

## PERFIL PROTÉICO DO SÊMEN E FERTILIDADE DE TOUROS DA RAÇA GIR

### RESUMO GERAL

FOLHADELLA, I.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. [Semen protein profile and fertility in Gyr bulls]. 2008. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Estudou-se o perfil de proteínas totais e proteínas ligadoras de heparina do sêmen de quinze touros da raça Gir, a fim de associá-las com as características andrológicas e potencial de fertilidade *in vitro*. Verificaram-se ainda possíveis associações entre parâmetros andrológicos, espermáticos e de fertilização *in vitro* em nove touros dessa mesma raça. Realizou-se inicialmente o exame andrológico nos animais e classificação andrológica por pontos (CAP), e em seguida avaliou-se pela cromatografia por gel filtração o perfil de proteínas totais do sêmen e por cromatografia líquida de rápida performance (FPLC), em colunas de afinidade à heparina, os perfil de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e membrana espermática. Os picos de proteínas ligadoras de heparina do sêmen foram submetidos à eletroforese para a identificação dos respectivos pesos moleculares. As concentrações das proteínas foram identificadas de acordo com LOWRY (1951) e a fertilização *in vitro* foi realizada com fases de maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário. As proteínas foram então associadas com parâmetros andrológicos *in vivo* de circunferência escrotal, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos totais e classificação andrológica por pontos (CAP), e com a fertilidade *in vitro* pelas taxas de clivagem e produção de blastocistos. Em seguida os dados dos parâmetros andrológicos foram associados com a fertilidade *in vitro*. A concentração de proteínas totais do plasma seminal variou de 4,1 a 167,9 mg/ml, com média de  $47,1 \pm 48,5$  mg/ml, mostrando grande variabilidade entre touros. O perfil cromatográfico das proteínas totais do plasma seminal apresentou oito diferentes picos em 100% dos touros e nove picos em 86%. As proteínas ligadoras de heparina apresentaram cinco picos de afinidade em 87,5% dos touros e três picos em 100%. As maiores associações observadas ( $p < 0,05$ ) foram entre as proteínas totais (PLB) X taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 1 (P1A) X taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) X taxa de clivagem e proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) X taxa de blastocistos, as quais apresentaram alta magnitude de associação ( $> 0,66$ ). Das proteínas estudadas, nenhuma apresentou associação com os parâmetros andrológicos. Já para a característica motilidade, estudada *in vivo*, as regressões foram significativas ( $p < 0,10$ ) entre motilidade X taxa de clivagem e motilidade X taxa de blastocisto, porém de média magnitude. Como poucos parâmetros andrológicos avaliados neste experimento possuíram associações significativas entre si, não foi possível estabelecer um método eficiente para predição da fertilidade *in vitro* baseado nos parâmetros andrológicos.

**Palavras Chave:** Cromatografia, eletroforese, fertilização *in vitro* e parâmetros andrológicos

## SEMEN PROTEIN PROFILE AND FERTILITY IN GYR BULLS

### ABSTRACT

FOLHADELLA, I.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir.** [Semen protein profile and fertility in Gyr bulls]. 2008. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

It was studied semen total protein and heparin binding protein profile of 15 Gyr bulls and its association with andrological characteristics and *in vitro* fertility potential. It was verified yet associations among andrological, spermatic and *in vitro* fertility parameters of nine Gyr bulls. First, animals were submitted to breeding soundness evaluation and andrological classification by points (ACP) followed by evaluation of total protein profile with gel filtration chromatography and heparin binding protein of sperm membrane and seminal plasma by Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) with heparin affinity column. Each peak of heparin binding protein of semen was submitted to eletrophoresis to identify molecular weight. Protein concentrations identified by LOWRY (1951) and *in vitro* fertilization was made with oocyte maturation, fertilization and embryo culture. Proteins were associated with *in vivo* andrological parameters of scrotal circumference, motility, vigor, major and total defects and ACP, and with *in vitro* fertility by cleavage and blastocyst rates. Andrological parameters dates were associated also with *in vitro* fertility. Total protein concentration of seminal plasma ranged from 4.1 to 167.9 mg/ml, with mean of  $47.1 \pm 48.5$  mg/ml, with great variability among bulls. Chromatographic profile of total seminal plasma proteins presented 8 different peaks in 100% and 9 peaks in 86% of bulls. Heparin binding proteins presented 5 affinity peaks in 87,5% and 3 peaks in 100% of bulls. Greater associations were observed for: total proteins (PLB) X blastocysts rate, peak 1 heparin binding proteins(P1A) X blastocysts rate, peak 5 heparin binding protein (P5A) X cleavage rate and peak 5 heparin binding protein (P5A) X blastocysts rate, and all of them with high magnitude association ( $>0,66$ ). However none of the proteins showed association with andrological parameters. To the characteristic *in vivo* motility, regressions were significant ( $p<0,10$ ) among motility X cleavage and motility X blastocyst rates, although with mean magnitude. However few andrological parameters had been significant association, it was not possible establish an efficient method for *in vitro* fertility prediction based on andrological parameters.

**Key Words:** Andrological parameters, chromatography, eletrophoresis and *in vitro* fertilization

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo (180 milhões de animais) (ANUALPEC, 2002), a maioria sendo de *Bos taurus indicus* e seus cruzamentos, que representam 80% ou mais do efetivo nacional. A raça Gir é importante neste contexto, por ser uma das principais raças zebuínas explorada para leite e muito utilizada em cruzamentos com os animais europeus.

Pouco se sabe a respeito do comportamento reprodutivo dos touros zebuínos nas condições de campo e de laboratório, havendo relatos de serem mais lentos na procura das fêmeas em cio, terem maturidade sexual mais tardia e responder de forma negativa ao congelamento de sêmen, quando comparados aos animais de raças européias. Sabe-se contudo que a maioria das características ligadas à reprodução nessas raças apresenta relativa herdabilidade, o que torna de extrema importância o uso de animais andrológicamente superiores para acelerar o ganho genético de todo o rebanho.

O método de avaliação da fertilidade de touros, ainda hoje, é feito pelo exame andrológico. Associado a esse exame e usando-se o índice denominado Classificação Andrológica por Pontos (CAP) (VALE FILHO, 1989), pode-se classificar os animais quanto ao seu potencial reprodutivo em: satisfatório, questionável e insatisfatório. Entretanto, a avaliação andrológica identifica subjetivamente a performance dos animais, e não permite um real conhecimento das substâncias químicas envolvidas no processo de interação do espermatozóide com o ovócito (BRAUNDMEIER; MILLER, 2001).

A interação ovócito-espermatozóide envolve além de substâncias do trato

reprodutor feminino, o sêmen e suas moléculas. O sêmen, que é constituído por fluido secretado pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, e no qual os espermatozóides estão em suspensão, atua como veículo para conduzir os espermatozóides do trato reprodutivo masculino para o feminino. Esse fluido complexo contém diversos polipeptídeos que seguramente exercem importante papel na capacidade fecundante e, é considerado indispensável para a manutenção e sobrevivência espermática.

Um grande número de pesquisas relaciona o peso molecular de alguns polipeptídeos seminais com a fertilidade dos machos, no que diz respeito aos eventos de capacitação, movimentação espermática e congelamento do sêmen. A identificação e mapeamento dessas moléculas solúveis do ejaculado são realizadas por técnicas como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a eletroforese. Sendo a eletroforese a técnica que vem sendo utilizada desde a década de 50, por seu baixo custo, rapidez da caracterização e comparação de proteínas e relativa facilidade.

Outra técnica empregada no estudo do potencial de interação dos espermatozóides com os oócitos é a Fertilização *in vitro* (FIV). Diversos centros de pesquisa realizam a FIV em bovinos por ser uma técnica mais rápida do que a gestação propriamente dita.

Contudo, quando um desses testes é utilizado isolado, não fornece resultados consistentes para a seleção de touros mais férteis a campo, ou na utilização do seu sêmen no laboratório. O método ideal para a seleção de reprodutores superiores deve basear-se no perfil protéico do sêmen, sua relação com as características andrológicas e de fecundação *in vitro*, além, é claro, de sua habilidade em produzir crias saudáveis.

## OBJETIVOS

→GERAL:

Avaliação do perfil protéico do sêmen de touros da raça Gir e sua aplicação como indicador da fertilidade.

→ESPECÍFICOS:

Isolar, purificar, identificar e quantificar as proteínas ligadoras da heparina encontradas no plasma seminal e membrana espermática de touros da raça Gir.

Correlacionar as proteínas com os parâmetros andrológicos *in vivo*, pelos exame andrológico e Classificação Andrológica por Pontos (CAP).

Associar as proteínas com a fertilidade *in vitro* pela fecundação *in vitro*.

Associar os parâmetros andrológicos *in vivo* e de fertilidade *in vitro* em touros da raça Gir.

## REVISÃO DE LITERATURA

O gado doméstico não é uma espécie altamente fértil; suas chances de gestação por serviço em monta natural não são maiores que 50–60% (PARKINSON *et al.*, 2004). Em essência, o potencial de fertilidade de um touro pode ser considerado pela sua habilidade de cobrição e de fertilização. Avaliações a campo podem demonstrar a habilidade de cobrição, por testes de libido ou capacidade de serviço, intromissão e ejaculação. Avaliações também podem ser feitos pela qualidade do sêmen produzido (PARKINSON *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um teste de fertilidade para ser aplicado em condições de campo e de laboratório, que defina o potencial reprodutivo de touros de diferentes idades e raças tem sido a meta de muitos pesquisadores da área de reprodução animal.

### 1. Exame andrológico

O exame andrológico é a técnica mais utilizada pelos médicos veterinários no diagnóstico do potencial reprodutivo de touros, contudo, esse método de avaliação de fertilidade a campo ainda é limitado (KENNEDY *et al.*, 2002). Nesse exame as avaliações físicas de peso corporal, circunferência escrotal, algumas mensurações testiculares e avaliação das glândulas vesiculares são coadjuvadas com avaliações laboratoriais de motilidade, vigor e morfologia do sêmen (VALE FILHO *et al.*, 1997; FITZPATRICK *et al.*, 2002; SALVADOR *et al.*, 2002).

#### 1.1. Avaliações físicas

Durante a realização do exame andrológico é de extrema importância a medida da circunferência escrotal. O tamanho dos testículos está diretamente relacionado com a capacidade de produção espermática e existe correlação genética positiva entre a circunferência escrotal de touros ainda jovens e sua fertilidade. Touros com testículos mais desenvolvidos apresentam maior volume e maior concentração espermáticos no ejaculado, podendo servir a maior número de fêmeas ou produzir maior número de doses de sêmen, quando em rotina de coleta e congelamento de sêmen. Esta circunferência correlaciona-se ainda com a idade dos touros à puberdade (BRUNER *et al.*, 1995; HIGDON *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2002; VALENTIM *et al.*, 2002) e é um bom parâmetro na determinação do estado patológico dos testículos. Touros com testículos menores apresentam alta prevalência de lesões nos túbulos seminíferos e qualidade seminal

diminuída (MADRID *et al.*, 1998; BARTH; WALDNER, 2002).

Contudo essa medida de circunferência escrotal não deve ser avaliada sozinha, pois 31% dos touros com valores maiores ou iguais aos recomendados para a essa avaliação tiveram potencial de fertilidade insatisfatório (MC GOWAN *et al.*, 2002). Esta medida é essencial, e deve ser coadjuvada com medidas de motilidade, vigor e morfologia espermática, sob o risco de possíveis erros na avaliação de touros.

## 1.2. Avaliações laboratoriais

Na seleção de reprodutores, além das características zootécnicas fenotípicas, tais como peso corporal (numa determinada idade), desenvolvimento ponderal, qualidade de carcaça e tipo racial, deve-se dar ênfase à saúde reprodutiva dos animais, com avaliações clínicas que mostrem a normalidade dos órgãos reprodutivos e se há habilidade sexual, pela capacidade quantitativa e qualitativa da produção de espermatozoides aptos à fertilização (CORRÊA *et al.*, 2006). Várias são as avaliações laboratoriais feitas nos espermatozoides e correlacionadas com a fertilidade, tais como: motilidade, vigor e morfologia espermáticos (LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; MULLER, 2000).

A motilidade é um teste muito utilizado, por ser simples e de rápida execução (FOOTE, 2003), e está diretamente ligada à condição de manejo (CHÁCON *et al.*, 2002), já que touros *Bos taurus indicus* de 12 a 24 meses de idade, adequadamente alimentados, apresentam espermatozoides no ejaculado, com motilidade de 5 a 10% (VALE FILHO, 2001a).

Outro importante indicador da fertilidade é o teste de morfologia espermática (SAACKE *et al.*, 2000), que deve ser usado como rotina (FITZPATRICK *et al.*, 2002), pois animais

que apresentam disfunções físicas, terão reflexos nesta morfologia (FOOTE, 2003).

## 1.3. Classificação dos touros quanto à aptidão reprodutiva

O índice de Classificação Andrológica por Pontos – CAP (VALE FILHO, 1989) tem sido usado de forma eficiente para raças zebuínas, a partir de dois anos de idade (VALE FILHO, 2001b). Nesse índice pontuam-se as características com maior correlação com a fertilidade, que são a motilidade, a circunferência escrotal e a morfologia espermática. A pontuação máxima obtida pelo animal é de 100 pontos, onde 20 pontos são atribuídos à motilidade, 40 à morfologia e 40 à circunferência escrotal (VALE FILHO, 1989). Touros clinicamente normais considerados aptos a reprodução devem apresentar mínimo de 60 pontos nesse índice. Os touros com problemas clínicos são inaptos para a reprodução e não devem ser submetidos ao CAP.

De modo geral touros *Bos taurus indicus* são classificados com menor frequência como insatisfatórios do que touros *Bos taurus taurus* (CHÁCON *et al.*, 1999).

## 2. Indicadores moleculares da fertilidade

O grau com que os componentes do plasma seminais afetam a fertilidade dos machos ainda é muito discutido (HENAULT *et al.*, 1995). Experimentos têm demonstrado aumento da motilidade de espermatozoides da cauda do epidídimo de touros após a incubação com fluidos das glândulas sexuais acessórias (INSKEEP *et al.*, 1985).

Em contrapartida, efeitos desfavoráveis do plasma seminal sobre os espermatozoides também já foram descritos (GRAHAM, 1994). A presença em alta concentração das proteínas de peso molecular entre 15-16KDa, aniônicas, demonstrou prejudicar a

motilidade (AL-SOMAI *et al.*, 1994a, 1994b). Proteínas como a seminalplasmina bovina inibem a capacitação espermática e a reação acrossômica, o que interfere negativamente na fertilização (SHIVAJI; BHARGAVA, 1987).

Existem ainda proteínas do plasma seminal bovino que influenciam a congelabilidade do sêmen, com alguns autores concordando ou discordando sobre a sua importância neste processo (RONCOLETTA *et al.*, 1997, JOBIM *et al.*, 2002). A concentração de proteínas totais apresentada no sêmen é uma importante característica para o congelamento e fertilidade de touros bubalinos (ARANGASAMY *et al.*, 2005). Em contrapartida alguns autores relatam que uma maior concentração de proteínas totais no sêmen reduz a motilidade pós-descongelamento, pois as proteínas promovem aumento na permeabilidade espermática, o que tornam os espermatozoides mais vulneráveis ao choque térmico e a injúria celular (JOBIM *et al.*, 2002).

## 2.1 . Proteínas de plasma seminal

O plasma seminal de touros de alta fertilidade aumenta a taxa de fusão de espermatozoides de touros de baixa fertilidade, assim como o plasma seminal de touros de baixa fertilidade, diminui a taxa de fusão de espermatozoides de touros de alta fertilidade, demonstrando que o plasma seminal apresenta fatores que interferem na fertilidade (MILLER, 2001).

Touros holandeses com fertilidade superior apresentam em seu plasma seminal duas proteínas (55 Kda, pI=4,8, 26KDa, pI= 6,4) mais prevalentes do que touros com baixa fertilidade. Também foi relatada a presença de duas proteínas (16 Kda, pI= 4,1, 16Kda, pI= 6,7) mais prevalentes em touros de baixa fertilidade (KILLIAN *et al.*, 1999). A proteína de 55KDa é 2,6 vezes mais concentrada em animais com alta fertilidade

(CANCEL *et al.*, 1997), enquanto que a de 26 Kda é 3,5 vezes mais concentrada (GERENA *et al.*, 1998) neste mesmo perfil andrológico.

O sequenciamento destas proteínas demonstrou que a proteína de 55 Kda é uma glicoproteína fosforilada altamente acidófila, 86% homóloga a osteopontina bovina (CANCEL *et al.*, 1997). Esta proteína já foi identificada nas células de Sertoli, epitélio seminífero, cauda do espermatozoide de ratos (SIITERI *et al.*, 1995), no fluido das vesículas seminais e fluido ampolar (KILLIAN *et al.*, 2004). A sua natureza ácida é atribuída à concentração de ácido aspártico e ácido glutâmico (FRANZEN; HEINEGARD, 1985).

A função da osteopontina no trato reprodutivo ainda não está bem definida. Alguns autores sugerem que esta proteína aumenta a capacidade de ligação com o cálcio, o que é importante para a fertilização. A relação da osteopontina com a fertilidade pode ainda ser indireta (CANCEL *et al.*, 1999), pela proteção da superfície epitelial das glândulas acessórias contra infecções bacterianas (BROWN *et al.*, 1992), e ainda modificando características da membrana do espermatozoide (CANCEL *et al.*, 1999). Existem ainda estudos demonstrando que a osteopontina e a albumina, em maior concentração no plasma seminal de touros, favorecem a congelabilidade do sêmen (JOBIM *et al.*, 2002). A albumina, presente no trato genital da fêmea promove o efluxo de colesterol e outros fosfolípidos de membrana que ocorre na capacitação (WU *et al.*, 2001). Conseqüentemente, no plasma seminal dos reprodutores com alta congelabilidade, participa de modificações na permeabilidade da membrana espermática (JOBIM *et al.*, 2002). Todos os animais com alta congelabilidade do sêmen, apresentam um polipeptídeo de 51,8 KDa, enquanto que 75% dos animais de baixa congelabilidade não o possuem (RONCOLLETTA *et al.*, 1997).

Já a proteína de 26KDa é 75% idêntica e 100% homóloga a uma prostaglandina D sintase tipo lipocalin (PDGS) isolada de cérebro de ratos e fluido cérebro espinhal humano (GERENA *et al.*, 1998). Essa proteína já foi detectada nos testículos, em células de Sertoli, nas espermatídes, no epidídimo, nos espermatozoides do lúmen, no epitélio apical (KILLIAN *et al.*, 1999), nas células de Leydig, fibroblastos, macrófagos entre outras fontes (GERENA *et al.*, 2000). O papel fisiológico das PGDS no trato reprodutor masculino não está bem claro. Há dados na literatura que sugerem sua associação com a fertilidade (GERENA *et al.*, 1998), como já citado anteriormente, e que sua baixa concentração no plasma seminal humano é sinal de oligospermia. A sua participação é encontrada ainda na barreira hemato-testicular, atuando como carreador protéico de membrana, assim como a ABP (androgen binding protein), a RBP (Retinoic binding protein) e as lactoglobulinas, sendo que estas duas últimas proteínas também fazem parte da superfamília das lipocalinas (ROMITTO *et al.*, 2003). Outra suposta função para as PGDS seria a de carreador lipofílico, pois se ligam ao ácido retinóico e à testosterona *in vitro* (FOUCHÉCOURT *et al.*, 2002), e isso facilitaria a espermatogênese (SKINER *et al.*, 1991).

A proteína de 16 Kda foi localizada ainda na vesícula seminal. Sugere-se, que essa proteína esteja presente em *Mycoplasmas*, determinando uma infecção nos animais de baixa fertilidade (KILLIAN *et al.*, 1999).

Outra importante proteína encontrada em grande quantidade no plasma seminal é a aSFP (Acid Seminal Plasma Fluid Protein) com peso molecular de 12,9KDa, secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo, mas não pelos testículos. Esta proteína tem demonstrado ser um bom marcador bioquímico para a alta fertilidade dos touros (RONCOLLETA, 2003), pois preserva a integridade de membrana, agindo

como um redutor da peroxidação lipídica da membrana do espermatozoide, regula a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a motilidade espermática (SCHONECK *et al.*, 1996).

McCAULEY *et al.* (2001) relataram ainda a presença no sêmen bovino, de uma proteína de 24 KDa que apresenta 90% de homogeneidade com a proteína inibidora das metaloproteinases 2 dos tecidos (TIMP2). Esses mesmos autores identificaram a presença de RNA mensageiro para esta proteína nas glândulas bulbouretrais, próstata e vesícula seminal. Sabe-se que as TIMPs regulam processos fisiológicos associados com a ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário, proliferação de vários tipos celulares (EDWARDS *et al.*, 1996) e produção de progesterona pelas células estereoidogênicas (BOUJRAD *et al.*, 1995), porém a sua função ainda não é muito bem definida.

### **2.1.1. Proteínas ligadoras da heparina**

A heparina é uma glicosaminoglicana que induz a capacitação em espermatozoides de touros e ratos (NASS *et al.*, 1990). Os espermatozoides de touros de alta fertilidade sofrem com maior frequência essa reação frente a materiais com heparina (LENZ *et al.*, 1988) e tem maior afinidade de ligação a essa proteína (MARK; AX, 1985) do que espermatozoides de touros menos férteis (BELLIN *et al.*, 1994).

Os espermatozoides do epidídimo não são capazes de serem capacitados pela heparina puramente, porém quando as proteínas ligadoras da heparina das glândulas acessórias são adicionadas, esses espermatozoides respondem à zona pelúcida e sofrem reação acrossômica (MILLER *et al.*, 1990).

As proteínas ligadoras da heparina são produzidas pelas glândulas sexuais acessórias dos machos e secretadas no fluido

seminal (NASS *et al.*, 1990). São mais abundantes na superfície do espermatozóide ejaculado, e menos no líquido, e constituem 28% das proteínas presentes no plasma seminal. Esse grupo é representado por proteínas, cujo peso molecular varia de 14 a 31 KDa (MILLER *et al.*, 1990).

As proteínas ligadoras de heparina presentes em maior quantidade no plasma seminal de bovinos são as chamadas de BSP (Bovine seminal plasma proteins) (CALVETTE *et al.*, 1996; MANJUNATH, 1987), e são produzidas pelas glândulas vesiculares. Entre as BSP têm-se a BSP A<sub>1</sub> (15-16KDa e pI: 4.7-5.0), BSP A<sub>2</sub> (15-16KDa, pI: 4.9-5.2), a BSP A<sub>3</sub> (15KDa, pI: 4.8-5.2) e a BSP 30KDa. Sendo as BSP A<sub>1</sub> e BSP A<sub>2</sub> a mesma proteína que a PDC 109 (IGNOTZ *et al.*, 2001), pois apresentam idêntica composição de aminoácidos, diferindo apenas no grau de glicosilação (SEIDAH *et al.*, 1987). Essa PDC 109 é também uma proteína ligadora de fucose, e se assemelha a uma proteína tipo lectina, responsável pela formação do reservatório espermático no oviduto. Essa proteína é perdida ou perde a afinidade pela fucose e passa a ter afinidade pela manose, quando espermatozoides são capacitados, no qual pode aumentar a sua liberação do epitélio salpígeo.

As BSPs encontram-se ainda associadas à membrana dos espermatozoides ejaculados e influenciam além da capacitação espermática pela ligação ao HDL (High density lipoprotein) e glicosaminoglicanos, como a heparina, que apresenta as concentrações aumentadas durante o ciclo estral (THÉRIEN *et al.*, 1997), influencia a congelabilidade do sêmen (ROMITTO *et al.*, 2003) e reação acrossômica (CUNEO *et al.*, 2004). A BSP A<sub>3</sub> pode ainda influenciar negativamente o metabolismo espermático, uma vez que touros de baixa fertilidade apresentam maior concentração desta proteína no plasma seminal (RONCOLETTA, 2003).

Ultimamente vêm sendo desenvolvidos “Kits” (AX, 2005) para diagnóstico da proteína denominada *Fertility Associated Antigen* (FAA) (BELLIN *et al.*, 1994) que é a mesma proteína ligadora de heparina de 30KDa (BSP-30). Tem sido demonstrado que 60-65% de touros que são positivos para a FAA sofrem mais reação acrossômica, comparado com 15-20% quando negativos para este antígeno (AX, 2005).

Ao nível de campo isso significa que touros positivos para FAA podem fertilizar mais vacas nos primeiros 60 dias da estação reprodutiva do que touros negativos para FAA (AX, 2005).

## 2.2. Outras proteínas relacionadas com a fertilidade

A acrosina é uma proteína estocada no compartimento acrossomal do espermatozóide na forma de zimogênio, denominado proacrosina. Essa proacrosina pode se auto-catalisar em acrosina por um mecanismo intra-zimogênio durante a reação acrossômica (URCH, 1991 citado por DE LOS REYES; BARROS, 2000). A proacrosina/acrosina, entre outras funções, está envolvida na dispersão da matriz acrossomal (JONES, 1990), e na ligação e penetração na zona pelúcida (CROSBY *et al.*, 1998). Dessa forma as amostras de acrosina são reflexo do estado do acrossoma do espermatozóide (BRAUNDMEIER; MULLER, 2001).

SPUNGIN *et al.* (1995) relatam a presença de duas proteínas, APZ e PH20, na membrana dos espermatozoides, as quais seriam responsáveis pela ligação com a zona pelúcida do ovócito. Recentemente a proteína PH20 foi relatada como uma glicoproteína de 80KDa, que possui atividade de hialuronidase (MEYERS; ROSEMBERGER, 1999).

## 3. Testes de fertilidade *in vitro*



### 3.1. Capacitação espermática

A capacitação espermática representa mudanças bioquímicas e fisiológicas no espermatozóide, tornando-o apto a sofrer a reação acrossômica, e assim penetrar na zona pelúcida do oócito maturado. Essas mudanças durante a capacitação também promovem a hiperativação do espermatozóide aumentando a sua motilidade (CAMARGO *et al.*, 2001).

Em condições naturais, o processo de capacitação parece ocorrer na junção útero-tubárica como pré-requisito para a fecundação (HAFEZ, 2004), por ação de secreções da fêmea chamadas de glicosaminoglicanos, como a heparina e os sulfatos de heparan, condroitina e keratan (GORDON, 1994).

A descoberta dos glicosaminoglicanos proporcionou o desenvolvimento de técnicas para induzir a capacitação *in vitro* e, conseqüentemente a melhora nos resultados de fecundação *in vitro*. O glicosaminoglicano mais potente na indução da capacitação é a heparina (PARRISH *et al.*, 1988). A ligação da heparina com o espermatozóide é saturável (receptor com pontes de ligação), reversível, dependente do pH, temperatura e nível de cálcio. O seu efeito pode variar com a dose utilizada, concentração e peso molecular das proteínas ligadoras de heparina (HBPs) presentes nos espermatozóides. Por isso, o sêmen de touros pode ter respostas diferentes entre si, quanto à capacitação *in vitro*.

### 3.2. Fecundação *in vitro*

Em 1959 nasceram os primeiros animais oriundos da técnica de Fertilização *in vitro* (FIV) (CHANG, 1959). O sucesso posterior foi obtido em 1968 com camundongos de laboratório. Em 1978, foi a vez dos humanos

terem êxito com a técnica com o nascimento de Louise Brown. Somente em 1981 a bovinocultura teve o primeiro bezerro nascido por esse procedimento.

No Brasil a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos iniciou nos anos 90 (OLIVEIRA *et al.*, 1994). Desde então, a fecundação *in vitro* (FIV) vem sendo empregada para propósitos práticos, assim como de pesquisa. A aplicação prática das técnicas de FIV inclui a produção *in vitro* de embriões, que podem ser transferidos às receptoras. A PIVE permite a produção, em média, de uma gestação/vaca/semana (DODE; RUMPF, 2002), podendo aumentar rapidamente o número de animais geneticamente superiores, diminuir o intervalo de gerações e aumentar a intensidade de seleção. Além disso, a PIVE permite a manutenção de rebanhos mestiços com o grau de sangue desejado.

Contudo, alguns centros de pesquisa realizam a FIV em bovinos com o objetivo de investigar os diferentes passos da fecundação (TANGHE *et al.*, 2002). Nos processos de fecundação *in vitro* (FIV), incluindo técnicas de maturação, fecundação dos oócitos e cultivo embrionário, os resultados de desempenho entre touros de qualidade espermática aparentemente iguais, demonstram grande variabilidade (CAMARGO *et al.*, 2002), havendo um efeito touro-específico, tanto na taxa de clivagem quanto no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Outras evidências existentes na literatura sugerem que as taxas de penetração espermática *in vitro* são dose-dependentes da heparina (PUGLISI *et al.*, 2004) e da concentração espermática.

Por ser um método relativamente caro, seria ideal que a habilidade de um touro na FIV fosse determinada antes da realização da técnica (TANGHE *et al.*, 2002).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P. *et al.* Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects motility of bull sperm. *Reprod. Fertil. Develop.* v. 6, p. 165-171, 1994a.
- AL SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAM, P.C. *et al.* Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects semen diffusate and their effects on sperm motility. *Molec. Reprod. Develop.* v. 39, p. 328-336, 1994b.
- ANUALPEC. Disponível em <[www.fnp.com.br/fnp/anualpecmain.htm](http://www.fnp.com.br/fnp/anualpecmain.htm)>, 2002.
- ARANGASAMY, A.; SINGH, L.P.; AHMED, N. *et al.* Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* v. 90, p. 243-254, 2005
- AX, R.L. Increase Bull Power, Decrease the coast. *Net.* Disponível em: <[www.gelbvieh.org/gw/gw0105bullpower.pdf](http://www.gelbvieh.org/gw/gw0105bullpower.pdf)>, 2004. Acesso em: 2005.
- BARTH, A.D.; WALDNER, C.L. Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examines at the Westwern College of Veterinary Medicine. *Can. Vet. J.*, v.43, n. 4, p. 274-284, 2002.
- 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. *J. Anim. Sci.* v. 72, p.2441-2448, 1994.
- BOUJRAD, N. ; OGWUEGBU, S.O.; GARNIER, M. *et al.* Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science.* v.268, p. 1609-1612, 1995.
- BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. Acurate molecular markers of male fertility. Where do we go from here? Disponível em: <[www.iets.org/news/mar01.pdf](http://www.iets.org/news/mar01.pdf)>, 2001.
- BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; RODRIGUES, L.H. *et al.* Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriog.*, v. 58, p. 1175-1186, 2002.
- BROWN, L.F.; BERSE, B.; VAN DER WATER, L. *et al.*, Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol. Biol. Cell.* v.3, p. 1169-1180, 1992.
- BRUNER, K.A.; McCRAW, R.L.; WHITACRE, M.D. *et al.* Breeding soundness examination of 1952 yearling beef bulls in North Carolina. *Theriog.*, v. 44, p. 129-145, 1995.
- CALVETTE, J.J.; MANN, K.; SANZ, L. *et al.* *E. Febs Lett.* v. 399, p. 147-152, 1996.
- CAMARGO, L.S.A.; RAMOS, A.A.; SÁ, W.F. *et al.* Fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Gir. *Cad. Téc. Zootec.*, n. 35, p. 89-96, 2001.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. *et al.* Efeito de concentração espermática e período de

- incubação oócito-espermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.37, p.709-715, 2002
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55 KDalton protein fertility-associated protein in Holstein bulls seminal plasma. *Biol. Reprod.* v.57, p.1293-1301, 1997.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol. Reprod.* v.60, p. 454-460, 1999.
- CHÁCON, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E. *et al.* Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. *Theriog.*, v. 52, p.221-231, 1999.
- CHÁCON, J.; PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-MARTINÉZ, H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. *Theriog.*, v. 58, p. 41-50, 2002.
- CHANG, M.C. Fertilisation of rabbit ova *in vitro*. *Nature*. v.179, p.466-467, 1959.
- CORREA, A.B.; VALE FILHO, V.R.; CORRÊA, G.S.S.; ANDRADE, V.J.; SILVA, M.A.; DIAS, J.C. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 58, n.5, p. 823-830, 2006.
- CROSBY, J.; JONES, R.; BARROS, C. *et al.* Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in non-enzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* v.49, p. 426-434, 1998.
- CUNEO, M.F.; VINCENTI, L.M.; MARTINI, A.C. *et al.* Effects of PDC-109 on bovine sperm functional activity in presence or absence of heparin. *Theriog.* v.62, p. 207-216, 2004.
- DE LOS REYES, M.; BARROS, C. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Anim. Reprod. Sci.* v. 58, p. 215-228, 2000.
- DODE, M.A.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. *Rev. Biotecnol. Ciência Desenv.* v. 26, p.32-37, 2002.
- EDWARDS, D.R.; BEAUDRY, P.P.; LAING, T.D. *et al.* The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int. J. Obes.* , v.20, p. 9-15, 1996.
- FITZPATRICK, L.A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M.R. *et al.* Bull selection and use in Northern Australia. Part 2. Semen Traits. *Anim. Reprod. Sci.*, v.71, p. 39-49, 2002.
- FOUCHÉCOURT, S.; CHARPIGNY, G.; REINAUD, P. *et al.* Mammalian lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. *Biol Reprod.* v. 66, n.2, p.:458-67, 2002.
- FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins

present only in bovine calcified matrix. *Biochem. J.* v.232, p. 715-724, 1985.

FOOTE, R. II. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 75, p. 119-139, 2003.

GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y. *et al.* Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.* v. 58, p.826-833, 1998.

GERENA, R.L.; EGUCHI, N.; URADE, Y. *et al.* Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the adult murine testis and epididymis. *J. Androl.* v.21, n.6, p.848-854, 2000.

GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos.* London: CAB International/Cambridge Uni. Press, 1994. 640p.

GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and the bull during the cryopreservation process. *Theriog.* , v. 41, p. 1151-1162, 1994.

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

HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J.; KAVANAUGH, J.F. *et al.* Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.52, p. 390-397, 1995.

HIGDON III, H.L.; SPITZER, J.C.; HOPKINS, F.M. *et al.* Outcomes of

breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. *Theriog.*, v. 53, p. 1321-1332, 2000.

IGNOTZ., G.G.; LO, M.C.; PEREZ, C.L. *et al.* Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 1806-1811, 2001.

INSKEEP, P.B.; MAGARGEE, S.F. , HAMMERSTEDT, R.H. Alterations in motility and metabolism associated with sperm interaction with accessory sex gland fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 1, p.1-9, 1985.

JOBIM, M.I.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. *et al.* Albumina e osteopontina – proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, n.4, p. 296-305, 2002.

