



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Perfil protéico do plasma seminal de ovinos e sua relação com a morfologia espermática.

Nascimento, C.C.N.¹; Carneiro, L.C.¹; Carvalho, E.R.²

¹ - Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

²- Médico Veterinário

Resumo

A busca de novas tecnologias para melhorar a produção de ovinos tornou-se muito importante, principalmente no âmbito reprodutivo. Levando em consideração o macho reprodutor e sua importância para um bom sucesso reprodutivo dentro de um rebanho, novas formas de se avaliar a qualidade do sêmen estão sendo desenvolvidas. A eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida tem sido utilizada para descrever e caracterizar proteínas do plasma seminal de diversas espécies. Algumas destas proteínas estão relacionadas com a motilidade, a viabilidade e fertilização dos espermatozoides. O presente trabalho foi realizado com 10 reprodutores da raça Dooper, o sêmen foi coletado através de vagina artificial e deste retiradas amostras para fazer os exames físico, morfológico e a eletroforese SDS-PAGE. Devido a diversos fatores, não foi possível identificar as proteínas do plasma seminal, e assim não possibilitou estabelecer uma correlação com a morfologia dos espermatozoides. Mas vários problemas morfológicos, principalmente de cauda fortemente dobrada, desqualificariam os animais como reprodutores

segundo os padrões seminais para a espécie. Objetivo – se no seguinte trabalho analisar o perfil protéico do plasma seminal de ovinos e sua relação com a morfologia espermática

Palavras-chave: Biotécnicas reprodutivas. Dooper. Viabilidade espermática.

Abstract

The search for new technologies to improve sheep production has become very important, especially in reproduction. Taking into account the stud and its importance for a good reproductive success within a flock, new ways of evaluating semen quality are being developed. The two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel has been used to describe and characterize proteins in seminal plasma of several species. Some of these proteins are related to motility, viability and fertility of spermatozoa. This work was carried out with 10 players race Dooper, semen was collected by artificial vagina and this sampled to test the physical, morphological and SDS-PAGE. Due to several factors, it was not possible to identify proteins in seminal plasma, and thus not possible to establish a correlation with the morphology of sperm. But several morphological problems, particularly the tail strongly folded, disqualify animals as breeding second seminal patterns for the species. Objective - to work on the following analyze the protein profile of seminal plasma of sheep and their relationship with sperm morphology

Keywords: Reproductive biotech. Dooper. Sperm viability.

INTRODUÇÃO

A busca de novas tecnologias para melhorar a produção de ovinos tem se tornado muito importante, principalmente no âmbito reprodutivo. Levando em consideração o macho reprodutor e sua importância para um bom sucesso reprodutivo dentro de um rebanho, novas formas de se avaliar a qualidade do sêmen estão sendo desenvolvidas, e a aplicação de metodologias de estudos em biologia molecular tem revelado que diferentes moléculas estão implicadas

no complexo processo de fertilização, determinando o potencial de fertilidade de um macho.

Os testes laboratoriais para avaliação do sêmen são importantes não só para uma predição da fertilidade, mas também para o estudo de novos meios de sua preservação. A motilidade, o vigor (CASAGRANDE et al, 1979), e os testes de termorresistência preconizados para bovinos (DIMITROPOULOS et al, 1967), e ovinos (BONIFACINO-ARTOLA et al, 1987; EVANS et al, 1987), são os mais utilizados pelos profissionais que realizam a preservação de sêmen.

Em um recente estudo com 2D-PAGE usando gel de poliacrilamida a 12% (JOBIM et al, 2004), 21 bandas de proteínas foram identificadas no plasma seminal de ovinos fora da estação reprodutiva. Algumas proteínas do plasma seminal têm a influência na motilidade do espermatozóide, na viabilidade e na sua fertilização (CARDOZO et al, 2006). Em 1997, Smith et al., observou também que as mudanças climáticas e a concentração de proteínas do plasma seminal estavam relacionadas com o volume de sêmen e sua concentração espermática.

