

SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS NELORE POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO E SUAS ASSOCIAÇÕES COM PARÂMETROS ANDROLÓGICOS

*(Separation of Nelore bull seminal plasma proteins by gel filtration chromatography
and their associations with andrological parameters)*

Daniel Fábio SALVADOR^{1*}; Luiz Altamiro Garcia NOGUEIRA²;
Sandro César SALVADOR²

¹Fundação Centro de Ciências e Educação Superior a Distância do Rio de Janeiro (CECIEJ), Central do Brasil, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 20.943-001; ²Universidade Federal Fluminense.

*E-mail: salvador@cecierj.edu.br

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o perfil cromatográfico por gel filtração de proteínas do plasma seminal de 16 touros jovens da raça Nelore e suas associações com parâmetros andrológicos, congelamento do sêmen e reação acrossômica induzida. As concentrações de proteínas totais no plasma seminal variaram de 3,18 a 52,7 mg/mL, com média de 26,8±20,5 mg/mL. O perfil por gel filtração das proteínas do plasma seminal apresentou oito diferentes frações. Os picos com maior quantidade de proteínas foram os picos com peso molecular variando entre 640-240 kDa, 187-70 kDa e 12,4-4,7 kDa, além de estarem presentes em mais de 80% dos touros avaliados. O pico com variação entre 54,7-20,4 kDa também apresentou boa proporção de proteínas e frequência de ocorrência entre os touros (81%), sendo segundo a literatura a faixa de maior interesse para exploração quanto a proteínas associadas a fertilidade e/ou sucesso na criopreservação do sêmen. A concentração espermática esteve mais associada ao pico de maior peso molecular (entre 187-70 kDa) e a motilidade e padrão de recuperação espermática encontraram-se mais próximos aos grupos de proteínas com peso molecular menor do que 10 kDa. Já o resultado de reação acrossômica induzida (RAI) não demonstrou associação com nenhum grupo proteico. Conclui-se separação dos grupos de proteínas do plasma seminal em função do seu peso molecular através de gel de superose 12 foi uma importante ferramenta para análise inicial do perfil proteico de touros Nelore, sendo recomendado seu uso como procedimento inicial de quaisquer pesquisas científicas que visem explorar o perfil proteico do plasma seminal de touros.

Palavras-chave: Cromatografia, proteínas, reação acrossômica induzida, sêmen, Zebu.

ABSTRACTS

Chromatographic profile of seminal proteins from 16 young Nelore bulls, and their associations with andrologic parameters, semen freezing and induction acrossome reactions were evaluated. Total seminal plasma protein concentrations ranged from 3.18 to

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

52.7 mg/mL, average of 26.8 ± 20.5 mg/mL. The seminal plasma protein profile by gel filtration showed eight different fractions. The highest protein peaks were those with molecular weight ranging from 640-240 kDa, 187-70 kDa to 12.4-4.7 kDa, and were present in more than 80% of the bulls. The peak with a variation between 54.7-20.4 kDa also presented a good protein proportion and frequency of occurrence among the bulls (81%). According to the literature, this is the peak with most interest in exploration of proteins associated with fertility and semen cryopreservation success. Sperm concentration was more associated with the highest molecular weight peak (between 187-70 kDa) and sperm motility and freezability were closer to protein groups with molecular weight less than 10 kDa. The result of induced acrosome reaction (RAI) showed no association with any protein groups. The separation of seminal plasma protein groups according to their molecular weight by superose gel 12 was an important tool for the initial analysis of the protein profile of Nellore bulls, and its use as an initial procedure for any scientific research aiming at explore the protein profile of seminal plasma of bulls.

Key words: Chromatograph, proteins, seminal plasma, induced acrosome reaction, sperm, Zebu.

INTRODUÇÃO

A existência de proteínas no plasma seminal e sua associação com os processos biológicos ligados a fecundação não é novidade na literatura. É certo que as proteínas do plasma seminal têm amplo panorama de ação fisiológica e bioquímica no sêmen de mamíferos e possuem parcela significativa de responsabilidade sobre o sucesso de fertilidade de touros (SUAREZ, 2015; DRUART e GRAAF, 2018).

Na década de 90 as pesquisas das proteínas no plasma seminal e ligadas a membrana espermática de touros e suas associações com a fertilidade e conlegação do sêmen ganharam grande repercussão no meio científico (BELLIN *et al.*, 1994; KILLIAN *et al.*, 1993; MANJUNATH *et al.*, 1993). A partir desses estudos vislumbrou-se que a caracterização detalhada das proteínas do plasma seminal poderiam ser utilizada para localização e seleção de biomarcadores reprodutivos para alta fertilidade e congelabilidade do sêmen de touros (JOBIM *et al.*, 2004; DALTON *et al.*, 2012; KUMARESAN *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2019).

A capacitação e reação acrossômica são dois dos principais processo fisiológicos amplamente descritos de preparação dos espermatozoides como um pré-requisito para a fecundação (SENEDA *et al.*, 2016; BERNECIC *et al.*, 2019). Sabe-se também da existência de fatores “decapacitantes” que previnem a capacitação espermática precoce e que esses mecanismos passam por mudanças bioquímicas que envolvem o plasma seminal (SUAREZ, 2015; RICKARD *et al.*, 2019). Entretanto, para um melhor detalhamento dos processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos com preparação do espermatozoide para fecundação existe um longo caminho a percorrer, com diversos mecanismos ainda não

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

Ciência Animal, v.29, n.4, p.18-31, 2019.

elucidados (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2016; DRUART e GRAAF, 2018).

Análises mais completas do proteoma de touros *Bos taurus indicus* foram publicadas por Rego *et al.* (2014) para touros Brahman e por Assumpção *et al.* (2005) para touros Nelore, utilizando espectrometria de massa (MALDI-ToF) e gel de eletroforese bidimensional para identificar diversos biomarcadores descritos na literatura para sêmen de mamíferos que agem ativamente nos processos de maturação, proteção, capacitação e fertilização.

O presente estudo teve por objetivo descrever os resultados da avaliação geral do perfil de proteínas do plasma seminal em touros jovens da raça Nelore, bem como a busca de possíveis associações desse perfil proteico do sêmen com os parâmetros andrológicos, de congelação de sêmen e reação acrossômica induzida (RAI).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados os perfis proteicos em cromatografia de gel filtração do plasma seminal de 16 touros jovens (2 anos) da raça Nelore. Utilizou-se dos procedimentos bioquímicos de purificação e análise de proteínas conforme descritos a seguir para estabelecer o perfil cromatográfico das amostras de proteínas do plasma seminal, bem com suas possíveis correlações com os demais parâmetros andrológicos, de congelação do sêmen e RAI.

Os animais passaram por avaliações andrológicas de acordo com critérios do CBRA (2013), incluído a avaliação de morfologia espermática em microscopia de contraste de fase (NASCIMENTO e SANTOS, 2010). Após preparação de lâmina em câmara úmida de uma alíquota do sêmen diluída em solução formol salina tamponada, foram contados 200 espermatozoides em microscopia óptica de contraste de fase. Foram calculados os percentuais das principais patologias espermáticas descritas na literatura, classificadas em defeitos maiores e menores (MORANI *et al.*, 2018).

Para a congelação do sêmen foi realizada a coleta do sêmen dos touros pelo método de eletroejaculação. Após a coleta eram realizadas as análises dos aspectos físicos do sêmen (taxa de motilidade progressiva, turbilhonamento, vigor, aspecto, volume e concentração espermática) de acordo com as normas propostas pelo CBRA (2013) e Morani *et al.* (2018).

O volume total de sêmen coletado era então homogeneizado em um recipiente único em banho maria a 35 °C e diluindo em função da concentração espermática com diluente Nagase e Niwa (1963) (11,0% de lactose, 6,0% de glicerina, 20% de gema de ovo e 1mg/mL de estreptomicina e 1 x10⁶ UI/mL de penicilina potássica), envasado em em palhetes de 0,5 mL, identificados pelo número e data da coleta. Depois de 30 minutos de equilíbrio em temperatura ambiente era realizado o resfriamento e equilíbrio por um

*Endereço para correspondência:

salvador@cecierj.edu.br

período de oito horas a 5 °C. A congelação foi realizada após a permanência dos palhetes por 15 minutos em vapor de nitrogênio a -80 °C e posterior imersão em nitrogênio líquido. As amostras foram analisadas quanto à motilidade, vigor e viabilidade pós-congelação, bem como calculado a taxa de recuperação espermática (HAFEZ, 2004), para avaliação do perfil de congelação das amostras dos touros.

Coleta e armazenamento do sêmen para análises

O sêmen após ser coletado pelo método de eletroejaculação foi imediatamente resfriado e transferido, num período máximo de 10 minutos, para um laboratório de campo. Para cada touro foi coletada uma alíquota de um ml de sêmen para as análises. No laboratório, a congelação da amostra foi efetuada em uma solução tampão (ST) (Tris base 40mM, CaCl₂ 2mM, Azida Sódica 0,01%, Pepstatina A 1 μ M, PMSF 1mM) com inibidores de protease na proporção de 1:1, com posterior envasamento e congelação da amostra em nitrogênio líquido (BELLIN *et al.*, 1994).

Também foi realizado o teste de reação acrossômica induzida por heparina com as amostras de sêmen congelado de cada um dos touros, conforme descrito por Feliciano Silva (1998). As leituras foram feitas a 0:00, 4:00 e 4:15 h após o início da incubação, pelo método de Azul Trypan / Giemsa, de acordo com Didion *et al.* (1989).

Análises bioquímicas

O material após descongelação foi diluído em ST (1:3) e centrifugado a 1200g por 15 minutos a 4 °C, para retirada do plasma seminal da amostra e separação dos espermatozoides (BELLIN *et al.*, 1994). Do plasma seminal foi retirada uma alíquota para dosagem de proteínas totais (PT) segundo a metodologia de Lowry *et al.* (1951) e imediatamente congelado em freezer para posterior processamento.

As amostras de proteínas do plasma seminal foram submetidas a uma coluna de Superose-12, em sistema de FPLC (cromatografia líquida de performance rápida), para verificação das diferentes frações ou picos de proteínas presente no material analisado. As áreas dos picos, correspondente às representações gráficas do total de proteínas presentes, foram registradas pelo programa do FPLC e analisadas comparativamente entre touros. Para verificação da estimativa dos pesos moleculares (PM) em cada pico ou fração distinta de proteína, foi feita a calibração da coluna com seis diferentes proteínas de PM crescente. De acordo com a regressão logarítmica do valor do PM das proteínas em função do tempo de retenção na coluna foi realizado o cálculo aproximado dos PM das proteínas de cada pico.

Análise Estatística

Os resultados obtidos com as áreas dos picos cromatográficos de gel filtração foram analisados de forma descritiva. As associações entre os perfis proteicos (frequência

*Endereço para correspondência:

salvador@cecierj.edu.br

das bandas de peso molecular e área dos picos cromatográficos) do sêmen dos touros com as avaliações reprodutivas (parâmetros andrológicos, taxa de recuperação pós-congelação e reação acrossômica induzida- RAI) foram avaliadas pelas correlações simples entre os dados e pelas análises multivariadas com cálculos dos componentes principais (JUDEZ, 1989).

A análise fatorial dos componentes principais foi utilizada devido ao fato do estudo apresentar parâmetros quantitativos descritos pela literatura como passíveis de agentes causativos. A aplicação deste método é indicada para análises feitas fora de um plano experimental com balanceamento fatorial, ou seja, sem delineamento experimental e grande número de respostas medidas (SAMPAIO, 1993). Define-se como componentes principais, as combinações lineares, ou seja, fenômenos físicos distintos, submetidos à adição de entidades matemáticas análogas, multiplicadas por uma constante. As variáveis ao serem inseridas em um mesmo plano matemático, tornam-se isentas das flutuações das interpretações e da variação do movimento, apresentando-se de fato como são. Neste processo de análise, geralmente investigam-se sequencialmente os três primeiros componentes principais, que juntos devem somar em torno de 70% ou mais de inércia (SAMPAIO, 1993).

As coordenadas das variáveis nos eixos são coeficientes de correlação, que variam de -1 a 1, sendo que cada eixo de componentes principais passa a ser identificado pelas variáveis que possuem os coeficientes de correlação de maior valor numérico. Para a montagem das figuras, foram selecionados os dois eixos de componentes principais com as maiores variabilidades entre os valores positivos e negativos. Os resultados do terceiro eixo, não representados na figura, podem ser observados nas respectivas tabelas dos valores das coordenadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas a título de caracterização da amostra, as médias e desvio padrão dos 16 animais avaliados foram de 403,0±23,0 kg de peso corporal, 32,9±1,7 cm de circunferência escrotal, 372,8±196,3 x10⁶ sptz/mL de concentração espermática no ejaculado, 67,1±4,9 % de motilidade progressiva pré-congelação, 4,9±0,2 de vigor pré-congelação, 26,5±9,3% de motilidade progressiva pós-congelação, 4,4±0,7 vigor pós-congelação.

Proteínas totais do plasma seminal

A concentração de proteínas totais no plasma seminal variou de 3,18 a 52,7 mg/mL, com média de 26,8±20,5 mg/mL. Esse resultado mostra a alta variabilidade da quantidade de proteínas totais entre os touros jovens da raça Nelore.

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

Estes resultados foram semelhantes aos relatados por Assunção *et al.* (2003) que também trabalharam com touros jovens da raça Nelore. Já Roncoletta *et al.* (2006) descreveu variabilidade e números ainda maiores para a concentração de proteínas totais, fato que pode ser justificado por estar trabalhando com touros adultos em regime de confinamento em central de inseminação.

A concentração de proteínas totais do sêmen não esteve associada a nenhuma das avaliações reprodutivas nos trabalhos de Assunção *et al.* (2003) e Chacur *et al.* (2003), porém divergindo de RONCOLETTA *et al.* (2006) que registraram associações com a congelabilidade e a fertilidade do sêmen.

Perfil por gel filtração das proteínas do plasma seminal

Para análise do perfil por gel filtração de proteínas do plasma seminal, foram avaliadas as áreas dos picos cromatográficos, bem como calculadas as estimativas de pesos moleculares de cada pico.

No plasma seminal dos touros examinados foram encontrados oito diferentes picos na cromatografia de gel filtração em coluna de Superose-12, com a variação do tempo de retenção e estimativas de pesos moleculares para cada pico, como descrito na Tab. 1. Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Mann e Mann (1981), que observou que os tipos de proteínas estão distribuídos em quatro a dez frações distintas, de acordo com a variação individual entre os touros.

Tabela 01: Variação do tempo (minutos) de retenção em coluna de Superose 12 e suas estimativas de pesos moleculares, em oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros Nelore.

Picos	Máximo		Mínimo	
	Tempo	kDa	Tempo	kDa
1	15	640,00	19	240,00
2	20	187,00	24	70,00
3	25	54,70	29	20,40
4	31	12,40	35	4,70
5	37	2,85	40	1,36
6	42	-	44	-
7	48	-	49	-
8	51	-	52	-

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

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. Os picos 6, 7 e 8 na Tab. 01 apresentaram pesos moleculares estimados menores que 1 kDa, não apresentando, portanto, valores confiáveis para este tipo de análise bioquímica.

Apesar de alguns dos picos localizados na 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 Tab. 01 para efeito de comparação entre os touros, salientando-se que para estes picos as faixas de pesos moleculares estimados não apresentam exatidão numérica adequada. A Fig. 01 ilustra o perfil padrão de registro das áreas das frações e picos da cromatografia de gel filtração.

