotal (cm) | 0,34 (0,1505) |
| Motilidade espermática (%) | 0,33 (0,1627) |
| Concentração espermática ($\times 10^6$ spzt/ml) | 0,65 (0,0025) |
| Volume seminal (ml) | 0,58 (0,0108) |
| Defeitos espermáticos maiores (%) | -0,25 (0,2989) |
| Defeitos espermáticos menores (%) | -0,18 (0,4563) |
| Total de defeitos espermáticos (%) | -0,31 (0,1964) |
| Testosterona (ng/ml) | 0,70 (0,0008) |

OBS: * = nível de significância. PPS = proteínas do plasma seminal.

Tabela II. Variação do tempo de retenção (minutos) em coluna de Superose - 12 e suas estimativas de pesos moleculares, em oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros Guzerá (Variation of retention time (minutes) in Superose - 12 column and its molecular weights estimates, in eight chromatographic peaks identified in the seminal plasma of Guzerat bulls)

| Picos | Máximo | | Mínimo | |
|-------|--------|---------|--------|--------|
| | Tempo | kDa | Tempo | kDa |
| 1 | 13 | 3045,09 | 16 | 731,85 |
| 2 | 16 | 731,85 | 22 | 76,79 |
| 3 | 25 | 33,54 | 31 | 11,63 |
| 4 | 34 | 9,23 | 37 | 8,95 |
| 5 | 37 | 8,95 | 43 | - |
| 6 | 43 | - | 46 | - |
| 7 | 49 | - | 52 | - |
| 8 | 52 | - | 55 | - |

A associação com a concentração espermática sugere que as proteínas de origem testicular sejam sintetizadas por células que participam do processo espermatogênico, uma vez que o aumento na produção de espermatozoides e, conseqüentemente na concentração espermática, levaria ao aumento da concentração de proteínas totais do plasma seminal. Pode-se sugerir ainda, uma ação ou efeito comum e sinérgico entre a produção espermática e a síntese de proteínas do plasma seminal.

Estes dados indicam que as proteínas do plasma seminal não têm como origem apenas as glândulas sexuais acessórias, mas também os testículos e os epidídimos, conforme já sugerido por (Dacheux & Dacheux 2002; Töpfer-Petersen et al. 1998).

Encontrou-se ainda, associação positiva e significativa entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a concentração sérica de testosterona ($r = 0,70$, $p = 0,0008$) em touros jovens da raça Guzerá, similar ao descrito por Nass et al. (1990) que observaram que a síntese de algumas proteínas do plasma seminal de ratos, produzidas pelas glândulas acessórias, responde à concentração de testosterona circulante, já que tiveram seus níveis restabelecidos em ratos castrados tratados com propionato de testosterona.

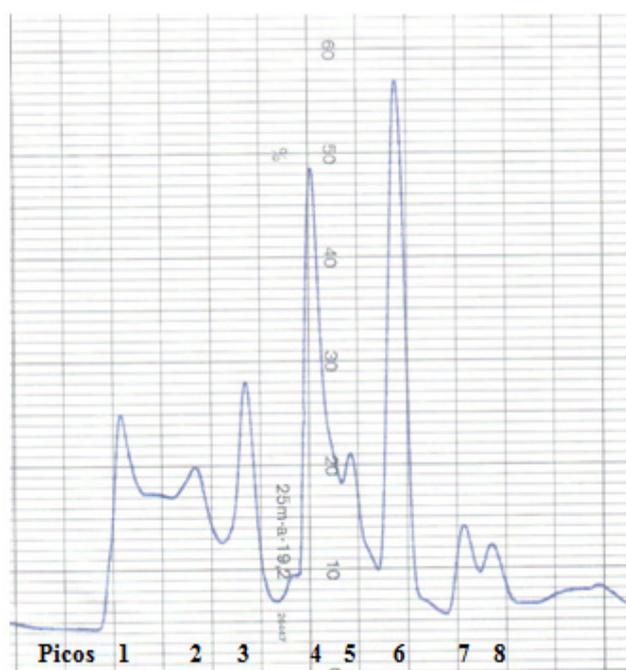


Figura 1. Perfil padrão de picos cromatográficos de proteínas do plasma seminal de touros da raça Guzerá (Standard profile of chromatographic peaks of seminal plasma protein of Guzerat bulls).