Os espermatozoides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. No processo in vivo, os espermatozoides alcançam esta capacidade fecundante no trato genital feminino. A capacidade de adquirir competência fecundante foi denominada de capacitação espermática (CHANG et al., 1951).

A capacitação é um processo que envolve múltiplas etapas, ainda não bem compreendidas, e mudanças bioquímicas e estruturais da membrana plasmática dos espermatozoides. Estas mudanças afetam a estrutura e a permeabilidade da membrana espermática. Este processo está relacionado com mudanças na concentração iônica intracelular, na fluidez da membrana plasmática, no metabolismo e na motilidade dos espermatozoides (YANG et al., 1993).

Todas essas transformações permitem a projeção de três principais passos da fertilização, que são a hiperativação espermática, o reconhecimento específico entre espermatozóide e zona pelúcida e a fusão dos gametas.

Em bovinos Killian *et al.* (1993), estudaram as proteínas do plasma seminal de touros por eletroforese em gel de poliacrilamida e sugeriu a existência de 4 proteínas associadas à fertilidade. Duas destas proteínas, 26 kDa (pI 6,2) e 55 kDa (pI 4,5), foram associadas com touros de alta fertilidade, enquanto outras duas, 16 kDa (pI 4,1 e 6,7, respectivamente), foram mais freqüentes em touros de baixa fertilidade.

Em estudo subsequente, a proteína de 55 kDa (pI 4,5) do plasma seminal bovino foi identificada como uma osteopontina (CANCEL *et al.*, 1997) e a de 26 kDa (pI 6,2) como uma "lipocalin-type prostaglandin-D synthase" (GERENA *et al.*, 1998).

Manjunath *et al.* (1993), descreveram os mecanismos propostos para explicar a atuação das proteínas do plasma seminal. Primeiro, após a ejaculação, as proteínas BSP cobrem a superfície do espermatozóide, interagindo com fosfolípidos que contém fosforilcolina na cabeça. Isso promove a incapacitação espermática, prevenindo a reação acrossômica prematura, até o espermatozóide atingir o trato reprodutivo e se encontrar com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) ou com a heparina. Num segundo passo, a HDL une-se às proteínas BSP ligadas na membrana espermática e no terceiro momento, as proteínas BSP sequestram o colesterol e alguns fosfolípidos. A perda de lipídeos pode resultar em alteração da permeabilidade da membrana espermática e entrada de cálcio para ativação da fosfolipase A2. Esta converte fosfolípidos em lisofosfolípidos, que desestabilizam a membrana para posterior fusão. Para o autor, isto possibilita as proteínas BSP promover a capacitação dos espermatozoides.

Segundo Jobim *et al.* (2004), 21 proteínas foram identificadas no plasma seminal dos ductos seminais de ovinos, através de 2D-PAGE e com imunoidentificadores foi possível encontrar estruturas homólogas a BSP-A1 e

NASCIMENTO, C.C.N., CARNEIRO, L.C., CARVALHO, E.R. Perfil protéico do plasma seminal de ovinos e sua relação com a morfologia espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 17, Ed. 122, Art. 827, 2010.

BSP-A2 identificadas por Manjunath et al. (1987), e com similares propriedades biológicas.

Sabe-se que a eficiência reprodutiva de carneiros é influenciada pela época do ano, afetando quantitativamente e qualitativamente a produção de espermatozóides (PELLETIER et al., 1988; PÉREZ et al., 1997), entre outras funções como a capacidade de fecundação e de criopreservação (COLAS et al., 1976; GUÉRIN et al., 1992). Mudanças climáticas influenciam no volume e na concentração espermática do ejaculado (SMITH et al., 1997), bem como também na concentração das proteínas do plasma seminal.

Objetivo – se no seguinte trabalho analisar o perfil protéico do plasma seminal de ovinos e sua relação com a morfologia espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com 10 reprodutores ovinos da raça Doorper na fazenda São José no município de Uberlândia - MG. O sêmen foi coletado através da vagina artificial, sendo acondicionado em frascos.

