



Reitoria



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior



Ciência para redução das desigualdades
**XX Encontro de
Iniciação Científica**
**XIII Encontro de
Pós-Graduação e Pesquisa**
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL LIGADAS AO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Maria Luane da Silva Barroso¹; Ângela Maria Xavier Eloy²; Francisco Wilson Laurentino Filho³; Pedro Egberto Solon de Aguiar Neto⁴; Danisvânia Ripardo Nascimento⁵; Joannatha Vidal Gomes⁶

¹Mestranda do Curso de Pós-graduação em Zootecnia - UVA; E-mail: luanesilva62@hotmail.com, ²Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa; E-mail: angela.elay@embrapa.br, ³Graduado do Curso de Medicina Veterinária- UNINTA, E-mail: filhokardeon@hotmail.com, ⁴Graduando do Curso de Medicina Veterinária- UNINTA, E-mail: pedro_egberto@hotmail.com, ⁵Graduanda do Curso de Ciências Biológicas – UVA, E-mail: danisvania.ripardo@hotmail.com, ⁶Graduando do Curso de Medicina Veterinária- UNINTA, E-mail: vidalgomes2015@hotmail.com

Resumo: Atualmente as proteínas do plasma seminal tem sido objeto de pesquisas relacionadas a marcadores moleculares, tendo como um dos focos de estudo a sua relação com a congelação do sêmen. Foram utilizados seis reprodutores caprinos da raça Saanen visando identificar possíveis proteínas relacionadas ao processo de criopreservação do sêmen através da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE). No gel SDS-PAGE foi observado pesos moleculares de bandas variando de 18 kDa a 152 kDa. Sugere-se que as bandas proteicas presentes no plasma seminal dos animais da raça Saanen estejam ligadas à capacidade de recuperação pós-congelação.

Palavras-Chave: Caprinos; Eletroforese 1DE; Plasma Seminal.

INTRODUÇÃO

As proteínas têm sido alvo de muitos estudos, principalmente na busca de marcadores relacionados à fertilidade e congelabilidade do sêmen. Dentre as mais estudadas podemos citar a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a clusterina, a

albumina e a osteopontina (JOBIM *et al.*, 2009). A investigação dessas biomoléculas permite identificar possíveis proteínas relacionadas à criopreservação do sêmen assim como aquelas que desempenham importantes funções nos diversos processos e mecanismos reprodutivos.

As proteínas do plasma seminal desempenham um importante papel na capacitação dos espermatozoides e exercem vários efeitos sobre a função espermática. Essas proteínas são parcialmente oriundas do plasma sanguíneo e, parcialmente, sintetizadas pelos testículos (KATO *et al.*, 1985), epidídimo (TURNER e REICH, 1987) e vesícula seminais (MANJANATH *et al.*, 1994). A determinação do perfil proteico do plasma seminal de animais para reprodução possibilitará a utilização dessas proteínas como marcadores moleculares, cuja presença ou ausência servirá de indicativo de qualidade seminal e fertilidade, contribuindo para a seleção de reprodutores para monta natural ou IA. O presente estudo tem como objetivo identificar marcadores proteicos ligados a criopreservação do sêmen caprino da raça Saanen.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral, Ceará, na região Norte, em pleno semiárido, a 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros. Foram utilizados seis caprinos da raça Saanen. As coletas foram realizadas através de vagina artificial, tendo como manequim uma fêmea estrogonada com Cipionato de Estradiol (ECP). Ao todo foram realizadas cinco coletas por animal, embora tenha ocorrido perda de duas coletas de um animal, perfazendo um total de 28 coletas. As análises espermáticas foram realizadas no Laboratório de Andrologia, Tecnologia de Sêmen e Inseminação Artificial da Embrapa Caprinos e Ovinos. A congelamento do sêmen foi realizada através da máquina de congelamento TK3000 usando como solução diluidora o Tolera-D®, e concentração espermática de 200 milhões/palheta de 0,25mL.

Após o processo de criopreservação, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade e vigor dos espermatozoides. Uma parte do sêmen obtido durante a coleta foi centrifugado a 10000x g durante 15 minutos à temperatura de 8° C para separação e obtenção do plasma seminal. O plasma obtido foi transferido para tubos *ependorff* e mantidos sob refrigeração à -4°C. Foram realizadas as análises de proteínas totais descrita por Bradford (1976), método baseado na ligação destas com o corante *Coomassie Brilliant Blue*. Para realização da eletroforese 1DE, géis de separação e de concentração foram preparados para a realização da análise das amostras de plasma seminal, sendo estas colocadas nos poços do gel de concentração, onde teve início a corrida eletroforética. Logo após o fim da corrida, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* por aproximadamente duas horas e descorados com etanol (30%) e ácido acético (7,5%), sob agitação constante. Posteriormente, foram escaneados e analisados usando-se o programa *Gel Analyzer*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