Tabela III. Valores mínimos, máximos e médios das áreas dos oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros Guzerá, e suas respectivas frequências (Minimum, maximum and mean values of the areas of the eight chromatographic peaks identified in the seminal plasma of Guzerat bulls, and their respective frequencies).

| Picos | Valores médios das áreas dos picos cromatográficos (%) | | | | |
|-------|--|--------|-------|---------------|----------------|
| | Mínimo | Máximo | Média | Desvio padrão | Frequência (%) |
| 1 | 5,22 | 31,68 | 15,31 | 8,82 | 10 (100%) |
| 2 | 0,00 | 25,14 | 14,83 | 7,81 | 06 (60%) |
| 3 | 0,00 | 25,84 | 13,41 | 8,28 | 08 (80%) |
| 4 | 0,00 | 37,95 | 16,40 | 12,68 | 07 (70%) |
| 5 | 0,00 | 13,96 | 4,54 | 5,32 | 05 (50%) |
| 6 | 4,55 | 14,36 | 9,08 | 3,45 | 10 (100%) |
| 7 | 0,00 | 3,11 | 2,47 | 0,69 | 04 (40%) |
| 8 | 0,00 | 1,82 | 1,17 | 0,62 | 03 (30%) |

Tabela IV. Correlações de Pearson entre as áreas dos picos de proteínas do plasma seminal e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais em touros da raça Guzera (Pearson correlations between the areas of seminal plasma protein peaks and age, body weight, serum testosterone concentrations and seminal traits in Guzera bulls).

| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 |
|---------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Idade | -0,19 (0,5806)* | 0,54 (0,2678) | 0,13 (0,7517) | 0,93 (0,0017) | 0,38 (0,5200) | 0,24 (0,4876) | 0,44 (0,5536) | -0,59 (0,5958) |
| Peso | 0,16 (0,6569) | 0,18 (0,7303) | 0,39 (0,3321) | 0,88 (0,0089) | 0,56 (0,3252) | 0,46 (0,1735) | 0,11 (0,8888) | -0,59 (0,5987) |
| CE | 0,43 (0,2088) | 0,31 (0,5428) | 0,42 (0,2960) | 0,41 (0,3504) | 0,50 (0,3806) | 0,04 (0,9076) | 0,40 (0,5915) | 0,99 (0,0477) |
| Motil | 0,00 (0,9806) | 0,28 (0,5830) | 0,70 (0,0510) | 0,15 (0,7320) | -0,38 (0,5182) | 0,03 (0,9203) | -0,91 (0,0822) | -0,83 (0,3748) |
| Conc | 0,09 (0,8024) | 0,50 (0,3120) | 0,68 (0,0606) | 0,94 (0,0016) | 0,06 (0,9144) | 0,00 (0,9897) | 0,24 (0,7503) | -0,94 (0,2135) |
| Vol | 0,11 (0,7470) | 0,76 (0,0759) | 0,72 (0,0400) | 0,84 (0,0157) | 0,15 (0,8069) | 0,19 (0,5882) | 0,79 (0,2049) | -0,06 (0,9586) |
| DM | 0,13 (0,7052) | -0,91 (0,0115) | -0,41 (0,3077) | -0,46 (0,2973) | -0,17 (0,7804) | 0,04 (0,9086) | -0,90 (0,0932) | -0,89 (0,2919) |
| Dm | 0,43 (0,2146) | 0,03 (0,9510) | 0,40 (0,3150) | -0,51 (0,2419) | 0,19 (0,7558) | 0,24 (0,4886) | -0,89 (0,1042) | -0,17 (0,8870) |
| DT | 0,44 (0,1945) | -0,19 (0,7143) | 0,23 (0,5757) | -0,58 (0,1687) | 0,11 (0,8552) | 0,24 (0,4963) | -0,91 (0,0880) | -0,30 (0,7994) |
| Testost | 0,08 (0,8179) | 0,38 (0,4472) | 0,69 (0,0562) | 0,88 (0,0075) | 0,06 (0,9216) | 0,12 (0,7394) | 0,02 (0,9730) | 0,97 (0,1331) |

OBS: * = nível de significância. P (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) = picos de proteínas do plasma seminal de touros por gel filtração; Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Motil = motilidade espermática; Conc = concentração espermática; Vol = volume do ejaculado; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = total de defeitos espermáticos; Testost = concentração sérica de testosterona.

A concentração de proteínas totais do sêmen não esteve associada a nenhuma outra característica reprodutiva avaliada. Os resultados das análises da concentração de proteínas totais do plasma seminal realizadas neste estudo apresentaram pouca relação com características do sêmen; Martins et al. (2006) sugerem a presença de várias substâncias proteicas no plasma seminal, com funções no metabolismo espermático, tornando necessário mais estudos para identificação, caracterização e quantificação dessas substâncias.

Para análise do perfil por gel filtração de proteínas do plasma seminal, foram avaliadas as áreas dos picos cromatográficos, utilizando um total de 10 touros.

O perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal apresentou oito diferentes picos, na cromatografia de gel filtração em coluna de Superose-12, com variação do tempo de retenção e estimativas de pesos moleculares para cada pico, como descrito na Tabela II. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Salvador (2005) para touros Nelore, e ainda, aos nove picos descritos por Folhadella et al. (2013) para touros da raça Gir, sugerindo semelhança nos touros zebuínos.

Os resultados encontram-se dentro dos valores descritos por Mann e Lutwak-Mann (1981), que observaram que as diferentes proteínas presentes no plasma seminal se encontram distribuídas entre quatro e dez diferentes frações, variando individualmente entre touros.

As estimativas dos pesos moleculares foram obtidas por regressão linear entre pesos moleculares conhecidos de seis proteínas aplicadas à coluna de gel filtração e seus tempos de retenção, com variação de peso molecular entre 200 a 6,5 kDa. O pico um, e os picos seis, sete e oito apresentaram pesos moleculares estimados fora da curva padrão (Tabela II), não apresentando, portanto, valores confiáveis para este tipo de análise bioquímica, fato este também descrito por Salvador (2005).

Apesar de alguns dos picos obtidos por cromatografia do plasma seminal estarem fora da faixa de abrangência da regressão, bem como da faixa de separação da coluna, que é de até 200 kDa, os mesmos foram incluídos na Tabela II para efeito de comparação entre os touros, salientando-se que para estes picos as faixas de pesos moleculares estimados não apresentaram exatidão numérica adequada. A Figura 1 ilustra o perfil padrão de registro das áreas das frações e picos da cromatografia de gel filtração.

Para cada pico descrito foram observadas altas variabilidades entre touros, tanto na frequência quanto nas suas respectivas áreas cromatográficas, as quais estimam a concentração das proteínas do plasma seminal, contidas nestes picos. Na Tabela III são apresentadas às análises descritivas da variabilidade dos picos.

Observa-se que as maiores médias de áreas foram registradas para os picos um, dois e quatro, indicando que estes representam a maior fração de proteínas do plasma seminal, ou seja, a maioria das proteínas pre-

sentos no plasma seminal dos touros da raça Guzerá se encontrava dentro destas faixas de pesos moleculares (**Tabela II**); semelhante aos descritos por Salvador (2005) para touros Nelore, e por Folhadella et al. (2013) para touros Gir.

Os picos um e seis foram os mais frequentes, estando presentes em todos os touros avaliados. O pico três em 80% dos animais; o pico quatro em 70%, o pico dois em 60% e os picos cinco, sete e oito foram detectados em 50% ou menos dos animais avaliados. Dos 10 touros avaliados, três apresentaram todos os oito picos relacionados, dois animais apresentavam seis picos, do total de oito localizados; e cinco animais apresentaram perfil cromatográfico distinto em relação aos demais, apresentando apenas cinco ou menos picos dentre os oito identificados, com diferenças também em relação às médias de concentração de proteínas totais no plasma seminal.

Observou-se associação positiva entre a concentração de proteínas do plasma seminal e o pico quatro ($r = 0,92$, $p = 0,0033$), indicando que o aumento nas concentrações totais de proteínas do plasma seminal leva a aumento na concentração de proteínas nesse pico (**Tabela IV**).

Constataram-se também correlações positivas entre alguns dos picos encontrados. O pico um esteve altamente correlacionado com o pico cinco ($r = 0,98$, $p = 0,0029$), estando o pico cinco altamente associado com o pico seis ($r = 0,94$, $p = 0,0158$), as altas correlações entre os picos sugerem que as proteínas presentes nesses picos apresentam origem comum.

Para verificação da possível associação entre os diferentes picos de proteínas presentes no plasma seminal dos touros, e as características andrológicas, peso corporal, idade e concentrações séricas de testosterona, calcularam-se as correlações de Pearson entre as características (**Tabela IV**).

A CE esteve correlacionada ($p < 0,05$) somente com o pico oito do plasma seminal ($r = 0,99$, $p = 0,0477$), ou seja, quanto maior a CE, maiores foram as concentrações proteicas neste pico; a alta associação observada sugere que as proteínas presentes nesse pico têm como origem principal os testículos.