Primeiramente avaliaram-se as características físicas do sêmen, coloca-se uma gota do ejaculado sobre uma lâmina e leva-se a um microscópio, com a objetiva de 10X pode-se avaliar: turbilhonamento, motilidade e vigor.

Depois foram preparadas duas amostras: 1) foi separado 400µL do sêmen e acondicionado em frascos contendo solução formol-salina tamponada 1ml; 2) em um frasco foi colocado 1ml de sêmen e centrifugado a 4.000 x g durante 10 minutos, em seguida foram coletados 400µL de plasma seminal do sobrenadante e acondicionado no gelo para ser transportado até o Laboratório de Reprodução Animal – UFU, onde foram congelados.

Da primeira amostra foi feito o exame de morfologia espermática pelo método de contraste de fase, com a objetiva de 100X contou-se 100 células que foram classificadas em defeitos de: cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozóide; a segunda amostra foi descongelada, e no Laboratório de Biofísica - UFU foi centrifugada novamente a 10.000 x g durante 10 minutos,

coletou-se 100µL do sobrenadante, e nesta acrescentou-se 10µL de 'stop' e 50µL de beta-mercaptoetanol, para realizar a extração das proteínas através da eletroforese SDS-PAGE.

Dois espaçadores em forma de fita serão utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 0,2 cm de espessura, as placas de vidro utilizadas na preparação dos géis medem aproximadamente 9,5 cm de largura, 10,5 cm de comprimento e 0,1 cm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas serão imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que será preenchida com a solução do gel.

Terminada a polimerização, a placa será colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletroforese será conduzida por uma corrente constante de 25 mA por aproximadamente 80 minutos.

Após a eletroforese, os géis serão retirados da placa e mergulhados em uma solução fixadora (metanol 50%; ácido acético 10%) por 5 minutos, sendo posteriormente corados por aproximadamente 10 minutos com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v) em água-metanol- ácido acético (40:50:10 v/v). Em seguida, os géis serão descorados por uma solução de etanol à 35% e depois prensados entre duas folhas de papel celofane poroso, em bastidores fixados por garras e deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 dias para a secagem. Neste procedimento, os géis se desidratam, transformando-se numa fina película entre as folhas de celofane, que são recortadas e guardadas para análise posterior e fotografadas.

As eletroforeses para a estimativa dos pesos moleculares serão realizadas segundo o método de Laemmli (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio).

Tabela 1: Soluções utilizadas na preparação dos géis a 5% e 14% para eletroforese.

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME (µL)	
	Gel de separação (14%)	Gel de empilhamento (5%)
Tris-HCl 2M pH 8,8	1170	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200mM	63	27
Acrilamida:bis (30: 0,8)	2920	435
Água desionizada	2015	1990
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de amônio (10%)	37,5	18

A solução trizma base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (p/v) pH 8,3 será utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

Nas amostras de 100µL foi adicionado 50% de tampão STOP (Tris-HCl 187 mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 10%de β-mercaptoetanol. Posteriormente as amostras foram aquecidas durante 5 min. À 100°C e aplicadas ao gel de poliacrilamida.

Foi utilizado o seguinte marcador de peso molecular (Dalton Mark VII-L): α-lactoalbumina (PM: 14.200), inibidor de tripsina (PM: 20.000), tripsinogênio de pâncreas (PM: 24.000), anidrase carbônica (PM: 29.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (PM: 36.000), ovoalbumina (PM: 45.000) e soroalbumina bovina (PM: 66.000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados parâmetros espermáticos para características morfológicas e físicas, e também o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal.

Avaliação quanto ao turbilhonamento, motilidade e concentração espermática, segundo o manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 1998.

TABELA 2 - Avaliação das características físicas do sêmen ovino fresco Uberlândia-MG, 2007.

Número dos Animais	Turbilhonamento (0 – 5)	Motilidade (%)	Vigor (1 – 5)
01	4	80	4
02	5	85	4
03	2	50	2
04	1	40	2
05	5	90	4
06	2	50	3
07	2	40	2
08	5	60	3
09	4	85	3
10	5	90	4

Avaliação da morfologia espermática pelo método de contraste de fase, segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 1998.

TABELA 3 – Avaliação das características físicas do sêmen ovino fresco, Uberlândia-MG, 2007.

Número dos Animais	N (%)	CIN (%)	CCA (%)	CFD (%)	GCD (%)	Outros (%)
01	69	16	10	05	xx	xx
02	85	07	xx	08	xx	xx
03	12	xx	xx	80	07	01
04	84	xx	08	08	xx	xx
05	71	xx	03	24	01	01
06	37	01	05	51	05	01
07	45	01	08	45	01	xx
08	24	xx	xx	71	02	03
09	30	xx	02	59	04	05
10	86	xx	12	01	xx	01

Nota: N- Normal; **CIN-** Cabeça isolada normal; **CCA-** Cabeça com contorno anormal; **CFD:** Cauda fortemente dobrada; **GCD:** Gota citoplasmática distal; **Outros-** Gota citoplasmática proximal; Defeito de peça intermediária; Cabeça pequena; Cabeça irregular.

As altas porcentagens de espermatozóides anormais principalmente com defeito de cauda fortemente dobrada associados com outros defeitos e aos parâmetros físicos desclassificariam os animais como reprodutores, segundo as características seminais da espécie ovina. As causas podem ser muitas, mas a alta temperatura no dia da coleta, e os sinais clínicos que os animais apresentavam de desconforto térmico, pode ser um fator prejudicial para a espermatogênese e capacitação dos espermatozóides.

A figura abaixo representa a proporção de espermatozóides normais e anormais de todos os animais.

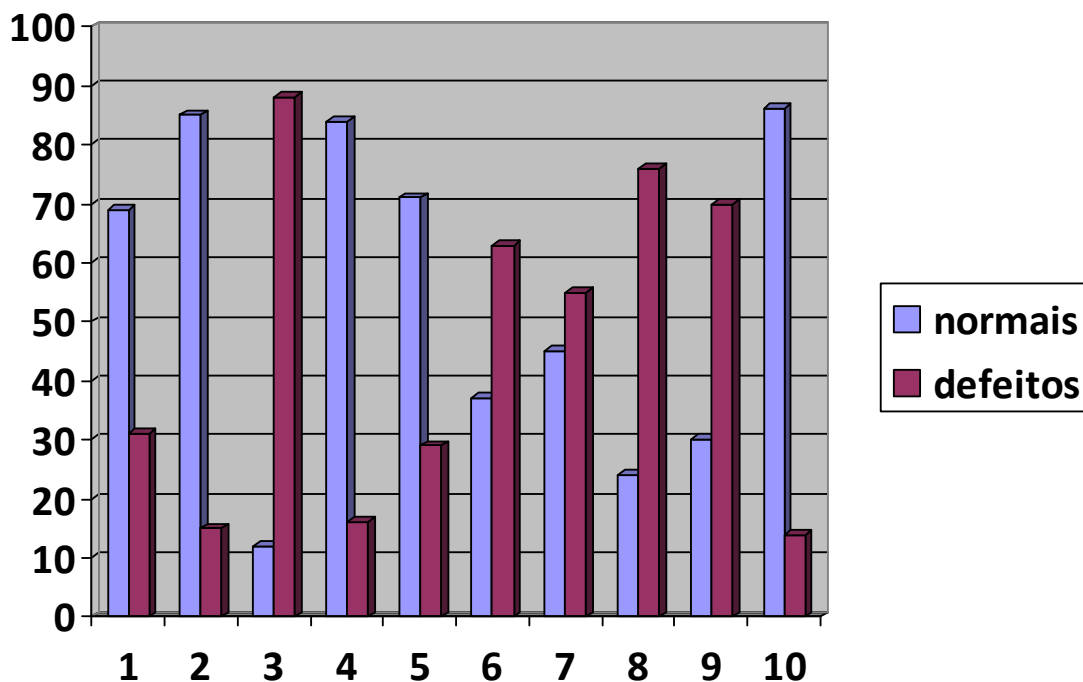


Figura 1: Distribuição da proporção de espermatozóides normais e defeituosos quanto à morfologia para todos os animais.