JONES, R. Identification and functions of mammalian sperm egg recognition molecules during fertilization (Suppl.). *J. Reprod. Fertil.* v. 42, p. 89-105, 1990.

KENNEDY, S.P.; SPITZER, J.C.; HOPKINS, F.M. *et al.* Breeding soundness evaluation of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriog.*, v. 58, p. 947-961, 2002.

KILLIAN, G.J; CHAPMAN, D.A.; CANCEL, A.M. *et al.* Male factors affecting sperm fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v. 23, n. 2, p. 83-85, 1999.

- KILLIAN, G.J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development., *Anim. Reprod. Sci.* v. 82-83, p. 141-153, 2004.
- LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, v. 74, p. 1511-1522, 2000.
- LENZ, R.W.; MARTIN, J.L.; BELLIN, M.E. *et al.* Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *J. Dairy Science*, v.71, p. 1073-1077, 1988.
- MADRID M.; OTT, R.S.; VEERAMACHANENI, R.D.N. *et al.* Scrotal circumference, seminal characteristics and testicular lesions of yearling Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 579-585, 1998.
- MANJUNATH, P.; SARAM, M.R. Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.* v. 241, p. 685-692, 1987.
- MARKS, J.L.; AX, R.L. Relationship of nonreturning rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. *J. Dairy Sci.* v. 68, p.2078-2082, 1985.
- McCAULEY, T.C., ZHANG, H.M., BELLIN, M.E. *et al.* Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Mol. Reprod. Develop.* v. 58, p.336-341, 2001.
- McGOWAN, M.R.; BERTRAM, J.D.; FORDYEE, G. *et al.* Bull selection and use in Northern Australia. *Anim. Reprod. Sci.* v.71, p. 25-37, 2002.
- MILLER, D.J., WINER, M.A., AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* v.42, p. 899-915, 1990.
- MULLER, C.H. Rationale, interpretation, validation and uses of sperm function tests. *J. Androl.*, v. 21, p. 10-30, 2000.
- NASS, S.J.; MILLER, D.J.; WINER, M.A. *et al.* Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to caudal epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 25, p. 237-246, 1990.
- OLIVEIRA E.B.; WATANABE, Y.F.; GARCIA, J.M. Establishment of IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. *Theriog.*, v.41, p. 188, 1994.
- PARKINSON, T.J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet. J.* v. 168, p. 215-229, 2004.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, M.A. *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; HANDROW, R.H. *et al.* Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* v.40, p. 1020-25, 1989.
- PUGLISI, R.; BALDUZZI, D.; GALLI, A. *In vitro* sperm penetration speed and its relationship with *in vivo* bull fertility.

*Reprod. Dom. Anim.*, v. 39, p. 424-428, 2004.

ROMITTO, G.C. Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte. São Paulo, 192p., 2003 (tese mestrado).

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H. *et al.* Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. *Ars Vet.* v.13, p. 135-140, 1997.

RONCOLETTA, M. Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros. 2003. 104f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S. *et al.* Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 663-677, 2000.

SALVADOR, D.F.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R. *et al.* Perfil andrológico de touros da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, n.2, p.64-65, 2002.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPIANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSPF: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid

peroxidation. *Theriog.* v. 45, p. 633-642, 1996.

SEIDAH, N.G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J. *et al.* Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem. J.*, v.243, p. 195-203, 1987.

SHIVAJI, S.; BHARGAVA, P.M. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. *Bio. Assays*, v. 7, p. 13-17, 1987.

SIITERI, J.E.; ENSRUD, K.M.; MOORE, A. *et al.* Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis, and epididymis, on sperm. *Mol. Reprod. Dev.* v. 40, p. 16-28, 1995.

SKINNER, M.K. Cell-cell interaction in the testis. *Endocrine Reviews.* v. 12, p. 45-77, 1991.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCK, V. *et al.* Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. *Reprod. Dom. Anim.* v. 37, p. 127-132, 2002.

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reproduction*, v. 52, p. 1372-1379, 1997.

VALE FILHO, V.R. Padrões do sêmen bovino para o Brasil: análise e sugestões. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8, 1989, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1989, p. 94-118.

VALE FILHO, V.R., BERGMANN, J.A.G., ANDRADE, V.J. Caracterização andrológica de touros Nelore selecionados para a primeira estação de monta. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.2, p.42-45, 1997.

VALE FILHO, V.R. Subfertilidade em touros: Parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.35, p.81-87, 2001a.

VALE FILHO, V.R. A evolução da andrologia veterinária no Brasil e no mundo. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n.35, p.7-14, 2001b.

VALENTIM, R.; ARRUDA, R.P.; BARNABE, R.C. *et al.* Biometria testicular de touros nelore (*Bos taurus indicus*) e touros cruzados Nelore-europeu (*Bos taurus indicus* X *Bos taurus taurus*) aos 20 e 24 meses de idade. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 39, n.3, p. 113-120, 2002.

WU, C.J.; STOJANOV, T.; CHAMI, O. *et al.* Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J. Biol. Chem. Paper in Press*. Published on May 11, 2001 as Manuscript M103107200, p. 1-33, 2001.

## CAPÍTULO 1

### PERFIL CROMATOGRÁFICO E ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS LIGADORAS DE HEPARINA DO SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA GIR E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS ANDROLÓGICAS E TESTES *IN* *VITRO*

#### RESUMO

FOLHADELLA, I.M. **Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas ligadoras de heparina do sêmen de touros da raça Gir e associação com características andrológicas e testes *in vitro***. [Chomatographic e electrophoretical heparin binding protein profile of Gyr bulls semen and association with andrological characteristics and *in vitro* tests]. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Estudou-se o perfil de proteínas totais e proteínas ligadoras de heparina do sêmen de quinze touros da raça Gir, a fim de associá-las com as características andrológicas e potencial de fertilidade *in vitro*. Realizou-se inicialmente o exame andrológico nos animais, e em seguida avaliou-se por cromatografia por gel filtração o perfil de proteínas totais do sêmen e por cromatografia líquida de rápida performance (FPLC), em colunas de afinidade à heparina, os perfis de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e membrana espermática. Os picos de proteínas ligadoras de heparina do sêmen foram submetidos à eletroforese para a identificação dos respectivos pesos moleculares. As concentrações das proteínas identificadas de acordo com LOWRY (1951) foram associadas com parâmetros andrológicos *in vivo* e com a fertilidade *in vitro* pelas taxas de clivagem e produção de blastocistos. A concentração de proteínas totais do plasma seminal variou de 4,1 a 167,9 mg/ml, com média de  $47,1 \pm 48,5$  mg/ml, mostrando grande variabilidade entre touros. O perfil cromatográfico das proteínas totais do plasma seminal apresentou oito diferentes picos em 100% dos touros e nove picos em 86%. As proteínas ligadoras de heparina apresentaram cinco picos de afinidade em 87,5% dos touros e três picos em 100%. As maiores associações observadas foram entre as proteínas totais (PLB) X taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 1 (P1A) X taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) X taxa de clivagem e proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) X taxa de blastocistos, as quais apresentaram alta magnitude de associação ( $>0,66$ ). No entanto nenhuma das proteínas estudadas apresentou associação com os parâmetros andrológicos.

**Palavras-chave:** Cromatografia, eletroforese, proteínas e touros Gir



## ABSTRACT

FOLHADELLA, I.M. **Perfil cromatográfico e eletroforético das proteínas ligadoras de heparina do sêmen de touros da raça Gir e associação com características andrológicas e testes *in vitro*.** [Chomatographic e eletrophoretical heparin binding protein profile of Gyr bulls semen and association with andrological characteristics and *in vitro* tests]. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

It was studied total protein and heparin binding protein profile of 15 Gyr bulls and its association with andrological characteristics and *in vitro* fertility potential. First, animals were submitted to breeding soundness evaluation followed by evaluation of total protein profile with gel filtration chromatography and heparin binding protein of sperm membrane and seminal plasma by Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) with heparin affinity column. Each peak of heparin binding protein of semen was submitted to eletrophoresis to identify molecular weight. Protein concentrations identified by LOWRY (1951) were associated with andrological parameters *in vivo* and *in vitro* fertility by cleavage and blastocyst rates. Total protein concentration of seminal plasma ranged from 4.1 to 167.9 mg/ml, with mean of  $47.1 \pm 48.5$  mg/ml, with great variability among bulls. Chromatographic profile of total seminal plasma proteins presented 8 different peaks in 100% and 9 peaks in 86% of bulls. Heparin binding proteins presented 5 affinity peaks in 87,5% and 3 peaks in 100% of bulls. Greater associations were observed for: total proteins (PLB) X blastocysts rate, peak 1 heparin binding proteins(P1A) X blastocysts rate, peak 5 heparin binding protein (P5A) X cleavage rate and peak 5 heparin binding protein (P5A) X blastocysts rate, and all of them with high magnitude association ( $>0,66$ ). However none of the proteins showed association with andrological parameters.

