

PERFIL DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM OS PARÂMETROS ANDROLÓGICOS DE TOUROS DA RAÇA NELORE

PROTEINS AND SUGARS PROFILE FROM THE SEMINAL PLASMA AND ITS RELATIONSHIP WITH ANDROLOGICAL PARAMETERS OF NELORE BULLS

Teresinha Inês de ASSUMPÇÃO¹; Kelly Aparecida Geraldo YONEYAMA²;
Rodrigo PALLAORO³; Clóvis KITAGAWA³; Camila ALBERTON³

1. Professora, Doutora, Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil. teassumpcao@famev.ufu.br; 2. Professora, Doutora, Instituto de Genética e Bioquímica - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Graduandos de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.

RESUMO: A avaliação da fertilidade de um touro é realizada considerando diferentes aspectos do animal e de seu sêmen. O objetivo deste estudo foi conhecer o perfil bioquímico de proteínas e açúcares redutores do plasma seminal em touros da raça Nelore com 24 meses de idade e sua relação com as características do sêmen. Foram utilizados 20 animais e as amostras de sêmen foram coletadas pelo método de eletroejaculação. As dosagens de proteínas e de açúcares redutores foram determinadas pelos métodos de Bradford com modificações e de Miller (ácido 3-5 dinitrosalicílico), respectivamente. A concentração de proteínas no plasma seminal variou de 5,90 a 166,33 mg/mL, com média de 61,41±44,60 mg/mL e a concentração de açúcares redutores variou de 0,78 a 19,88 mg/mL, com média de 9,31±4,54 mg/mL. A correlação entre a concentração de proteínas e açúcares redutores foi significativa com $r = 0,88$ ($p < 0,05$), sendo também significativa entre elas e a concentração e patologia espermáticas. O perfil de proteínas e açúcares redutores do plasma seminal de touros da raça Nelore com 24 meses de idade apresentou variação entre os animais, o que demonstra que a produção destes elementos tem característica individual e são importantes para a qualidade do sêmen.

PALAVRAS-CHAVE: Bioquímica de sêmen. *Bos taurus indicus*. Reprodução. Touro

INTRODUÇÃO

O touro tem um papel fundamental no progresso genético e na cadeia produtiva do rebanho, uma vez que um único reprodutor é capaz de cobrir um grande número de vacas em monta natural e com a inseminação artificial pode chegar a mais de 10 mil vacas/ano (ASSUMPÇÃO, 2004). No Brasil, devido às condições tropicais, os reprodutores podem apresentar variações nas características físicas e morfológicas do sêmen nas diferentes idades, provocadas principalmente por fatores genéticos, ambientais, nutricionais e de manejo. A fertilidade de um touro depende de uma série de fatores, como o comportamento animal e as características ligadas diretamente ao sêmen, tais como a motilidade e morfologia dos espermatozoides e a composição bioquímica do plasma seminal (AUSTIN; SHORT, 1990). Sabe-se que a capacidade de fertilização da célula espermática depende de fatores intrínsecos, dentre os quais a integridade de cromatina, a qualidade do genoma, a estrutura e a composição da membrana, além da presença de certos componentes bioquímicos do plasma seminal, como as proteínas e açúcares redutores, que contribuirão para que a célula espermática exerça com eficiência a sua

função (BELLIN et al., 1994; MAXWELL; JOHNSON, 1999).

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides, que compõe menos que 1% do volume total; e o plasma seminal, que é produto das secreções do epidídimo e glândulas anexas do trato reprodutivo, sendo 30-60% deste secretado pelas glândulas vesiculares (BARTH; OKO, 1989).

O plasma seminal é um meio isotônico e neutro, possui compostos inorgânicos e em concentrações elevadas, que não são encontrados em outras partes do organismo. As interações entre as células espermáticas e o plasma seminal iniciam-se desde o túbulo seminífero, mas durante a passagem pelo epidídimo, a membrana plasmática dos espermatozoides interage com o meio, sofrendo extensas alterações biológicas (TULSIANI et al., 1997). Não existem relatos que o mesmo possui fatores essenciais para a fertilização, mas este líquido pode proporcionar condições favoráveis à motilidade espermática, sobrevivência e transporte dos espermatozoides, tanto no trato reprodutor masculino, como no feminino (MOURA et al., 2010). O plasma seminal era considerado apenas um meio de transporte e sustentação às células espermáticas mas atualmente, estudos adicionando

plasma seminal de machos de alta fertilidade às células espermáticas de machos de baixa fertilidade têm provado a importância deste fluido na fertilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GATTI et al., 2004; RODRIGUES et al., 1999).

Dentre os constituintes do plasma seminal estão os íons, açúcares, proteínas, lipídeos, aminoácidos, ácidos cítricos, minerais, fosfatases, prostaglandinas, frutose, potássio e citrato (FOLHADELLA, 2008). As concentrações dos constituintes do plasma seminal dependem da espécie, do intervalo entre as ejaculações, método de coleta do sêmen, da genética e da idade do animal (SHIVAJI et al., 1990). O conteúdo protéico do plasma seminal de mamíferos varia de 3 a 7%, dependendo da espécie, sendo a concentração de proteínas de grande importância, pois é responsável pelos efeitos deste fluido na fertilidade espermática, tendo um papel essencial no metabolismo do espermatozóide, com interferência na fertilidade dos animais (SOUZA et al., 2008; KILLIAN, 1999; GATTI et al., 2004). Os efeitos das proteínas na fertilidade foram verificados por Killian et al. (1993) e Assumpção (2004) que, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional em géis, correlacionaram a fertilidade de touros com as concentrações de proteínas do plasma seminal, sendo algumas mais proeminentes nos animais de alta fertilidade e outras abundantes apenas nos de baixa fertilidade, o mesmo observado por Asadpour et al. (2007) no sêmen de búfalos.

Além de proteínas, o plasma seminal é rico em açúcares como frutose, glicose, manose, galactose, arabinose, ribose, fucose, sorbitol, inositol, sendo a frutose o principal açúcar presente no plasma seminal de touros (EWING; CHANG, 1986). Os açúcares têm sido relacionados com a fertilidade, pois servem de substrato para produção de energia ao espermatozóide, além ter efeito benéfico no processo de capacitação, na fertilidade do oócito, no metabolismo e na motilidade do espermatozóide (WILLIAMS; FORD, 2001). Assumpção et al. (2004) observaram que as concentrações de proteínas e açúcares redutores são muito importantes para a fertilidade dos touros mas, individualmente, não tiveram correlação significativa com a fertilidade.

Diante da importância dos constituintes bioquímicos no plasma seminal, objetivou-se com este estudo conhecer a composição de proteínas e açúcares redutores do plasma seminal de touros da raça Nelore de 24 meses de idade e sua relação com os parâmetros andrológicos do animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados animais (n=20) da raça Nelore de 24 meses de idade (*Bos taurus indicus*) de uma propriedade localizada no município de Itaúba/MT. Os animais foram mantidos em sistema extensivo, em pastagens de boa qualidade (*Brachiaria brizantha*) e com suplementação mineral. Os animais apresentavam-se em boas condições físicas, reprodutivas, nutricionais e sanitárias.

Coleta e análises do sêmen

As amostras de sêmen foram coletadas de todos os animais no mesmo dia utilizando o método de eletroejaculação. Em seguida à coleta, uma parte do sêmen foi transportada ao laboratório em banho de gelo e duas outras alíquotas armazenadas em solução formol salina tamponada (FONSECA et al., 1992). As amostras de sêmen mantidas em banho de gelo foram separadas em alíquotas de 0,5 mL e centrifugadas a 1.500 G por 30 minutos a 4°C, afim de separar o plasma seminal dos espermatozoides, o qual foi retirado, acondicionado em tubos de polipropileno e conservados a -20°C para as análises de proteínas e açúcares redutores (ASSUMPCÃO, 2004).

As análises físicas e morfológicas do sêmen foram realizadas de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). As análises de motilidade e vigor do sêmen foram feitas a campo, em seguida à coleta do sêmen, por microscopia óptica. As análises de concentração e patologias espermáticas foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia – MG, sendo as análises de concentração realizadas em câmara de Neubauer e as análises morfológicas realizadas em câmara úmida por microscopia óptica de contraste de fase, verificando a porcentagem total de patologias espermáticas.