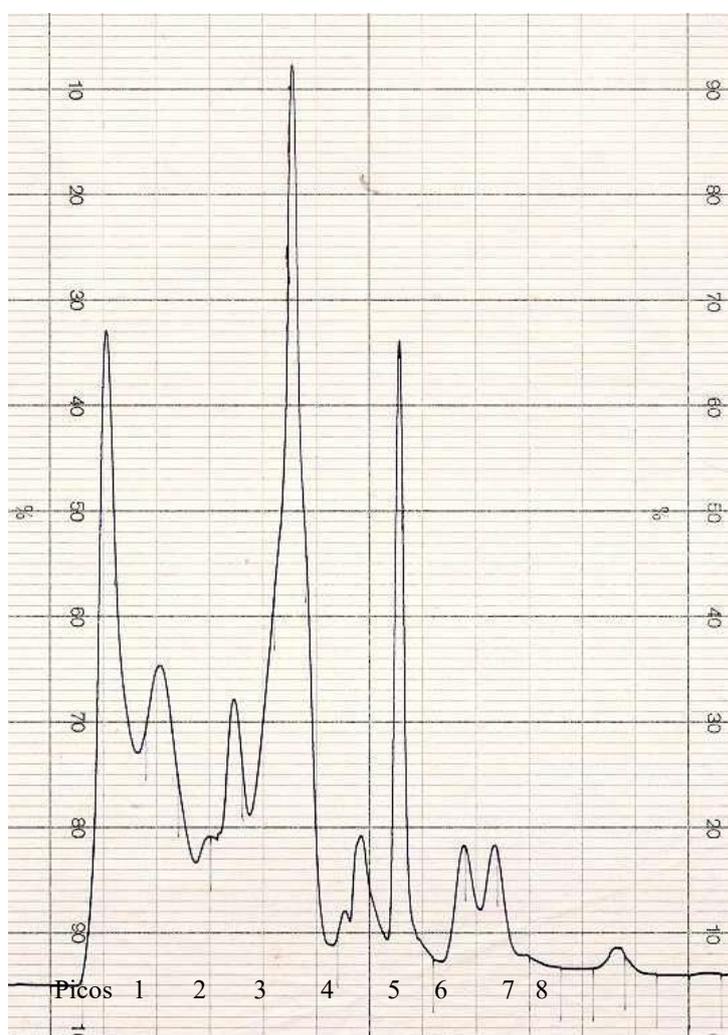


Figura 01: Perfil padrão de picos cromatográficos de proteínas do plasma seminal de touros jovens da raça Nelore, em gel filtração com coluna de Superose - 12.

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

Para cada pico descrito foi observado alta variabilidade entre touros, tanto na frequência, quanto nas suas respectivas áreas cromatográficas, as quais estimam a concentração das proteínas do plasma seminal contidas em cada pico. Na Tab. 02 são apresentadas as análises descritivas da variabilidade dos picos.

Observa-se que as maiores médias de áreas foram registradas para os picos 1, 2 e 4, indicando que estes representam a maior parte de proteínas do plasma seminal, ou seja, que a maioria das proteínas do plasma seminal se encontrava dentro destas faixas de pesos moleculares.

Os picos 1, 4 e 6 foram os mais frequentes, estando presentes em 94% dos touros avaliados. Os picos 2, 3 e 5 estiveram presentes em 81% dos touros e os picos 7 e 8 foram detectados em apenas 56% dos animais.

Dentre os 16 touros avaliados, seis apresentavam todos os oito picos relacionados na Tab. 01. A maioria deles (nove animais) apresentava mais de seis picos presentes do total de oito localizados. Apenas três animais apresentaram perfil cromatográfico distinto em relação aos demais, apresentando apenas quatro ou menos picos dentre os oito identificados, com diferenças também em relação às médias de concentração de proteínas totais no plasma seminal.

Tabela 02: Valores mínimos, máximos e médios das áreas dos oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros jovens da raça Nelore, e suas respectivas frequências.

Picos	Área (cm ²) e frequência dos picos cromatográficos				
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Frequência N. (%)
1	0	406,48	155,87	108,09	15 (94%)
2	0	632,5	95,05	152,77	13 (81%)
3	0	202,1	50,86	53,97	13 (81%)
4	0	465,4	172,96	151,19	15 (94%)
5	0	85,06	25,76	22,27	13 (81%)
6	0	279,2	65,84	63,60	15 (94%)
7	0	53,3	14,89	15,49	9 (56%)
8	0	39,36	9,8	12,22	9 (56%)

As áreas de cada pico foram divididas pelo total de proteínas do plasma seminal do touro, objetivando verificar a influência da quantidade de proteínas totais na magnitude de cada pico. Observou-se que determinados picos (4 e 7) mantêm maior dependência da quantidade de proteínas totais em comparação com outros, o que foi demonstrado pelas correlações simples entre os picos e as proteínas totais (Tab. 03). Diante disto, as análises foram realizadas com as áreas totais dos gráficos e não com a relação da área em função do total de proteínas.

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

As correlações entre as respectivas áreas de picos cromatográficos e alguns dos parâmetros andrológicos, de congelação de sêmen e a RAI são apresentados na Tab. 03.

Tabela 03: Correlações simples e graus de significância entre características andrológicas, proteínas totais e os oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros Nelore.

	CE	P. Recup. (%)	Conc. SPTZ	Proteínas Totais	RAI (%)
Proteínas Totais	-0,33 0,2059	0,17 0,9493	0,45 0,0766	1	0,26 0,3262
Pico 1	-0,17 0,5087	0,20 0,4576	0,37 0,1536	0,73 0,0012	0,22 0,3944
Pico 2	-0,41 0,1145	0,03 0,9110	0,64 0,0065	0,76 0,0006	0,23 0,3815
Pico 3	-0,24 0,3672	-0,13 0,6248	0,40 0,1151	0,83 0,0001	0,07 0,7870
Pico 4	-0,35 0,1752	0,06 0,8196	0,49 0,0533	0,94 0,0001	0,26 0,3253
Pico 5	-0,33 0,2085	-0,27 0,3082	0,33 0,2013	0,60 0,0136	0,28 0,2781
Pico 6	-0,29 0,2644	-0,15 0,5654	0,48 0,0559	0,79 0,0002	0,09 0,7367
Pico 7	-0,37 0,15	-0,04 0,8829	0,49 0,053	0,92 0,0001	0,28 0,2770
Pico 8	-0,49 0,0503	-0,29 0,2662	0,21 0,4205	0,80 0,0002	0,39 0,1299

Obs: P. Recuperação = Padrão de recuperação espermática; CE = Circunferência escrotal; Concentração Sptz = Concentração espermática; RAI = Reação acrossômica induzida.

A circunferência escrotal (CE) esteve correlacionada ($p < 0,05$) somente com o pico 8 do plasma seminal com valor negativo de $-0,49$, ou seja, quanto maior a CE menores foram os resultados do pico 8.

Observaram-se correlações de média magnitude entre a concentração espermática e o total de proteínas do plasma seminal e os picos 4, 6 e 7, de $0,45$, $0,49$, $0,48$, $0,49$, respectivamente. Já a correlação entre a concentração espermática e o pico 2 foi de alta magnitude ($0,64$) e significativa ($p < 0,05$). Este fato sugere que estes picos de proteínas do plasma seminal estariam mais ligados a ejaculação dos touros e não a produção de plasma seminal pelas glândulas acessórias, ou seja, seriam constituídos de proteínas de origem testicular e/ou epididimária, como as descritas por Dacheux e Dacheux (2002).

As associações dos picos com os resultados das avaliações andrológicas, congelação de sêmen e RAI foram avaliadas também por análise multivariada com componentes principais, observando-se a aproximação dos dados em três eixos de coordenadas. Na Tab. 04 são descritas

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

as coordenadas dos três eixos que foram usados para montar a Fig. 02, onde se pode identificar as associações entre os resultados observados no universo de variáveis estudadas.

Tabela 04: Coordenadas das variáveis, circunferência escrotal, motilidade espermática, padrão de recuperação espermática, concentração espermática, RAI, proteínas totais (PT) e dos oito picos cromatográficos (P1...P8), nos três eixos principais (inércia de 74 %).

Variáveis	Coordenadas dos componentes principais		
	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
Circunferência Escrotal	-0,45	0,38	0,18
Motilidade espermática	-0,03	0,32	0,73
Padrão de recuperação espermática	0,06	-0,67	0,53
Concentração espermática	0,53	0,68	0,01
RAI	0,30	-0,63	-0,57
PT	0,94	0,12	-0,14
P1	0,54	0,32	-0,54
P2	0,89	0,07	0,04
P3	0,90	0,01	0,22
P4	0,88	0,17	-0,19
P5	0,81	-0,25	0,39
P6	0,91	0,00	0,24
P7	0,96	0,03	0,06
P8	0,89	-0,31	-0,01

Observa-se no eixo 1 que as variáveis proteínas totais e os oito picos cromatográficos obtiveram os maiores valores, sendo o eixo um identificado por estas variáveis. Já o eixo dois foi identificado principalmente pela RAI e padrão de recuperação espermática pós-congelação (P. Rec.). O eixo três teve como valor principal a motilidade espermática.

A Fig. 02 ilustra as variáveis da Tab. 04, onde as associações entre elas podem ser visualizadas pela proximidade dos pontos nos eixos 2 e 3. Associando-se esta figura com os valores do primeiro eixo (que foi o de maior inércia) vislumbra-se uma imagem tridimensional, onde os valores mais próximos apresentam maiores associações.

Pela Fig. 02 observa-se forte aproximação entre os oito picos e deste com a concentração total de proteínas do plasma seminal. As demais características reprodutivas avaliadas, contudo, apresentaram-se mais dispersas. A motilidade e padrão de recuperação espermática encontraram-se mais próximos dos picos 5 e 8. Estes resultados concordam com Silva *et al.* (2003) ao relatarem que as proteínas associadas à motilidade e viabilidade espermáticas são as de menor peso molecular (abaixo de 10 kDa). Também houve tendência de aproximação da concentração espermática e circunferência escrotal com alguns picos do gel filtração. Já a RAI esteve bastante desassociada de todos os picos avaliados.

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

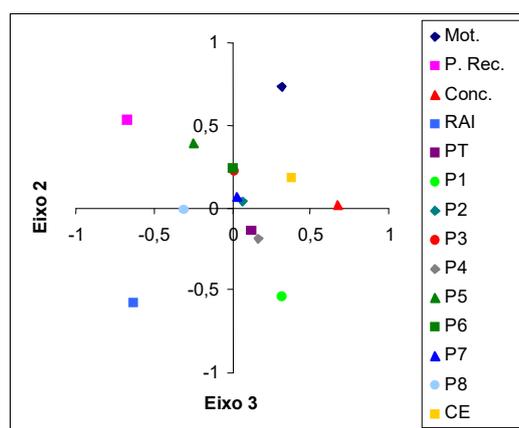


Figura 02: Representação gráfica das variáveis andrológicas e picos de proteínas do plasma seminal nos eixos de coordenadas 2 e 3.

CONCLUSÕES

O perfil cromatográfico de proteínas do plasma seminal, em touros jovens da raça Nelore mostraram alta variabilidade individual. O perfil proteico do plasma seminal em gel filtração de Superose 12 esteve distribuído em 8 diferentes picos cromatográficos, ou seja, diferentes grupos de peso molecular, porém na média, os picos com maior quantidade de proteínas foram os picos 1 (entre 640 e 240 kDa), 2 (entre 187 e 70 kDa) e 4 (entre 12,4 e 4,7 kDa). Entretanto, o pico 3 (peso molecular entre 54,7 e 20,4 kDa), também se destacou em termos de proporção de proteínas e frequência de ocorrência entre os touros. A concentração espermática esteve associada ao pico 2 (proteínas entre 187 e 70 kDa). Já a motilidade e padrão de recuperação espermática pós-congelamento encontraram-se próximas aos grupos de proteínas com peso molecular menor do que 10 kDa.

Conclui-se que a separação dos grupos de proteínas do plasma seminal em função do seu peso molecular através de gel de superose 12 pode ser uma importante ferramenta para análise inicial do perfil proteico de touros Nelore, sendo recomendado seu uso como procedimento inicial de quaisquer pesquisas científicas que visem explorar o perfil proteico do plasma seminal de touros.

REFERÊNCIAS

ASSUNÇÃO, T.I., FONTES, W., SOUZA, M.V., RICART, C.A.O. Perfil de proteínas do plasma seminal de touros Nelore e sua relação com a fertilidade. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.27, n.2, p.187-188, 2003.

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br

Ciência Animal, v.29, n.4, p.18-31, 2019.

ASSUNÇÃO, T.I.; FONTES, W.; SOUZA, M.V.; RICART, C.A.O. Proteome Analysis of Nelore Bull (*Bos taurus indicus*) Seminal Plasma. *Protein & Peptide Letters*. v.12, n.8, 2005.

BERNECIC, N.; GADELLA, B.; LEAHY, T.; DE GRAAF, S. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology*, v.137, p.56-66, 2019.

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 fluid. *Journal of Animal Science*, v.72, p.2441-2448, 1994.

CHACUR, M.G.M.; RABESQUINE, M.M.; PARRA, J.A.G.; MACHADO NETO, N.B.; RABESQUINE, M.M.; PARRA, J.A.G. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal, correlação com o quadro espermático. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.2, p.185-186, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 103p.

DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. Protein Secretion in the Epididymis. In: *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. 1a ed., by Robaire and Hinton, p.151-167, 2002.

DALTON, J.C.; DERAGONB, L.; VASCONCELOS, J.L.M.; LOPES, C.N.; PERES, R.F.G.; AHMADZADEH, A. Fertility-associated antigen on Nelore bull sperm and reproductive outcomes following first-service fixed-time AI of Nelore cows and heifers. *Theriogenology*, v.77, p.389-394, 2012.