**Key-words: Chromatography, eletrophoresis, Gyr bulls and proteins.**

## INTRODUÇÃO

A subfertilidade de touros representa um impacto econômico negativo nas indústrias de gado de leite e corte. Touros que apresentam exame andrológico normal têm perfis de fertilidade diferenciados, que podem estar relacionados com os diferentes componentes químicos que apresentam no sêmen. Com isso, surge a necessidade de buscar marcadores bioquímicos para essas diferenças.

Sabe-se que o plasma seminal contém substâncias que afetam a função espermática e modificam o potencial fertilizante dos espermatozoides. Proteínas presentes neste plasma denominadas proteínas ligadoras de heparina (HBPs) modulam eventos de ligação da heparina à membrana espermática e servem como marcadores moleculares para diferentes mecanismos de fertilização.

Nas décadas de 1950 e 1960 (LARSON; SALISBURY, 1954), a técnica de eletroforese começou a ser utilizada para mapear e identificar esses componentes protéicos do ejaculado. Pela eletroforese unidimensional, o perfil protéico do plasma seminal de touros foi correlacionado com padrões de fertilidade normais e alterados, com a congelabilidade e com a viabilidade do sêmen entre outros. Mais recentemente a técnica de cromatografia líquida de rápida performance (FPLC) passou a ser usada antes da realização da eletroforese, para sêmen de touros zebuínos, para que fossem separadas mais especificamente as proteínas, quanto ao peso molecular e grau de afinidade em diferentes colunas (SALVADOR, 2005).

A associação entre essas técnicas é de grande valia para a separação de proteínas específicas, como por exemplo, àquelas que apresentam grande associação com os processos de capacitação tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Entretanto, apesar dos estudos das proteínas seminais estarem sendo amplamente realizados em várias espécies animais, com grande ênfase para a espécie bovina, muitas destas proteínas ainda não apresentam suas funções definidas.

O objetivo do presente trabalho foi identificar as proteínas ligadoras de heparina do sêmen, associá-las com a fertilidade *in vitro* e com os parâmetros andrológicos em touros da raça Gir.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local de execução do estudo:

Este trabalho foi realizado em diferentes fazendas do Estado de Minas Gerais, no laboratório de Reprodução Animal da Embrapa/Gado de leite - Juiz de Fora/M.G e no laboratório de Físico-química e enzimologia de proteínas do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

### 2. Seleção dos touros e coleta das amostras:

Touros jovens da raça Gir, foram avaliados pelo exame andrológico (CBRA, 1998), e classificados de acordo com a Classificação Andrológica por Pontos (CAP) modificada, em satisfatório, questionável e insatisfatório.

Desses animais, quinze, com circunferência escrotal  $\geq 30$  cm, e com diferentes perfis andrológicos e que apresentaram boa congelabilidade do sêmen (CBRA, 1998), tiveram seu sêmen congelado. Inicialmente, os congelamentos foram feitos em triplicata de modo a avaliar a repetibilidade do perfil de proteínas seminais dos touros em diferentes coletas. Dos quinze touros avaliados para proteínas, dois touros foram avaliados em triplicata e um em duplicata para observação da repetibilidade.

Para a fecundação *in vitro* foram feitas três repetições de cinco animais com CAP acima de 60 pontos. Desses, no momento da coleta de sêmen para o congelamento, foi retirada uma alíquota de 1 ml para purificação e isolamento das proteínas ligadoras da heparina.

### **3. Congelamento do sêmen**

O sêmen foi congelado de modo a obter-se espermatozóides viáveis.

### **4. Purificação, isolamento e quantificação das proteínas ligadoras da heparina**

Para a purificação e isolamento das proteínas ligadoras da heparina as amostras de sêmen foram coletadas e congeladas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C). Foram avaliadas as proteínas dos 3 perfis andrológicos.

#### **4.1. Proteínas do plasma seminal**

A amostra foi descongelada e diluída na solução tampão (ST) filtrada em filtro de Milipore de 0,45 micrômetros, e centrifugada a 1200g para a separação do plasma seminal dos espermatozóides.

As amostras do plasma seminal foram submetidas a uma coluna de Superose 12 por gel filtração (HR 10/30 Pharmacia LKB Biotechnology nº17-053801), para retirada de proteínas com peso molecular de até 100KDa, e ao comprimento de onda de 280nm.

As proteínas detectadas entre o tempo de retenção de 25 a 31 minutos, identificado como pico três, onde estão as proteínas ligadoras de heparina (SALVADOR, 2005) foram homogeneizadas e aplicadas em coluna de afinidade a heparina (Sigma – Hi-Trap™ Heparin HP) para localização dos “pools” de proteínas de interesse específico.

Após a lavagem do material do “pool” de proteínas do terceiro pico foram identificados cinco diferentes picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade a heparina.

Após passagem pela coluna de afinidade, as concentrações de proteínas totais, do pico 3 e de cada pico de afinidade foram determinadas pelo método de LOWRY (1951).

As proteínas com afinidade a heparina foram separadas em um gel SDS-poliacrilamida unidimensional, com 12% de poliacrilamida, para identificação dos pesos moleculares pelo programa Totallab 100. Foram então anotados os pesos moleculares das diferentes proteínas para cada animal.

#### **4.2. Proteínas da membrana espermática**

O material contendo os espermatozóides foi incubado com Triton X-100 (t-Octylphenoxy polyethoxethanol) e novamente centrifugado a 50000g por 30 minutos, para retirada das proteínas aderidas à membrana dos espermatozóides.

As amostras da membrana espermática foram submetidas à mesma coluna de afinidade a heparina (Sigma) para localização dos “pools” de proteínas de interesse específico.

Após a lavagem do material do “pool” de proteínas do terceiro pico foram identificados três diferentes picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade a heparina.

As proteínas com afinidade a heparina foram separadas em um gel SDS-poliacrilamida unidimensional, com 12,5% de poliacrilamida, para identificação dos pesos moleculares. Foram então anotados os pesos moleculares das diferentes proteínas para cada animal.

### **5. Fecundação in vitro (FIV):**

### 5.1. Sêmen de touros com a presença ou ausência das proteínas ligadoras da heparina

Foram utilizadas três amostras de sêmen congelado de cada animal para a fecundação *in vitro*. Dos quinze animais selecionados para o congelamento de sêmen somente cinco foram submetidos à FIV com um total de quinze repetições.

Os ovócitos recuperados a partir de ovários coletados de fêmeas bovinas abatidas em matadouro foram selecionados e maturados *in vitro* em meio TCM-199 (Gibco), acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20µg/ml de FSH, por 24 horas (RAMOS, 2004). Após a maturação, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen descongelado. Para separação de espermatozoides vivos e mortos foi utilizado o método de *swim up*. A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-Talp acrescido de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática média de  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides/ml por período aproximado de 22 horas (PARRISH *et al.*, 1986).

Os possíveis zigotos foram cultivados em meio CR2, suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB), juntamente com suas células do *cumulus*, em gotas de 50µl cobertas com óleo mineral. O meio foi renovado pela metade 48 horas após o início do cultivo. Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora a 38,8 °C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

Foram avaliadas as taxas de clivagem, às 72 horas pós-fecundação e de blastocistos, com 7-8 dias (KENNEDY *et al.*, 1983).

### 6. Análise Estatística

Neste experimento foram analisados: as proteínas totais, proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração, as proteínas

ligadoras da heparina do sêmen, a taxa de clivagem e blastocistos e a Classificação Andrológica por Pontos (CAP) dos touros previamente examinados. Para as associações com a fertilidade foram utilizados apenas os touros com perfil andrológico satisfatório e questionável.

Por ser um estudo relativamente novo e não haver dados em touros da raça Gir, a análise estatística entre as proteínas e os resultados *in vitro* foi feita pela Regressão Linear Simples usando o programa estatístico SAS (2002). E entre as proteínas e os parâmetros *in vivo* por Correlação de Pearson, para se observar o comportamento dos dados e posteriormente usar aqueles de maior correlação.

Os pares de dados analisados na regressão foram basicamente:

	PLB	P3	C1	C2	C3	C4	C5
Tx Cliv.	X	X	X	X	X	X	X
Tx Bl.	X	X	X	X	X	X	X

Onde: PLB- Proteínas Totais; P3- Proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração; C1,C2,C3,C4 e C5 são as proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal identificadas; Tx Cliv.-Taxa de Clivagem; Tx Bl.- Taxa de blastocistos.