Dosagens de proteínas e açúcares redutores no plasma seminal

As dosagens de proteínas e açúcares redutores foram procedidas no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia - MG. A dosagem de proteínas utilizou o método de Bradford modificado e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595nm. Albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 100, 250, 400, 500 e 1000µg/mL foi utilizada como solução padrão de proteína e como branco foi utilizada solução salina a

0,9%. Alíquotas de 6 μ l de amostra de plasma seminal foram incubadas com 300 μ l do reagente de Bradford (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1985). A determinação da concentração de açúcares redutores do plasma seminal utilizou o teste colorimétrico com o ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS), segundo técnica de Miller (1959), adotando como solução padrão a frutose e a leitura realizada em espectrofotômetro a 540nm.

Análise estatística

Para o estudo estatístico, foram realizadas correlações entre a concentração de proteínas e açúcares redutores com as características do sêmen dos animais. As variáveis quantitativas (concentração e patologia de espermatozoides) foram correlacionadas pelo método de Pearson e as qualitativas (motilidade e vigor) pelo método de Spearman.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises físicas e morfológicas do sêmen dos vinte animais resultaram em médias aproximadas de: 73,5 \pm 8,12% para motilidade progressiva; 2,75 \pm 0,44 para vigor espermático; 173,9 \pm 58,52 milhões de células/mL para concentração espermática e 12,1 \pm 5,10% para patologias espermáticas totais, médias estas que confirmam a boa qualidade do sêmen. As dosagens de proteínas e açúcares redutores demonstraram haver uma variação quanto às concentrações desses componentes nas amostras de plasma seminal, com médias de 61,41 \pm 44,60 mg/mL e 9,31 \pm 4,54 mg/mL, respectivamente. As concentrações de proteínas e açúcares redutores do plasma seminal demonstraram variabilidade individual entre os animais (figuras 1 e 2).

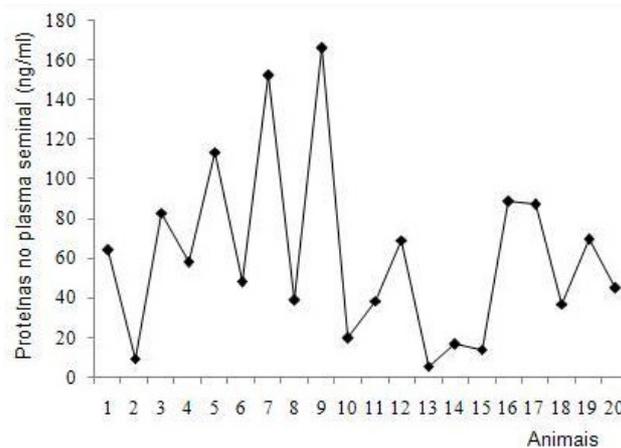


Figura 1. Perfil de proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore aos 24 meses de idade.

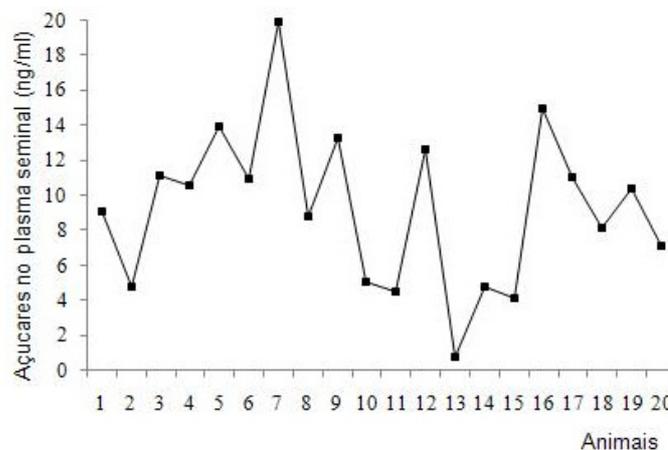


Figura 2. Perfil de açúcares redutores do plasma seminal de touros da raça Nelore aos 24 meses de idade.

As concentrações de proteínas totais no plasma seminal dos animais apresentaram variação de 5,90 a 166,33 mg/mL, com média de

61,41 \pm 44,60 mg/mL, semelhante ao encontrado por Roncoletta (1999) na mesma raça que obteve um total de proteínas variando de 33 a 111 mg/mL, com

média de 61,74 mg/mL. Assumpção (2004) ao trabalhar com touros da raça Nelore, encontrou uma variação de 1,51 a 33 mg/mL de proteína, com média de 13,5 mg/mL, enquanto que Jobim (2001) relatou um total de proteínas que variou de 71,66 a 78,98 mg/mL no plasma seminal de taurinos e zebuínos. Em touros da raça Gir, Folhadella (2008) encontrou uma concentração média de proteínas totais no plasma seminal de 47,1 mg/mL (4,1 a 167,9 mg/mL), semelhante ao verificado nesta pesquisa.

As concentrações de açúcares redutores no plasma seminal dos touros avaliados nesta pesquisa também apresentaram variação entre as amostras, sendo encontradas concentrações de 0,78 a 19,88 mg/mL e média de $9,31 \pm 4,54$ mg/mL. Estes valores são superiores aos verificados por Jardim e Bezerra (1987) também na raça Nelore, onde observaram concentrações de 2,52 mg/mL (animais de 30 meses) e 2,59 mg/mL (animais de 4-7 anos) e também por Assumpção (2004) que observaram média 3,67 mg/mL (0,61 a 8,22 mg/mL) em touros de 4-10 anos da mesma raça. Como verificado nesta

pesquisa com animais da raça Nelore, as concentrações de frutose são muito variáveis também em outras raças de bovinos, como na raça holandesa, mostrando variações de 6,14 a 8 mg/mL (OLTJEN et al., 1971) e 5,86 a 8,19 mg/mL (KILLIAN; AMANN, 1974). A variabilidade observada nas concentrações de açúcares redutores nos animais deste estudo pode ter sido devido a idade e genética dos animais, pois sua secreção reflete a funcionalidade individual das glândulas anexas do sistema reprodutivo dos animais (SHIVAJI et al., 1990).

Nos testes de correlação entre as características avaliadas foi verificado que a concentração e o total de patologias espermáticas tiveram correlação com as concentrações de proteínas e de açúcares redutores das amostras ($p < 0,05$), assim como entre concentração de proteínas e açúcares redutores (tabela 1). Não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre proteínas e açúcares redutores com a motilidade e vigor espermáticos (tabela 1).

Tabela 1. Correlações entre as características físicas e morfológicas do sêmen e o perfil de proteínas e açúcares redutores do plasma seminal de touros da raça Nelore com 24 meses de idade ($p < 0,05$).

variáveis	Correlação	Significância
Proteína x conc.	0.43	0.02
Açúcares x conc.	0.41	0.03
Proteína x pat.	-0.43	0.02
Açúcares x pat.	-0.45	0.02
Proteína x açúcares	0.88	0.0001

Conc. - concentração espermática, Pat. - Patologias espermáticas

Na análise de correlação entre as concentrações de proteínas e de açúcares redutores das amostras, verificou-se um elevado coeficiente de correlação linear ($r=0,88$), como encontrado por Assumpção et al. (2005) ($r=0,90$). Pode-se notar que nos touros, desta pesquisa, que possuem elevada quantidade de proteínas no plasma seminal também possuem elevada concentração de açúcares redutores no plasma seminal (Figuras 1 e 2). Esta correlação pode ser devido à origem comum das proteínas e açúcares redutores, principalmente nas glândulas vesiculares, o que caracteriza maior capacidade funcional destas glândulas. A correlação negativa verificada neste estudo entre proteínas e açúcares redutores com as patologias espermáticas totais, coincide com os estudos de Killian et al. (1993), Assumpção (2004) e Asadpour et al. (2007) que mostraram que a qualidade do sêmen e fertilidade estão diretamente relacionados à alta quantidade de proteínas no plasma seminal.

CONCLUSÕES

A composição de proteínas e açúcares redutores no plasma seminal apresenta variabilidade individual em touros da raça Nelore aos 24 meses de idade.

Há correlação significativa entre proteínas e açúcares redutores do plasma seminal e destas com concentração e patologias espermáticas do sêmen.

A avaliação das proteínas e dos açúcares do plasma seminal é importante para avaliação da capacidade reprodutiva de touros da raça Nelore. A fertilidade de touros depende de um complexo de componentes que agem em conjunto e que nenhum componente do plasma seminal, por si só, poderia inferir fertilidade ao sêmen do animal.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso pelo financiamento da

pesquisa. A Fazenda Macuco (Itaúba/MT) pela concessão dos animais.