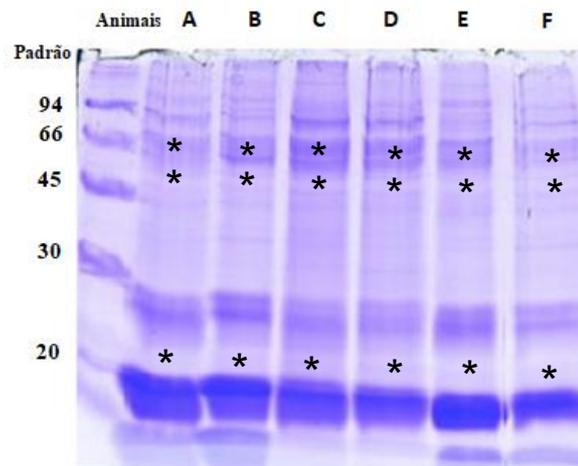
Em relação aos resultados de pós-congelamento do sêmen, os animais apresentaram motilidade que variou de 13,33% a 62% e vigor 1,0 a 3,0. O ejaculado de alguns

reprodutores são constantemente criopreservados com menos lesões na célula em relação a outros reprodutores (WATSON, 1995; HOLTET *et al.*, 2000). Essas diferenças podem estar associadas à variação individual de cada reprodutor, a habilidade do sêmen em resistir aos processos de congelação e descongelação, variações entre indivíduos e inclusive entre ejaculados (WATSON *et al.*, 2000, PERIS *et al.*, 2004).

Analisando o gel de eletroforese foi observado que a distribuição da frequência das bandas moleculares abaixo de 50 kDa, de 50 a 100 kDa e acima de 100 kDa. O gel SDS-PAGE foi observado que os pesos moleculares das bandas variaram de 18 kDa a 152 kDa (Figura 1). Com relação aos animais que apresentaram os maiores valores de motilidade e vigor, foi identificado algumas bandas moleculares que variaram de 34 kDa a 152 kDa. Encontrou-se no trabalho em análise, a banda de 55 kDa, a qual está relacionada a Osteopotina, é responsável pela modulação da função celular da membrana plasmática da célula espermática, ajudando, assim, na proteção dessas células durante o processo de congelação do sêmen (JOBIM *et al.*, 2009).

De acordo com Cancelet *al.* (1997); Frazer e Bucci, (1996), a banda de 55 kDa foi identificada como sendo a osteopontina, que se trata de uma glicoproteína que se liga aos espermatozoides por ocasião da ejaculação (SOUZA *et al.*, 2008). Uma banda de 66 kDa observada neste estudo está relacionada à albumina, uma proteína envolvida na extração de colesterol da membrana plasmática (YANAGIMACHI, 1994, FLESCHE e GADELLA, 2000) e importante para os eventos que procedem à fertilização. Estudos mostraram que a albumina sérica é benéfica à motilidade no sêmen de suíno, ovino, equino e coelho, mas tinha pouco efeito na motilidade espermática do sêmen bovino (BAAS *et al.*, 1983). Observou-se a presença de bandas com peso molecular de 22 kDa. Trabalhos relacionam as bandas de 22 a 26 kDa, provavelmente correspondendo à prostaglandina D sintetase tipo lipocalina, que estão relacionadas à alta fertilidade de reprodutores bovinos (KILLIAN *et al.*, 1993).

Figura 1- Eletroforese unidimensional (1DE) apresentando as bandas proteicas de reprodutores caprinos da raça Saanen, onde os pesos moleculares das bandas variaram de 18 kDa a 152 kDa.





Reitoria



CONCLUSÃO

Como a pós-descongelção do sêmen foi satisfatória na maioria dos animais, e encontradas bandas proteicas ligadas a qualidade do sêmen, conclui-se que as moléculas proteicas presentes estejam ligadas à capacidade de congelação, em especial a Osteopontina, Albumina e Prostaglandina D sintetase tipo lipocalina.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Caprinos e Ovinos pela disponibilidade dos animais e materiais necessários e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68. p. 275-280, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analalytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

JOBIM, M.I.M. **Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino**. 2001. 156f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.

FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M. SDS pages characterization of the protein in equine seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v. 46, p. 579-591, 1996.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **BiochemBiophys Acta**, 1469:197-235, 2000.

JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Albumina e osteopontina - proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen 1. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.296-305, 2002.

JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Marcadores proteicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte: CBRA**, 2009. p. 15-23.



Reitoria



KATO, M.; KATO, K.; GOODMAN, D.S. Immunohistochemical study on the localization of cellular retinol binding protein in rat testis and epididymis. **Biology of Reproduction.**, v. 32, p. 172 -189, 1985.

MANJANATH, P. et al. The major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction.**, v. 50, p.27-37, 1994.

PERIS, S.I. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v.25, p.224–233, 2004.

SOUZA, C.E. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins BSP A1/A2, BSP 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.72-89, 2008.

TURNER, T.T.; REICH, G. W. Influence of protein in rat cauda epididymal lumen fluid on cauda sperm motility. **Gamete Research.**, v. 18, p. 267-278, 1987.

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

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press. pp. 189-317, 1994.



Reitoria



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
*Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior*