

## Perfil eletroforético das proteínas de baixo peso molecular (10-24kDa) do plasma seminal de reprodutores taurinos (*Bos taurus taurus*) e zebuínos (*Bos taurus indicus*)

### Electrophoretical profile of low molecular weight proteins of taurine and zebuine cattle bulls seminal plasma

Enefer Rosana Oberst,\* Maria Inês M. Jobim,\* Véra Wald,\*\*\*\* Mara Iolanda Rubin,\*\*\* Christianne Gazzana Salbego,\*\* Diogo Souza,\*\* Rodrigo Costa Mattos\*\*\*\*

#### Resumo

As proteínas do plasma seminal de 14 reprodutores (7 *Bos taurus taurus* e 7 *Bos taurus indicus*) foram analisadas através de eletroforese bidimensional, pela técnica de O'Farrel et al. (1977), modificada por Rodnight et al., (1988), em géis de poliácridamida a 15%, corados por Azul de Comassie. Foram quantificadas 11 bandas protéicas, de acordo com a densidade óptica exibida. As bandas avaliadas não apresentaram a mesma frequência de aparecimento nas espécies. Em reprodutores taurinos, com exceção das bandas 13 (14-15 kDa, pl 6,0-6,5) e 19 (16-18 kDa, pl 7,0-7,5), presentes nas amostras de 28,60% (2/7) dos reprodutores, as demais proteínas estiveram presentes nas amostras de plasma seminal de 100% dos animais. Apenas as bandas 3 (15-16 kDa, pl 4,7-5,2), 5 (16-17 kDa, pl 4,1-4,8), 7 (11-12 kDa, pl 4,8-4,9) e 9 (14-15 kDa, pl 5,5-6,0) não apresentaram variações significativas entre os reprodutores. Em zebuínos, as bandas protéicas 11 (13-14 kDa, pl 6,0-6,5), 19 (16-18 kDa, pl 7,0-7,5) e 23 (18-20 kDa, pl 4,8-5,2) foram evidenciadas nas amostras de 71% (5/7) dos reprodutores, a banda 13 em 57% (4/7) e as demais bandas estiveram presentes nas amostras de 100% dos animais. Com exceção da banda 15 (11-12, kDa, pl 7,5-8,0), as demais diferiram significativamente entre os touros. Dentre as 11 bandas analisadas, cinco diferiram estatisticamente entre as espécies, as proteínas denominadas 5 (16-17 kDa, pl 4,1-4,8); 7 (11-12 kDa, pl 4,8-4,9); 15 (11-12, kDa, pl 7,5-8,0), 21 (20-24 kDa, pl 7,2-7,5) e 23 (18-20 kDa, pl 4,8-5,2), sendo que os reprodutores taurinos apresentaram densidades ópticas superiores nas bandas protéicas 7 e 23 e os zebuínos nas bandas 5, 15 e 21.

*Palavras-chave:* proteínas, plasma seminal, eletroforese, touros.

#### Abstract

The seminal plasma protein profile of 14 bulls (7 *Bos taurus taurus* and 7 *Bos taurus indicus*) was analyzed by two-dimensional-electrophoresis using 15% polyacrylamide gels stained by Comassie blue. A total of 11 protein bands were selected by their optical densities. The protein bands evaluated did not show the same frequency for the two species studied. In *Bos taurus*, the bands 13 (14-15 kDa, pl 6.0-6.5) and 19 (16-18 kDa, pl 7.0-7.5) were present in 28.6% of the seminal plasma samples examined. The remainder bands were present in all samples examined. No statistical significance was found between *Bos taurus* bulls samples in the bands 3 (15-16 kDa, pl 4.7-5.2), 5 (16-17 kDa, pl 4.1-4.8), 7 (11-12 kDa, pl 4.8-4.9) and 9 (14-15 kDa, pl 5.5-6.0). On the other hand, in *Bos indicus* it was found that the bands 11 (13-14 kDa, pl 6-6.5), 19 and 23 (18-20 kDa, pl 4.8-5.2) were present on 71% of the samples, the band 13 in 57% and the remainder were present in all samples. The band 15 (11-12 kDa, pl 7.5-8.0) was the only one that did not show any variation between the *Bos indicus* bulls. Finally, five bands showed up differences on their optical densities between species. In *Bos taurus* the bands with high optical densities were the 7 and 23 and in *Bos indicus* the bands with high optical densities were the 5, 15 and 21.

*Keywords:* proteins, seminal plasma, electrophoresis, bulls.

\* Dep. Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, CEP 90540-000 e-mail: oberst@vortex.ufrgs.br

\*\* Dep. Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcellos, 2600, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003.

\*\*\* Dep. Clínica Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais, UFSM, Santa Maria, CEP 97105-900.

\*\*\*\* Dep. Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, CEP 90540-000.

## Introdução

A avaliação reprodutiva dos reprodutores é fator essencial para o êxito da inseminação artificial, relacionando-se com o potencial genético do touro na transmissão de fatores como alta produtividade, precocidade e adaptação ao meio. A avaliação do potencial reprodutivo de touros pode ser acrescida da análise das proteínas do plasma seminal, as quais têm importantes efeitos na função espermática. A técnica de eletroforese vem sendo utilizada para identificação e mapeamento dos componentes do plasma seminal em bovinos desde a década de 1950 (Larson e Salisbury, 1954). A relação dos componentes protéicos do plasma seminal com padrões de fertilidade normais e alterados, congelabilidade e/ou viabilidade do sêmen, foi referida em várias espécies animais (Wolfe et al., 1993; Killian et al., 1993; Frazer et al., 1996; Flowers, 1998; Roncoletta, 1999; Roncoletta et al., 1997; 1999;) e inclusive no homem (Baccetti et al., 1979; Autiero et al., 1991).

As diferenças na composição do plasma seminal entre bovinos europeus e zebuínos, verificadas através de eletroforese unidimensional, referem-se somente a variações na proteína total e presença ou ausência de determinadas bandas protéicas. No plasma seminal de touros zebus, através de eletroforese em acetato de celulose, Rocha et al. (1974) individualizaram oito frações protéicas, das quais três migraram para o cátodo, uma permaneceu na origem e as demais migraram para o ânodo. A maior porção das proteínas foi constituída por alfa-globulinas.

Cinco padrões de migração eletroforética, denominados I, II, III, IV e V, cada um exibindo de sete a nove frações protéicas, foram identificados no plasma seminal de touros de origem europeia e zebuína. Em europeus, as frequências foram de 7,69% nos padrões III, IV e V, de 23,08% no padrão I e de 53,85% no padrão II. Já em zebuínos, as frequências foram de 4% nos padrões II, III e IV, de 20% no padrão V e de 68% no padrão I. A banda protéica denominada "f", estava ausente em 61,54% dos touros europeus e em 8% dos zebuínos (Martins Júnior et al., 1995).

No plasma seminal de reprodutores de diferentes graus de congelabilidade de sêmen, utilizando eletroforese unidimensional, Roncoletta (1999) verificou que os touros zebuínos apresentaram valores superiores nas bandas protéicas de 14,4 kDa e os europeus nas bandas de pesos moleculares entre 10 e 27 kDa. A concentração de proteína foi superior nas amostras de plasma seminal de zebuínos enquanto os taurinos apresentaram o perfil protéico mais homogêneo (Roncoletta et al., 1997; Roncoletta, 1999).

A identificação sistemática das proteínas do plasma seminal representa uma ferramenta importante no entendimento da natureza e funções dos componentes do plasma seminal. Alada aos demais protocolos de avaliação de sêmen, poderá permitir maior compreensão dos eventos da fisiopatologia da reprodução e da tecnologia do sêmen, possibilitando, ainda, a investigação de potenciais marcadores de parâmetros produtivos que possam ser utilizados na seleção de reprodutores.

O presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar as diferenças no perfil eletroforético das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos, de alta congelabilidade de sêmen, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional.

## Material e métodos

Foram utilizados 14 reprodutores adultos, doadores de sêmen de uma central de inseminação artificial. Sete eram taurinos, sendo dois da raça Holandesa e cinco da raça Red Angus e os demais eram zebuínos da raça Nelore. Os animais apresentavam índice superior a 90% de ejaculados viáveis pós-descongelamento do sêmen, com valores superiores aos padrões exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), sendo, de acordo com os critérios da central, considerados como animais de alta congelabilidade do sêmen.

O sêmen foi coletado por vagina artificial e após sua avaliação, uma alíquota de 1,0 ml foi centrifugada por 15 a 20 minutos a 1.500 g, para a obtenção do plasma seminal e congelada em botijão de nitrogênio líquido, para posterior análise. As amostras de plasma seminal foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas por 60 minutos a 10.000g, divididas em alíquotas de 50 ml, congeladas e mantidas a -70°C. A determinação das proteínas totais de cada amostra foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951).

A eletroforese bidimensional foi realizada conforme descrito por O'Farrel et al. (1977), modificado por Rodnigh et al. (1988). A primeira dimensão (NEPHGE) consiste em uma focalização isoelétrica em gradiente de pH não equilibrado, em gel tubular de poliacrilamida a 3,5%, com gradiente de pH 2-10. Em cada gel tubular foi aplicada a quantidade de 100 mg de proteína, utilizando citocromo C como marcador da frente de corrida. A fonte utilizada foi EPS 3501,<sup>1</sup> com voltagem máxima de 800V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por tubo. Após a corrida, que teve a duração de 90 minutos, os tubos contendo os géis eram retirados da cuba de primeira dimensão, identificados e mantidos em -20°C até serem transferidos para a segunda dimensão. Esta consistiu de uma eletroforese em placas de gel (SDS-PAGE), onde as proteínas, previamente separadas na primeira dimensão, migraram conforme seu peso molecular. Para observação das proteínas de baixo peso molecular foi utilizada a concentração de 15% de poliacrilamida no gel de separação e de 4,5% para o gel de entrada. Para a marcação dos pesos moleculares foi utilizado o padrão Sigma M3913 de pesos moleculares entre 6,5 a 66 kDa.

Os géis de primeira dimensão foram descongelados e mantidos por 15 minutos sob agitação suave, em solução de equilíbrio (Tris 25 mM; glicina 190mM; SDS 2%, b-mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol) e após, de dois em dois, eram colocados horizontalmente sobre o gel de entrada, nas placas de SDS-PAGE, com as extremidades ácidas voltadas para dentro da placa, sendo após fixados com agarose 0,5%, contendo 1% de b-mercaptoetanol. A parte superior da cuba foi preenchida com tampão superior (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%- pH 8,8) e a inferior com tampão Tris -HCl 50 mM, pH 8,0. A corrida iniciava com a voltagem máxima fixada de 125V, corrente de 20 mA/placa, utilizando-se a fonte EPS 301<sup>2</sup> e era interrompida quando a frente de azul de bromofenol chegava a 3cm do final do gel.

<sup>1</sup>Amersham Pharmacia

<sup>2</sup> Amersham Pharmacia Biotech

Os géis foram corados em solução de Azul de Comassie (Comassie Brilliant Blue 250-R 0,15%; ácido acético 7%; metanol 53%) por aproximadamente 18 horas. A descoloração foi realizada durante cerca de quatro horas, em solução fixadora (ácido acético 7% e metanol 53%), sob agitação, com substituição da solução a cada hora. Ao término desta etapa, a solução de fixação foi substituída pela solução de secagem, composta de glicerol 1% e metanol 50%. Os géis foram mantidos nesta solução por duas horas sob agitação e, a seguir, colocados para secar entre duas folhas de papel celofane, sobre uma placa de vidro.

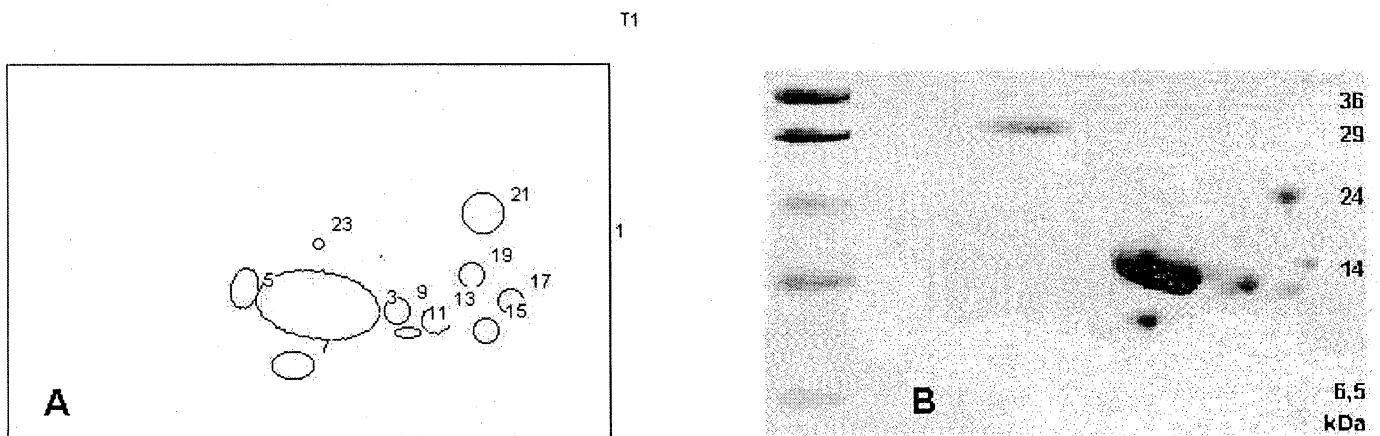
Depois de secos, os géis foram identificados, escaneados<sup>3</sup> e, a seguir, analisados através do programa *OptiQuant Acquisition & Analysis*,<sup>4</sup> para determinação, em pixels, da densidade óptica das bandas protéicas. A densidade óptica das bandas protéicas foi expressa em percentagem relativa, isto é, o total de proteínas de uma área definida e constante para todos os géis, representou 100% e a cada banda correspondeu um percentual desse total. Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi verificada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no plasma seminal bovino. A confirmação da identidade sugerida para as proteínas caracterizadas nesta pesquisa deve ser realizada ou pelo seqüenciamento, ou pelo uso de anticorpos específicos, se disponíveis.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, em um fatorial hierárquico, sendo considerado um dos fatores a espécie, e outro fator, os touros dentro da espécie. Os logaritmos das percentagens relativas das bandas protéicas foram comparadas entre as espécies por análise de variância (teste F). Para verificação da amplitude de variação das bandas protéicas, foi utilizado o coeficiente de variação. Como teste complementar foi utilizado o teste de Tukey, usando-se o nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS.<sup>5</sup>

## Resultados e discussão

Os valores observados na dosagem de proteína total situam-se dentro dos valores citados por Moustafa e Mézáros (1980), Pangawkar et al. (1988), Nauc e Manjunath (2000), diferindo do referido por Roncoletta (1999), que encontrou variações significativas na concentração de proteínas totais: em zebuínos (70,80 mg/ml  $\pm$  9,56) e taurinos (57,30  $\pm$  11,76) de alta congelabilidade do sêmen. Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato de o referido autor ter realizado a coleta das amostras em vários períodos durante o ano, o que poderia ter evidenciado flutuações na concentração protéica do plasma seminal.

Nos géis bidimensionais, foram analisadas 11 bandas protéicas, identificadas através de numeração ímpar, de 3 a 23, conforme verificado na Figura 1.



**Figura 1:** Representação esquemática das bandas protéicas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino e gel contendo os marcadores de pesos moleculares. Em A: representação esquemática das bandas protéicas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino. A numeração indica as bandas descritas na Tabela 1. Em B: proteínas do gel SDS-PAGE a 15%, visualizadas por Azul de Comassie, contendo, à esquerda, os marcadores de peso molecular e, à direita, os respectivos pesos.

Na Tabela 1 estão expressos os valores do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI) aproximados, freqüência relativa e absoluta das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal de sete reprodutores taurinos e de sete zebuínos. Conforme se verifica na Tabela 1, as bandas avaliadas não apresentaram a mesma freqüência de aparecimento nas espécies, conforme referido por Martins Júnior et al. 1995 e

Roncoletta (1999). Em reprodutores taurinos, com exceção das bandas 13 e 19, presentes nas amostras de 28,60% (2/7) dos reprodutores, as demais proteínas foram detectadas nas amostras de plasma seminal de 100% dos animais. Em zebuínos, as proteínas 11, 19 e 23 foram detectadas nas amostras de 71% dos reprodutores (5/7), a banda 13 em 57% (4/7) e as demais bandas estiveram presentes nas amostras de 100% dos animais.

<sup>3</sup> Scan Jet 6100-HP

<sup>4</sup> Versão 02.00 Packard Instruments

<sup>5</sup> Statistical Analysis System

**Tabela 1:** Peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, frequência relativa e absoluta das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal de sete reprodutores taurinos e de sete zebuínos

Banda Protéica	Peso molecular kDa	pI	Taurinos		Zebuínos	
			Frequência absoluta	%	Frequência absoluta	%
3	15 - 16	4,7 - 5,2	7/7	100,00	7/7	100,00
5	16 - 17	4,1 - 4,8	7/7	100,00	7/7	100,00
7	11 - 12	4,8 - 4,9	7/7	100,00	7/7	100,00
9	14 - 15	5,5 - 6,0	7/7	100,00	7/7	100,00
11	13 - 14	6,0 - 6,5	7/7	100,00	5/7	71,00
13	14 - 15	6,5 - 7,0	2/7	28,60	4/7	57,00
15	11 - 12	7,5 - 8,0	7/7	100,00	7/7	100,00
17	15 - 16	8,0 - 8,5	7/7	100,00	7/7	100,00
19	16 - 18	7,0 - 7,5	2/7	28,60	5/7	71,00
21	20 - 24	7,2 - 7,5	7/7	100,00	7/7	100,00
23	18 - 20	4,8 - 5,2	7/7	100,00	5/7	71,00

Na Tabela 2 estão expressos média, desvio-padrão e coeficiente de variação das densidades ópticas observadas nas bandas protéicas de baixo peso molecular avaliadas nas amostras de plasma seminal de sete reprodutores taurinos e sete zebuínos e valores de p (valores da probabilidade do teste de comparação) entre os reprodutores e entre as espécies.