ABSTRACT: The fertility evaluation of a bull is accomplished considering different aspects of the animal and its semen. The objective of this study was to know the biochemical profile of proteins and reducing sugars in the seminal plasma of within 24-month Nelore bulls and its relation to semen characteristics. Twenty animals were used and their semen samples were collected using electrical ejaculation. The dosages of proteins and reducing sugars were determined by the Bradford method with modifications and Miller (3-5 dinitrosalicylic acid), respectively. It was obtained in the concentration of proteins in the seminal plasma range from 5.90 to 166.33 mg/mL, average of 61,41±44,60 mg/mL and in the concentration of reducing sugars ranging from 0.78 to 19.88 mg/mL, average 9,31±4,54 mg/mL. The correlation between protein and sugar concentrations was significant with $r=0.88$ ($p < 0.05$). This correlation was also significant with concentration and spermatic pathology. The biochemical profile of proteins and reducing sugars in seminal plasma of with 24-month Nelore bulls showed a variation among the animals, demonstrating that the production of these elements is an individual characteristic and has great importance in the semen quality.

KEYWORDS: Biochemistry of semen. *Bos taurus indicus*. Bull. Reproduction

REFÊRENCIAS

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

ASSUMPCÃO, T. I. **Análise Proteômica e Bioquímica do Plasma Seminal de Touros da Raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2004. Brasília 125p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília.

ASSUMPCÃO, T. I.; TORRES JR, R. A. A.; SOUSA, M. V. et al. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte/ MG, v.57, n.1, p.55-61, 2005.

AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals - Germ Cells and Fertilization**. New York: Cambridge University Press, 1990. 285p.

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

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal plasma. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

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

EWING, L. L.; CHANG, T. S. K. **Physiology of male reproduction**. In: WALSH, P. C., GITIES, R. F., PERLMUTIER, A. O. Campbell's urology. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986, 200-274p.

FOLHADELLA, I. M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. 2008. Belo Horizonte. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79p.

- GATTI, J. L., CASTELLA, S., DACHEUX, F., ECROYD, H., MÉTAYER, S., THIMON, V., DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility, **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 82–83, p. 321–339, 2004.
- JARDIM, E. C.; BEZERRA, C. A. X. Níveis de frutose e ácido cítrico no sêmen de *Bos indicus* da raça Nelore. Anais da Escola de Agronomia e veterinária, Goiânia, v. 17, n. 1, p. 101-105, 1987.
- JOBIM, M. I. **Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino**. 2001. Santa Maria/RS. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- KILLIAN, G. J.; AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. Changes in chemical components and immunoelectrophoretic characteristics of seminal plasma before and after puberty. **Journal of Dairy Science**; Champaign, v. 57, n. 6, p. 703-706, 1974.
- KILLIAN, G. J. The role of marker protein in reproductive efficiency. **Veterinary Science Extension**, Pennsylvania, v. 29, p. 1112-1120, 1999.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, Montgomery, v. 52, p. 1353-1362, 1999.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Champaign, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOURA, A. A., SOUZA, C. E. A., STANLEY, B. A., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, Philadelphia, v. 73, n. 10, p. 2006–2020, 2010.
- OLTJEN, R. R.; BOND, J.; GERRITS, R. J. Growth and reproductive performance of bulls and heifers fed purified and natural diets. V. Free amino acid in the semen and blood plasma of bulls (puberty to 148 weeks of age). **Journal Animal Science**, Champaign, v. 33, p. 814-818, 1971.
- REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Adaptation of the dye-binding protein assay to microtitre plates. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 147, p. 144-147, 1985.
- RODRIGUES, B. A.; DONÁ, A. V.; RODRIGUES, J. L. Influência da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade de espermatozoides caninos no pós-descongelamento. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 36, p. 316-23, 1999.
- RONCOLETTA, M. **Perfil em SDS-page das proteínas de espermatozóide e plasma seminal relacionados com a congelabilidade do sêmen**. 1999. Jaboticabal/ SP. 109 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP.
- SHIVAJI, S.; SCHEIT, K. H.; BHARGAVA, P. M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990. 526p.
- SOUZA, C. E. A., MOURA, A. A., MONACO, E., KILLIAN, G. J. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid, **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 105, n. 1-2, p. 72–89, 2008.
- TULSIANI, D. R. P., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, p. 487-94, 1997.
- WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human. **Journal Andrology**, Malden, v. 22, p. 680-695, 2001.