Observaram-se correlações positivas entre o pico quatro e idade ($r = 0,93$, $p = 0,0017$), e peso corporal ($r = 0,88$, $p = 0,0089$) dos animais sugerindo que à medida que os animais se tornam mais maduros, com consequente maturação dos órgãos sexuais, ocorre aumento na produção das proteínas presentes nesse pico. Observou-se, influência da condição corporal nessas proteínas, semelhante ao descrito anteriormente para a concentração total de proteínas do plasma seminal.

A correlação negativa e de alta magnitude entre o pico dois e o total de defeitos espermáticos maiores ($r = -0,91$, $p = 0,0115$), demonstra que as proteínas presentes neste pico, estão diretamente associadas à morfologia espermática, e que o aumento na concentração dessas proteínas está sinergicamente associada à redução dos defeitos espermáticos; sugerindo que esse pico possui proteínas que podem atuar como marcadores para morfologia espermática. Pode-se especular uma

possível participação dessas proteínas no processo de espermiogênese, e/ou de maturação espermática epididimária, atuando de forma direta nos espermatozoides até a ejaculação.

Já as correlações positivas e de considerável magnitude entre os picos três e quatro e o volume de sêmen, 0,72 ($p = 0,0400$) e 0,84 ($p = 0,0157$), respectivamente; e entre o pico quatro e a concentração espermática ($r = 0,94$, $p = 0,0016$), sugerem que estes picos de proteínas do plasma seminal estariam ligados a ejaculação. Ou seja, a produção de plasma seminal pelas glândulas acessórias, e a produção espermática pelos testículos, sendo constituídos de proteínas com origem nas glândulas sexuais acessórias, como proteínas de origem testicular e/ou epididimária, como as descritas por Belleannée et al. (2011); Dacheux e Dacheux (2002) e Souza et al. (2012).

A alta correlação entre o pico quatro e a concentração sérica de testosterona ($r = 0,88$, $p = 0,0075$) reforça estes achados, já que esse hormônio atua de forma direta na função dos órgãos sexuais do macho (González 2002; Hafez 1995).

CONCLUSÕES

Os perfis de proteínas do plasma seminal e da membrana espermática mostram grande variabilidade individual, com a concentração de proteínas do plasma seminal sofrendo influência da idade, condição corporal e testosterona em touros jovens Guzerá.

As proteínas do plasma seminal apresentam associações favoráveis com algumas características seminais, e ainda com características seminais pós-congelamento que sugerem ação dessas proteínas no metabolismo espermático e no processo de criopreservação.

BIBLIOGRAFIA

- Assunção, TI, Fontes, W, Souza, MV & Ricert, CAO 2003, 'Perfil de proteínas do plasma seminal de touros Nelore e sua relação com a fertilidade', *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, vol. 27, no. 2, pp. 187-8.
- Ax, RL, Hawkins, HE, DeNise, SK, Holm, TR, Zhang, HM, Oyarzo, JN & Bellin, ME 2002, 'New developments in managing the bull', in MJ Fields, RS Sand & JV Yelich (eds.), *Factors affecting calf crop: biotechnology of reproduction*, CRC Press, New York, USA, pp. 287-96.
- Belleannée, C, Labas, V, Teixeira-Gomes, AP, Gatti, JL, Dacheux, JL & Dacheux, F 2011, 'Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis'. *Journal of Proteomics*, vol. 74, no. 1, pp. 59-78.
- Bellin, ME, Hawkins, HE & Ax, RL 1994, 'Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid'. *Journal of Animal Science*, vol. 72, no. 9, pp. 2441-8.
- Blottner, S, Nehring, H & Torner, H 1990, 'Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility', *Theriogenology*, vol. 34, no. 3, pp. 619-28.
- Boe-Hansen, GB, Rego, JPA, Crisp, JM, Moura, AA, Nouwens, AS, Li, Y, Venus, B, Burns, BM & McGowan, MR 2015, 'Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls', *Animal Reproduction Science*, vol. 162, pp. 20-30.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal 2013, *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*, 3rd edn, CBRA, Belo Horizonte, Brasil.