**Tabela 2:** Peso molecular, média, desvio-padrão e coeficiente de variação das densidades ópticas relativas das bandas protéicas de baixo peso molecular analisadas nas amostras de plasma seminal de sete reprodutores taurinos e sete zebuínos e valores de p entre os reprodutores e entre as espécies

Banda Protéica	Taurinos				Zebuínos				p**
	Média	Desvio	p*	CV(%)	Média	Desvio	p*	CV	
3	14,79	3,45	0,81	23,3	16,70	5,86	0,02	3,51	0,89
5	1,34	0,36	0,35	26,9	1,99	0,74	0,01	37,2	0,02
7	2,66	0,43	0,23	16,2	1,82	0,61	0,01	33,5	0,02
9	0,92	0,34	0,07	37,0	1,52	1,50	0,03	98,8	0,15
11	1,39	0,54	0,02	38,8	1,20	0,19	0,00	69,2	0,41
13	0,15	0,30	0,00	200,0	0,55	0,82	0,01	149,5	0,24
15	0,55	0,08	0,02	14,5	0,68	0,09	0,10	13,1	0,00
17	0,59	0,02	0,00	32,2	0,79	0,29	0,00	115,3	0,11
19	0,16	0,25	0,00	156,3	0,41	0,29	0,00	73,8	0,07
21	2,00	0,33	0,00	16,5	2,27	0,40	0,01	17,8	0,04
23	0,54	0,14	0,00	25,9	0,30	0,25	0,00	85,2	0,04

\*Valor da probabilidade do teste de comparação entre touros

\*\*Valor da probabilidade do teste de comparação entre espécies

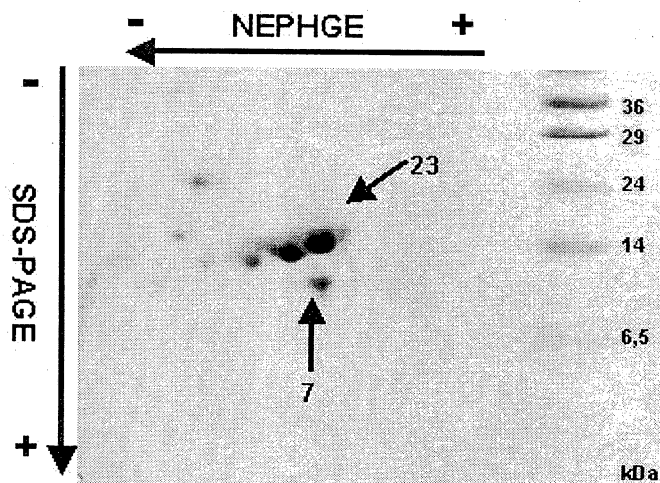
Em ambas as espécies, a banda protéica 3 foi a que apresentou maior percentual de densidade óptica, com valores de 14,79% nas amostras de taurinos e de 16,70%, nas de

zebuínos. Em taurinos, as bandas 15, 7, 21 e 3 apresentaram os menores coeficientes de variação. As bandas protéicas 3, 5, 7 e 9 não apresentaram variações entre os reprodutores e as demais diferiram significativamente entre eles.

Na maioria das proteínas avaliadas, os maiores coeficientes de variação ocorreram na espécie zebuína. Nesta espécie, as bandas de menor coeficiente de variação foram as bandas 15 e 21, e apenas a banda protéica 15 não apresentou diferença significativa entre os touros. Tanto em reprodutores taurinos, quanto em zebuínos, o menor coeficiente de variação foi observado na banda 15 e o maior na banda 13.

A maior uniformidade de aparecimento, bem como menores coeficientes de variação e menor variação individual das bandas protéicas, verificadas nas amostras de taurinos, está de acordo com descrito por Roncoletta (1999), que afirmou que o perfil protéico mais homogêneo dos taurinos se deveria à seleção genética a que a espécie vem sendo submetida ao longo do tempo.

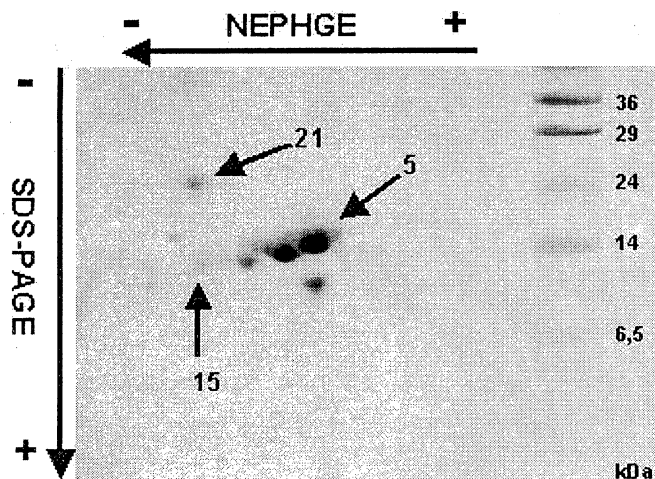
As densidades ópticas das bandas protéicas 5, 7, 21 e 23 diferiram estatisticamente entre as espécies. Os reprodutores taurinos apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) nas bandas protéicas 7 e 23, e os zebuínos, nas bandas 5, 15 e 21. As Figuras 2 e 3 apresentam as bandas protéicas que diferiram significativamente entre as espécies.