DRUART, X.; GRAAF, S. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal Reproduction Science*. v.194, p.33-40, 2018.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedures to detect viability and the true acrossome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Reserch*, v.22, p.51-57, 1989.

FELICIANO SILVA, A.E.D. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia, 1998. 38p. (Embrapa recursos genéticos. Documentos, 35).

FERNANDES, C.E.; SOUZA, F F.; SOUZA-NETO, J.A.; RIBOLA, P.E.M. Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nellore bulls. *Ciência Rural*, v.39, n.1. 2009.

HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7^a ed., São Paulo: Ed. Manole, 2004. 513p.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.255-266, 2004.

*Endereço para correspondência:

salvador@cecierj.edu.br

Ciência Animal, v.29, n.4, p.18-31, 2019.

JUDEZ, A.L. Técnicas de Análisis de dados multidimensionales. Ministério da Agricultura, Pesca y Alimentacion. 1989. 301p.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v.49, p.1202-1207, 1993.

KUMARESAN, A.; JOHANNISSON, A.; HUMBLLOT, P.; BERGQVIST, A.S. Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.124, p.48-56, 2019.

KUMAR, P.; KUMAR, D.; SINGH, I.; YADAV, P.S. Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. *Agricultural Research*, v.1, n.1, p.78–86, 2012.

LI, C.; WANG, D.; ZHOU, X. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science*, v.173, p.1-7, 2016.

LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARS, A.L.; RANDALL, R.J. Proteins measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.

MANN, T.; MANN, C.L. Male Reproductive Function and Semen. 1^a ed., New York. Ed: Springer-Verlag, p.1-37, 1981.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.48, p.27-37, 1993.

MAGALHÃES Jr, M.J.; MARTINS, L.F.; SENRA, R.L.; SANTOS, T.F.; OKANO, D.S.; PEREIRA, P.R.; FARIA-CAMPOS A.; CAMPOS, S.V.; GUIMARÃES, J.D.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Differential abundances of four forms of Binder of SPERM 1 in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with different patterns of semen freezability. *Theriogenology*, v.86, n.3, p.766-777, 2016.

MAXWELL, W.M.; DE GRAAF, S.P.; GHAOUI REL, H.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility*, v.64, p.13-38, suppl., 2007.

PARK, Y.J.; PANG, W.K.; RYU, D.Y.; SONG, W.H.; RAHMAN, M. S.; PANG, M.G. Optimized combination of multiple biomarkers to improve diagnostic accuracy in male fertility. *Theriogenology*, v.139, p.106-112, 2019.

REGO, J.P.A.; CRISP, J.M.; MOURA, A.A.; NOUWENS, A.S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N.J.; CORBET, D.H.; BURNS, B.M.; BOE-HANSEN, G.B.; MCGOWAN, M.R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science*, v.148, 1-2, p.1-17, 2014.

RICKARD, J.P.; POOL, K.R.; DRUART, X., GRAAF, S.P. The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review. *Theriogenology*, v.137, p.104-112, 2019.

*Endereço para correspondência:

salvador@cecierj.edu.br

Ciência Animal, v.29, n.4, p.18-31, 2019.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.; ESPER, C.R.; BARNABE, V.H.; FRANCESCHINI, P.H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science*, v.91, p.77-87, 2006.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.; RODRIGUES, L. H.; FRANCHESCHINI, P. H. Proteômica para investigar a congelabilidade do semen bovino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, n.1, p.43-49, 2013.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal of Reproduction and Immunology*, v.66, p.11–22, 2011.

SAMPAIO, I.B.M. Relatório das atividades de pós-doutorado desenvolvidas no período de 03/09/92 a 04/03/93. Madrid: Universidade politécnica de Madrid, 1993. 123p.

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, p.1890-1900, 2003.

SENEDA, M.M.; SILVA-SANTOS, K.C.; MARINHO, L.S.R. *Biotechnology of animal reproduction*. Londrina State University, Londrina, Paraná. 1ª ed., Hauppauge, New York: Nova Science Publisher's, Inc. 2016. 348p.

SUAREZ S.S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Research*, v.363, p.185-194, 2015.

*Endereço para correspondência:
salvador@cecierj.edu.br