Devido a enorme quantidade de proteínas presentes no plasma seminal ovino, identificadas através de eletroforese SDS-PAGE, mesmo com a utilização do padrão de peso molecular não foi possível fazer a identificação das mesma.

5. CONCLUSÃO

Devido a enorme quantidade de proteínas encontradas no plasma seminal ovino, não foi possível estabelecer uma correlação com as características físicas e morfológicas dos espermatozóides. Porém foi possível observar que no exame morfológico dos espermatozóides, identificou um grande número de defeitos, desqualificando em aspectos reprodutivos metade dos reprodutores.

NASCIMENTO, C.C.N., CARNEIRO, L.C., CARVALHO, E.R. Perfil protéico do plasma seminal de ovinos e sua relação com a morfologia espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 17, Ed. 122, Art. 827, 2010.

REFERÊNCIAS

BONIFACINO-ARTOLA L. A.; PERDIGON F.; NEVES .J P.; LUZ, S. L .N. Inseminação intrauterina por laparoscopia em ovinos com a utilização de sêmen ovino congelado. In: Congresso brasileiro de reprodução animal, 8., Belo Horizonte, 1997. Anais. Belo Horizonte : **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, p. 102, 1987.

CANCEL A. M.; CHAPMAN D. A.; KILLIAN G. J. Osteopontin is teh 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CARDOZO J. A.; FERNÁNDES-JUAN M.; FORCADA F.; ABECIA A.; MUIÑO-BLANCO T.; CEBRIÁN-PÉREZ J. Á. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, School of Veterinary Medicine, University of Zaragoza**, Miguel Servet 177, Zaragoza, Spain; v. 66, n. 4, p. 841-50, 2006.

CASAGRANDE J. F.; PINHEIRO L. E. L.; ALMEIDA C. A.; FERRAZ J. B. S. A influência da motilidade e da velocidade espermática sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 31-5, 1979.

CHANG M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in to the fallopian tube. **Nature**, v. 168, n. 1, p. 697-698, 1951.

COLAS G.; BRICE G. Seasonal variations of the fertilizing capacity of the deep-frozen ram semen. In: **Proceedings of the eighth international congress on animal reproduction**; v. 4, p. 977-980, 1976

DIMITROPOULOS, E. La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valuer fecondant e du sperme congelé. **Annales de Medecine Veterinaire**, v. 4, p. 215-24, 1967.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.**Sydney, Butterworths**, 194 p, 1987.

GERENA, R. L.; IRIKUDA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertility associated protein in Bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D syntetase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.

GUÉRIN, Y.; COGNIÉ, Y.; POULIN, N. Freezability of freshly ejaculated and frozen ram semen in vitro. In: **Proceedings of the 12th international congress on animal reproduction, Animal Reproduction**, p. 1418-20, 1992

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F. 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. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-7, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**. v.227, p.680, 1970.

NASCIMENTO, C.C.N., CARNEIRO, L.C., CARVALHO, E.R. Perfil protéico do plasma seminal de ovinos e sua relação com a morfologia espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 17, Ed. 122, Art. 827, 2010.

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

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E. et al. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.48, p.27-37. 1993.

PELLETIER J., CHEMINEAU P., DELGADILLO J.A. Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. **Proceedings of the 11th International Congress Animal Reproduction**, A.I., v. 5, p. 211-219, 1988

PÉREZ R, LÓPEZ A, CASTRILLEJO A, BIELLI A, LABORDE D, GASTEL T, et al. Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing condition. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, n. 1, p. 109-117, 1997.

SMITH, J. F.; PARR, J.; SMITH, J. K.; BRIGGS, R. M.; DUGANZICH, D. M. Seasonal patterns in production and quality of semen of rams from flocks selected for or against an early breeding season. **Proc N Z Soc Anim Reprod**, p.57:259, 1997.

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R. H. Bovine oocyte development following in vitro maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n.1, p. 94-100, 1993.