**Figura 2:** Proteínas do plasma seminal bovino que apresentaram densidades ópticas superiores ( $p < 0,05$ ) nas amostras de plasma seminal de reprodutores taurinos.

Gel SDS-PAGE a 15%, corado por Azul de Comassie. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE), na primeira dimensão. Os marcadores de peso molecular e os respectivos pesos estão colocados à direita. As setas indicam as bandas protéicas com densidades ópticas superiores em taurinos.

A banda 7 apresentou densidade óptica significativamente superior nas amostras de plasma seminal dos reprodutores taurinos, e foi evidenciada em 100% das amostras de ambas as espécies. A ausência de variação significativa entre as amostras dos taurinos indica haver uma uniformidade em sua expressão entre os reprodutores desta espécie. Entretanto, ocorreu variação significativa em sua concentração, nas amostras dos zebuínos. Pelo peso molecular e pI, esta proteína pode ser identificada como aSFP, secretada pelas



**Figura 3:** Proteínas do plasma seminal bovino, que apresentaram densidades ópticas superiores nas amostras de plasma seminal de reprodutores zebuínos.

Gel de SDS-PAGE a 15%, corado por Azul de Comassie. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado, na primeira dimensão. Os marcadores de peso molecular e os respectivos pesos estão colocados à direita. As setas indicam as bandas protéicas com densidades ópticas superiores em zebuínos.

vesículas seminais, ampolas e epidídimo bovinos (Einspanier et al., 1991; Wempe et al., 1992). Teria função de proteger a membrana espermática de processos oxidativos por reduzir a peroxidação lipídica (Schönček et al., 1993, 1996). Analisando as proteínas do plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos de alta e baixa congelabilidade do sêmen, Jobim et al. (2001) verificaram que esta banda protéica foi significativamente superior nas amostras de plasma seminal de touros de alta congelabilidade do sêmen, independentemente da espécie a que pertenciam. No presente estudo, foram avaliadas somente amostras de reprodutores de alta congelabilidade do sêmen e a referida banda protéica apresentou densidade óptica superior nas amostras de plasma seminal da espécie taurina.

A banda 23 apresentou variação individual significativa tanto em taurinos quanto em zebuínos; entretanto, nos primeiros, apresentou menor variabilidade. Pela localização nos géis pode-se considerá-la como sendo a glicoproteína clusterina de cadeia alfa, que possui sítios de ligação à heparina (Pankhurst et al., 1998), identificada no plasma seminal e espermatozóide de vários mamíferos, bem como em humanos (Atlas-White et al., 2000; Howes et al., 1998), estando envolvida na maturação espermática (Sylvester et al., 1991). Jobim et al. (2001) verificaram concentrações superiores desta proteína no plasma seminal de touros de alta congelabilidade de sêmen, indicando estar relacionada com a congelabilidade do sêmen.

As bandas 5, 15 e 21, detectadas nas amostras de 100% dos reprodutores avaliados, apresentaram densidades ópticas significativamente superiores nas amostras dos touros zebuínos. Por sua localização nos géis, a banda 5 poderia ser um fragmento da BSP A3 (15 kDa, pI 4,8-5,2), conforme referido por Manjunath et al., (1987) e Desnoyers et al. (1994), proteína relacionada com a capacitação espermática. Entretanto, também se assemelha à posição da proteína de 16

kDa, citada por Killian et al., (1993) como um dos marcadores encontrados no plasma seminal de reprodutores de baixa fertilidade. A mesma observação foi realizada por Frazer et al., (1996), ao analisar géis bidimensionais das proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino.

A banda protéica 15 apresentou coeficiente de variação em torno de 14% em ambas as espécies, o que possibilita indicá-la como um parâmetro de diferença entre reprodutores europeus e zebuínos. Em taurinos, apresentou variação significativa entre as amostras dos reprodutores e foi a única banda que não diferiu estatisticamente entre os zebuínos. Pelo peso molecular e pI, esta banda deve ser a B2 microglobulina (12 kDa, pI 8,24), proteína necessária para o processamento e expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I, embora não participe de seu sítio antigênico (Fraga e Neuman, 1996).