E os pares de dados analisados na correlação foram:

	PLB	P3	C1	C2	C3	C4	C5
CE	X		X	X	X	X	X
MOT	X		X	X	X	X	X
VIG	X		X	X	X	X	X
D.MA	X		X	X	X	X	X
D.TOT	X		X	X	X	X	X
CAP			X	X	X	X	X

Onde: PLB- Proteínas Totais; P3- Proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração; C1,C2,C3,C4 e C5 são as proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal identificadas nos diferentes picos; CE- Circunferência escrotal; MOT- Motilidade; VIG- Vigor; D.MA- Defeitos Maiores; D.TOT- Defeitos Totais; CAP- Classificação Andrológica por Pontos;

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

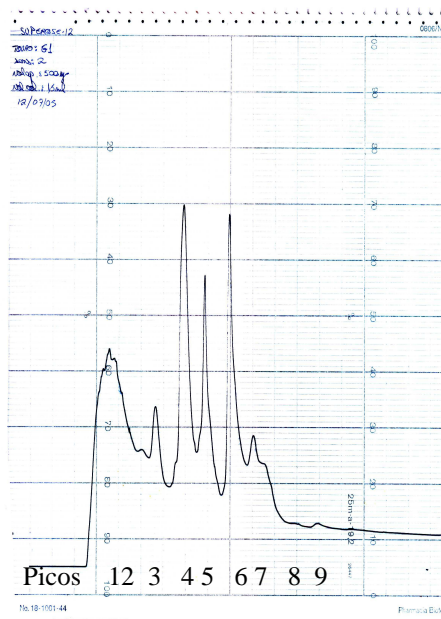
### 1. Perfil Cromatográfico por gel filtração de proteínas do plasma seminal

Inicialmente dois touros foram avaliados em triplicata e um em duplicata como descrito anteriormente. Após constatado o alto grau de repetibilidade das amostras de um mesmo touro em diferentes coletas, apesar de algumas diferenças entre géis em função da concentração de proteínas totais no plasma seminal, foram avaliados os outros touros do

experimento. Vale lembrar que como existem variações no modo de colheita, na frequência do ejaculado e outras variáveis, já era esperada alguma diferença.

O perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal apresentou nove picos, os oito apresentados no Nelore (SALVADOR, 2005) mais um nono (contendo peptídeos com peso molecular muito pequeno)(Fig.1). Estes resultados foram semelhantes aos descritos por MANN e MANN (1981) que encontraram proteínas distribuídas em quatro a dez frações distintas para touros.

**Figura 1 .:** Perfil cromatográfico de frações de proteínas do plasma seminal de touro Gir por gel filtração em coluna de Superose 12



Os oito primeiros picos estiveram sempre presentes, e o nono em 86% das vezes, sendo importante ressaltar que os valores obtidos para os últimos três touros é a média da triplicata e da duplicata. No entanto,

apesar da semelhança desses perfis, observou-se grande variabilidade e alto desvio padrão da média na comparação das áreas dos respectivos picos entre os touros, o que pode ser visto na tab. 1.

**Tabela 1:** Valores mínimos, máximos e médios das áreas dos nove picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros jovens da raça Gir, e suas respectivas frequências.

Frações	Área (%) e frequência dos frações cromatográficas				Frequência N. (%)
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	
1	9,33	35,60	18,41	6,87	15 (100%)
2	8,26	19,94	14,47	3,03	15 (100%)
3	5,53	19,58	14,83	3,74	15 (100%)
4	16,44	32,59	21,22	5,51	15 (100%)
5	3,20	23,15	9,48	6,32	15 (100%)
6	3,61	27,85	11,31	6,59	15 (100%)
7	0,74	4,79	3,44	1,23	15 (100%)
8	0,16	6,37	3,16	1,97	15 (100%)
9	0,42	2,68	1,39	0,83	13 (86%)

Observa-se, como no Nelore, (SALVADOR, 2005) que as maiores médias de áreas foram registradas no picos 1 e 4, mas devido ao fato dos grandes desvios padrão, eles não podem ser considerados a representação da maior parte de proteínas do plasma seminal, sendo mais correto considerar a maior parte entre as seis primeiras frações.

### 1.1. Concentração de proteínas totais, proteínas do pico 3

As concentrações de proteínas totais no plasma seminal variaram de 4,1 a 167,9 mg/ml, com média de  $47 \pm 48,3$  mg/ml, com grande variabilidade entre os touros, assim como foi observado nos touros Nelore (SALVADOR, 2005; ASSUNÇÃO *et al.*, 2003) e diferindo-se das médias encontradas por JOBIM *et al.* (2003) de  $77,97 \pm 15,82$  mg/ml para touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*.

A área média do terceiro pico de proteínas, onde são encontradas as proteínas ligadoras de heparina, foi de  $14,83 \pm 3,74$  cm<sup>2</sup> correspondendo a 15,2 % do total de proteínas do plasma seminal dos touros, corroborando com os valores encontrados

em touros Nelore (SALVADOR, 2005) de 8 a 10 % .

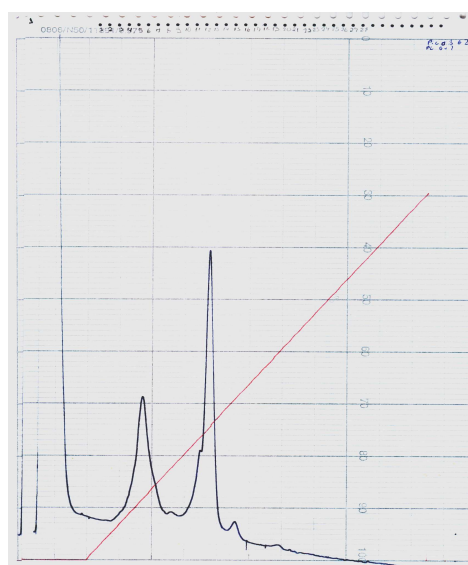
### 2. Perfil Cromatográfico de proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina

Após a lavagem do material do “pool” de proteínas do terceiro pico, sem afinidade a heparina, foram identificadas cinco picos cromatográficos de acordo com a afinidade a heparina, assim como no Nelore (SALVADOR, 2005). Esse resultado foi semelhante ao encontrado por BELLIN *et al.* (1994), que também descrevem a localização de cinco picos de afinidade a heparina, para o plasma seminal de touros europeus.

As proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal de touros Gir representaram 13% do total de proteínas avaliadas no pico 3, e 0,5 % do total de proteínas, o que foi encontrado também em bubalinos (ARANGASAMY *et al.*, 2005)

Nas tab. e fig. 2 são apresentados os graus de afinidade, em função das concentrações de NaCl e a frequência dos picos.

**Figura 2:** Perfil cromatográfico de afinidade a heparina de proteínas do plasma seminal.



1 2 3 4 5

GRADIENTE DE NaCl 1,5M.

**Tabela 2.** Descrição dos picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade a heparina, em função das concentrações de NaCl das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal de touros Gir.

Picos	Grau de afinidade*	Frequência do pico.
1	10% (NaCl 0,150M)	15 (100)
2	13% (NaCl 0,195M)	15 (100)
3	23% (NaCl 0,345M)	15(100)
4	29% (NaCl 0,435M)	14 (87,5)
5	33% (NaCl 0,495M)	14 (87,5)

Concentração de NaCl necessária para a eluição das proteínas. Obs. Um touro em triplicata não apresentou o pico 1, e outro não apresentou os picos 4 e 5 em duas amostras. Estes dados não foram contabilizados na frequência por se tratar do mesmo animal. A frequência foi analisada conforme o aparecimento de bandas no gel, principalmente devido ao pico 5 normalmente aparecer abaixo da linha de base no cromatograma. Quanto maior a % de NaCl, maior a afinidade de proteínas a coluna de heparina.

Conforme observado na tab. 2, todos os quinze touros apresentaram os três primeiros picos de afinidade, com exceção de um touro que não apresentou os picos 4 e 5. Provavelmente este animal apresentou as proteínas contidas neste pico aderidas à membrana espermática. Estes resultados diferem dos encontrados para touros Nelore (SALVADOR, 2005), cujos três primeiros picos aparecem em 81% dos animais e os picos 4 e 5 em 38% e 19%, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada, em parte, pela maior seleção a que são submetidos os touros Nelore, na busca por características produtivas e reprodutivas de interesse,

apresentando esses animais mais proteínas de membrana favorecendo o processo de capacitação. Pode ainda ser explicada pelos cruzamentos utilizados entre animais da raça Gir onde ocorre muita consangüinidade.

As médias das concentrações dos cinco picos variaram de 0,02096 a 0,19025 (%), com o terceiro pico de afinidade contendo a maior parte das proteínas ligadoras de heparina (Tab.3).

BELLIN *et al.* (1994) encontraram média de concentração de 19.2 mg/ml no ejaculado, diferindo do presente estudo.

**Tabela 3:** Médias e desvios padrão das concentrações das Proteínas de Plasma Seminal (PPS) nos cinco picos de afinidade a heparina identificados e suas frequências (%).