- Dacheux, JL & Dacheux, F 2002, 'Protein secretion in the epididymis', in J Dacheux, F Dacheux & B Robaire (eds.), *The epididymis: from molecules in clinical practice*, Plenum, New York, USA, pp. 151-68.
- Fazeli, A, Moore, A & Holt, WV 2000, 'British andrology society workshop: sperm interactions with epithelia and their products', *Human Fertility*, vol. 3, no. 3, pp. 166-71.
- Folhadella, IM, Castro, TS, Salvador, DF, Sá, WF, Ferreira, AM, Ramos, AA, Polisseni, J, Serapião, RV, Camargo, AL, Andrade, VJ, Santoro, MM, Oliveira, JS, Rodrigues, LH & Vale Filho, VR 2013, 'Identificação de proteínas do plasma seminal de touros da raça Gir', *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, vol. 37, no. 1, pp. 64-71.
- González, FHD 2000, 'Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte', in FHD González (ed.), *Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, pp. 63-74.
- González, FHD 2002, *Introdução a endocrinologia reprodutiva veterinária*, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- Hafez, ESE 1995, 'Hormônios, fatores de crescimento e reprodução', in ESE Hafez (ed.), *Reprodução animal*, 6rd edn, Manole, São Paulo, Brasil, pp. 59-94.
- Killian, GJ 1992, 'Fertility factors in seminal plasma', *Proceedings of the fourteenth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, Milwaukee, USA, pp. 33-38.
- Killian, GJ, Chapman, DA & Rogowski, LA 1993, 'Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma', *Biology of Reproduction*, vol. 49, no. 6, pp. 1202-07.
- Lowry, OH, *Rosebrough, NJ, Farr, AL & Randall, RJ* 1951, 'Proteins measurement with the folin phenol reagent', *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265-75.
- Malmgren, L 1997, 'Assessing the quality of raw semen: a review', *Theriogenology*, vol. 48, no. 4, pp. 523-30.
- Mann, T & Lutwak-Mann, C 1981, 'Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems', in T Mann & C Lutwak-Mann (eds.), *Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology*, Springer-Verlag, New York, USA, pp. 269-336.
- Manjunath, P, Chandonnet, L, Baillargeon, L & Roberts, KD 1993, 'Calmodulin-binding proteins in bovine semen'. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 97, no. 1, pp. 75-81.
- Marco-Jiménez, F, Vicente, JS & Viudes-de-Castro, MP 2008, 'Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram'. *Reproduction in domestic animals*, vol. 43, no. 4, pp. 403-8.
- Martins, LF, Pereira, MCB, Guimarães, JD, Costa, EP, Silveira, TS, Torres, CAA, Rodrigues, MT & Braz, VB 2006, 'Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada', *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 35, no. 4, pp. 1653-59.
- Miller, DJ, Winer, MA & Ax, RL 1990, 'Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin', *Biology of Reproduction*, vol. 42, no. 5-6, pp. 899-915.
- Moura, AA, Andrade, CR, Souza, CEA, Rêgo, JPA, Martins, JAM, Oliveira, RV & Menezes, EBS 2011, 'Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade', *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, vol. 35, no. 2, pp. 139-44.
- Nass, SJ, Miller, DJ, Winer, MA & Ax, RL 1990, 'Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent', *Molecular Reproduction and Development*, vol. 25, no. 3, pp. 237-46.
- Rego, JPA, Moura, AA, Nouwens, AS, McGowan, MR & Boe-Hansen, GB 2015, 'Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls', *Animal Reproduction Science*, vol. 160, pp. 126-37.
- Romito, GC 2003, 'Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte', MSc dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Roncoletta, M 2003, 'Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros', PhD thesis, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.
- Salvador, DF 2005, 'Perfis cromatográfico e eletroforético de proteínas com afinidade a heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelamento de sêmen e reação acrossômica induzida', PhD thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- Sas 1996, *User's Guide*, SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Souza, CEA, Rego, JPA, Lobo, CH, Oliveira, JTA, Nogueira, FCS, Domont, GB, Fioramonte, M, Gozzo, FC, Moreno, FB, Monteiro-Moreira, ACO, Figueiredo, JR & Moura, AA 2012, 'Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams', *Journal of Proteomics*, vol. 75, no. 14, pp. 4436-56.
- Töpfer-Petersen, E, Romero, A, Varela, PF, Ekhlas-Hundrieser, M, Dostálková, Z, Sanz, L & Calvete JJ 1998, 'Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives', *Andrologia*, vol. 30, no. 4-5, pp. 217-24.
- Vale Filho, VR 1997, 'Andrologia no touro: avaliação genetal, exame do sêmen e classificação por pontos', *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, vol. 21, no. 3, pp. 07-13.