Embora tenha diferido estatisticamente entre os reprodutores, nas duas espécies, a proteína 21 apresentou baixo coeficiente de variabilidade, tanto em reprodutores taurinos quanto em zebuínos. Por sua localização nos géis, pode-se supor que seja a proteína denominada P6 (20kDa), uma das principais proteínas básicas do plasma seminal bovino, considerada por Wempe et al. (1991) como idêntica à MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein -1) bovina. Em doenças inflamatórias e aterosclerose em humanos, MCP-1 faz a mediação de monócitos para os tecidos (Proost et al., 1996).

As bandas 3 e 11, pelo peso molecular e pI devem tratar-se da proteína BSP A1/A2, também denominada PDC109, principal proteína do plasma seminal bovino de ligação à heparina, que media a capacitação espermática pelo efluxo do colesterol e fosfolípidos (Desnoyer et al., 1994; Manjunath et al., 1987; Thérien et al., 1999). As BSPs apresentam heterogeneidade de carga e são representadas por um grupo de bandas com mesmo peso molecular, mas distribuídas em pontos isoelétricos diferentes (Desnoyer et al., 1994; Frazer et al., 1996). As bandas 5, 3 e 11 deste estudo podem ser consideradas como as BSPs. As amostras dos reprodutores taurinos diferiram significativamente na banda 11, mas nas demais não foram evidenciadas variações individuais, semelhante ao observado no plasma seminal de taurinos por Frazer et al. (1996). Na espécie zebuína, entretanto, estas bandas diferiram significativamente entre os touros, indicando maior variabilidade do perfil protéico, quando comparado ao da espécie taurina, conforme já referido por Roncoletta (1999).

As bandas protéicas 9, 13, 17 e 19 não diferiram significativamente entre as espécies, e, com exceção das bandas 9 e 17, em taurinos, apresentaram elevados coeficientes de variação, indicando ocorrência de grande variabilidade entre os reprodutores. Pela posição nos géis, de acordo com o peso molecular e pI, a banda 9 deve tratar-se da espermedesina Z13 (Tedeschi et al., 2000). A banda 13 foi a que apresentou o maior coeficiente de variação em ambas as espécies, e, por sua posição nos géis, pode-se supor que seja a EPV 20, glicoproteína expressa na glândula mamária, rim, baço, fígado (Larsen et al., 1997) e plasma seminal bovinos (Mortarino et al., 1998). A banda 17 pode corresponder a ribonuclease seminal bovina (BSRNase), considerada uma das principais proteínas básicas do plasma seminal bovino (Scheit, 1986). Por sua localização nos géis, a banda 19 deve corresponder

a TIMPII (16-21 kDa, pl 6,9), da família de inibidores de metaloproteinases, identificada no plasma seminal bovino por Calvette et al. (1996) e Mortarino et al. (1998).

### Conclusões

O perfil protéico do plasma seminal apresentou marcada variação na frequência de apresentação das bandas protéicas estudadas, tanto entre as espécies, quanto entre os touros, embora tenham sido analisadas apenas amostras de reprodutores com índices superiores a 90% de ejaculados viáveis pós-descongelamento do sêmen.

Na espécie taurina, foi observado um perfil protéico mais homogêneo e com menores variações individuais do que o verifi-

cado em zebuínos, e maior expressão protéica de bandas relacionadas com fertilidade e congelabilidade de sêmen (bandas 7 e 23). Em zebuínos, as bandas com densidades ópticas superiores (21, 15 e 5) estão relacionadas com a mediação de monócitos aos tecidos e com a participação em estruturas protéicas relacionada com processos imunes (bandas 21 e 15), o que poderia determinar maior aporte de células de defesa ao plasma seminal e, provavelmente, aos genitais da fêmea. No que se refere à banda 5, sua localização é compatível com proteínas relacionadas tanto com a capacitação espermática, quanto a baixos índices de fertilidade. Deve-se considerar ainda que as variações observadas neste estudo podem também refletir padrões específicos de cada espécie.

### Referências

- ATLAS-WHITE, M.; MURPHY, B. F.; BAKER, H. W. Localisation of clusterin in normal human sperm by immunogold electron microscopy. *Pathol.*, v. 32, n. 4, p. 258-261, 2000.
- AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. *J. Androl.*, v. 12, n. 3, 1991.
- BACCETI, B.; BURRINI, A. G.; MAVER, A.; PALLINI, V.; RENIERI, T. "9+10" Immobile spermatozoa in an infertile man. *Androl.*, v. 11, n. 6, p. 437-443, 1979.
- CALVETE, J.J.; VARELA, P.F.; SANZ, L.; ROMERO, A.; MANN, K.; TÖPFER-PETERSEN, E. A procedure for the large-scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. *Prot. Expts. Purif.*, n. 8, p. 48-56, 1996.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. - Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49 p.
- DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Reprod and Develop.*, v. 37, p. 425-435, 1994.
- EINSPANIER, R.; WEMPE, F.; SCHEIT, K. H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem-Biophys-Res-Comm.*, v.179, p.1006-1010, 1991.
- FLOWERS, W. L. Boar fertility and artificial insemination. In: IPVS CONGRESS, 15, 1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham: [s.n.], 1998. p. 45-52.
- FRAGA, R. S.; NEUMANN, J. O complexo principal da histocompatibilidade. In: SCROFERNECKER, M. L. *Notas de Imunologia*. Porto Alegre: Editora da Universidade, 200 p., cap. 7, p. 107-109, 1996.
- FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M.; BROOKS, C.L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after conservation in half-millimeter straws. *Theriog.*, v. 46, n. 7, p. 1103-1115, 1996.
- HOWES, E. A.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, n. 4, v. 7, p.673-681, 1998.
- JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D.; WALD, V.B.; MATTOS, R. C. Relação do perfil das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade de touros doadores de sêmen, através de SDS-PAGE bidimensional. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*. Enviado para publicação.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bulls seminal plasma. *Biol. Reprod.*, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- LARSEN, L. B.; RAVN, P.; BOISEN, A.; BERGLUND, L.; PETERSEN, T.E. Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain. *Eur. J. Biochem.* v. 15, n. 243, p. 437-441, 1997.
- LARSON, B. L.; SALISBURY, G. W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretic studies. *J. Biol. Chem.*, v. 206, n. 2, p. 741-749, 1954.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, W. J.; FARREL A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci. Rep.*, v. 7, n. 3, p. 231-238, 1987.
- MARTINS JÚNIOR, A.; RAMOS, P. R. R.; SILVA, R. L. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de touros de origem européia e zebuína In: CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. *Anais*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 272.
- MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A.; CECILIANI, F.; GOTTARDI, L.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal proteins. *Electroph.*, v.19, p. 797-801, 1998.
- MOUSTAFA, A. R.; MÉZÁROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing- and - thawing. *Acta Vet. Acad. Scient. Hungar.*, v. 28, n. 4, p. 403-408, 1980.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.*, v. 63, p. 1058-1066, 2000.
- O'FARREL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARREL, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, v. 12, p.1133-1142, 1977.
- PANGAWAKAR, G. R.; SHARMA, R. D.; SINGH, R. Protein, sialic acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freeability of semen. *Ind. Vet. J.*, v. 65, p. 58-60, 1988.
- PANKHURST, J. G.; BENNET, C. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. *Biochem.*, v. 7, n. 14, p. 4823-4830, 1998.
- PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J. Leukoc. Biol.*, n. 59, v.1, p. 67-74, 1996.
- ROCHA, M. C.; GARCIA, O. S.; FERREIRA NETO, J. M.; SCOHNS, J. A. B. Proteína total e seu fracionamento eletroforético em plasma seminal de touros zebús normais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 26, n. 1, p. 69-75, 1974.
- RODKNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of the experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *J. Neurosci. Meth.*, n. 24, p. 27-48, 1988.

- RONCOLETTA, M.; FRANCHESCHINI, P. H.; de LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. *Ars Vet.*, v. 13, n. 2, p. 135-140, 1997.
- RONCOLETTA, M. *Perfil em SDS-PAGE das proteínas de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade de sêmen de touros*. 1999. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SCHEIT, K. H.; ZIMMER, M.; RAO, N. S.; PRASAD, K. S. N.; BHAGARVA, P. M. Antibacterial activity of seminalplasmin, a basic protein from bovine seminal plasma. *Microbios*, n. 45, p. 105-112, 1986.
- SCHÖNECK, C.; EINSPANIER, R. SCHALLENGER, E.; SCHAMS, D. Effects of the bovine seminal protein aSPF: protection of spermatozoa and rapid uptake by female mucosa. *J. Reprod. Fert.* (Abstract series), 12, 21, 1993.
- SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriog.*, v. 45, p. 633-642, 1996.
- SYLVESTER, C.; MORALES, R.; OKO, R.; GRISWOLD, M. D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 195-207, 1991.
- TEDESCHI, G.; OUNGRE, E.; MORTARINO, M.; NEGRI, A.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.*, n. 267, p. 6174-6179, 2000.
- THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, v. 59, p. 768-776, 1999.
- WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 183, n. 1, p. 232-237, 1992.
- WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDEL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. *Theriogen.*, v. 40, p. 1083-1091, 1993.