Pico	Mín.	Max.	Média	Desvio Padrão
1	0,00087	0,33080	0,06653	+ - 0,10624
2	0,00511	0,73083	0,16948	+ - 0, 23035
3	0,00508	0,53794	0,19025	+ - 0,19188
4	0,00000	0,12698	0,04616	+ - 0,04878
5	0,00000	0,07240	0,02096	+ - 0,02270

Contudo, o pico de maior afinidade à heparina (5) correspondeu a apenas 4,2 % do total de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal, semelhante aos 6% das mesmas encontrados por MILLER *et al.* (1990) no fluido de touros vasectomizados. Em um estudo realizado com touros Red Angus, Gelbvieh, Santa Gertrudes e Gelbvieh x Santa Gertrudes este mesmo pico correspondeu a 30% das proteínas ligadoras de heparina (BELLIN *et al.*, 1994).

### **2.1. Perfil Cromatográfico de proteínas de membrana espermática com afinidade a heparina**

Em função das baixas concentrações de proteínas aderidas à membrana espermática (PAM), as análises ficaram restritas as frequências de proteínas identificadas na eletroforese. As proteínas aderidas à coluna de afinidade a heparina foram eluídas por um gradiente de NaCl, sendo divididas em três



frações para análises posteriores. O grau de afinidade e frequência do pico podem ser vistos na tab. 4. Devido ao fato dos primeiros quatro touros não apresentarem nenhuma área no cromatograma, estas amostras foram descartadas antes de serem analisadas em SDS-page. Posteriormente outros cromatogramas não apresentaram determinadas frações analisadas, e mesmo assim foram visualizadas bandas de proteínas no gel, o que evidencia que apesar da alta sensibilidade ajustada no FPLC, podem existir picos com baixa concentração. Isto leva a uma avaliação da frequência das frações registradas com mais cuidado,

associando principalmente com a área destes. Dos touros analisados em eletroforese descontínua apenas um touro não apresentou nenhuma das bandas e este possuía baixa concentração de proteínas no plasma seminal o que pode indicar uma interligação entre estas variáveis. Os géis de proteína de membrana foram avaliados com a ajuda do programa totallab 100, e foram identificadas algumas proteínas mais presentes por estimativa de peso molecular por um padrão comercial. As áreas totais dos cromatogramas de proteína com afinidade a heparina assim como as áreas parciais de cada fração ainda foram avaliadas.

**Tabela 4.** Descrição do grau de afinidade à heparina e da frequência de aparecimento das proteínas aderidas à membrana espermática, com afinidade à heparina para as três frações registradas.

Frações	Grau de afinidade	Frequência do pico.
1	24% (NaCl 0,36M)	9 (64%)
2	34% (NaCl 0,51M)	5 (36%)
3	40% (NaCl 0,60M)	5 (36%)

Conforme observado, as proteínas de membrana com maior frequência de ligação à coluna de heparina foram as do pico 1. Provavelmente por terem menor afinidade à membrana e se soltarem com mais frequência para ligarem-se à coluna de afinidade à heparina.

De um modo geral as proteínas ligadoras de heparina na membrana plasmática correspondem a menos de 1% das proteínas totais (BELLIN *et al.*, 1994), o que torna mais difícil o seu isolamento, purificação e identificação.

### 3. Perfil eletroforético de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal

Na tab. 5 e fig. 3 são observados os pesos moleculares (obtidos por comparação com o padrão Sigma, pelo programa Totallab 100) das proteínas mais frequentes nos respectivos picos.

Nos cinco picos de proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal foram encontradas 18 bandas de proteínas com pesos moleculares diferentes. Semelhante ao que foi encontrado por ARANGASAMY *et al.* (2005) no plasma seminal de bubalinos. Dessas 18 bandas das proteínas localizadas no gel de eletroforese, as mais fortes foram as de peso molecular 13, 14, 16, 18, 20, 28, 29 e 30 KDa, ou seja essas proteínas apresentaram maior concentração em seus

respectivos picos.

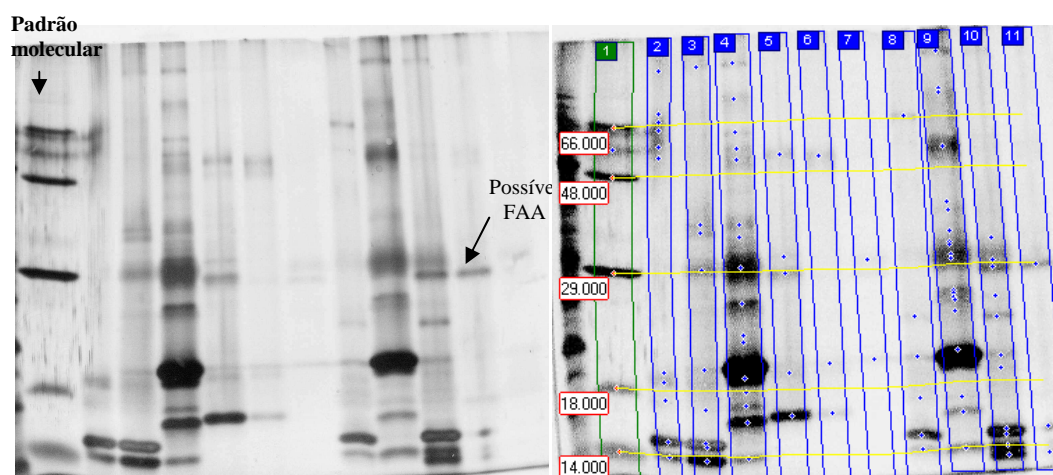
**Tabela 5:** Estimativa dos pesos moleculares em eletroforese das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal

Picos	Estimativa PM (KDa)
1	13 (forte), 14 (forte), 17, 18 (forte), 22, 24, 28 (forte), 30, 32 e 38.
2	13, 14 (forte), 18 (forte), 20 (forte) 22, 24, 28, 34, 37.
3	13, 16 (forte), 17, 18 (forte), 20 (muito forte), 24, 30 (forte), 38, 50 e 56.
4	15, 16, 18, 29, 30, 50 e 56
5	17, 29 (forte), 56

O pico 5, de maior afinidade à heparina, apresentou as bandas 17, 29 e 56 KDa, semelhante às bandas de 14-18KDa encontradas no estudo de BELLIN *et al.*

(1994) e às 14-20, 24 e 30KDa encontradas por MILLER *et al.* (1990).

**Figura 3:** Fotos do gel de poliacrilamida a 12,5 %, com aplicação de PPS com afinidade a heparina dos cinco picos cromatográficos e sua imagem sendo analisada no programa totallab 100.



De acordo com os dados já citados na literatura, a proteína de 14-16KDa pode se tratar da PDC-109, proteína ligadora de fucose, também denominada BSP A1/A2 (GWATHMEY *et al.*, 2003).

A proteína de 29-30KDa pode ser uma FAA (Fertility Associated Antigen) identificada em touros holandeses de maior fertilidade (BELLIN *et al.*, 1994) e também observada em touros Nelore (SALVADOR, 2005).

Outras proteínas encontradas neste estudo que não apresentaram bandas tão fortes foram as proteínas de peso molecular 24 e 56KDa já identificadas na literatura. A proteína HPB-24 provavelmente é uma TIMP-2 (Proteína Inibidora das Metaloproteinases 2 dos Tecidos)

responsável por processos fisiológicos associados com a ovulação, fertilização (EDWARDS *et al.*, 1996) e produção de progesterona pelas células estereidogênicas (BOUJRAD *et al.*, 1995).

### 3.1. Perfil eletroforético de proteínas ligadoras de heparina da membrana espermática

Foram encontrados três diferentes picos de proteínas ligadoras de heparina aderidas à membrana espermática (Tab.6), e um total de nove bandas (Fig.4). As bandas com maior concentração foram as de 14 e 15 KDa.

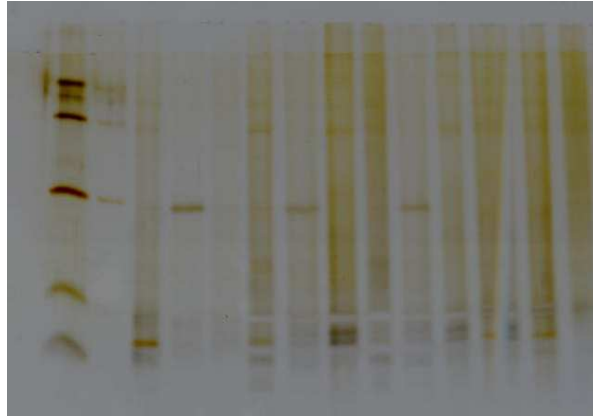
**Tabela 6:** Estimativa dos pesos moleculares em eletroforese das proteínas ligadoras de heparina da membrana espermática

Frações	Estimativa PM (KDa)
1	14(forte), 15(forte), 17, 28 e 45.
2	14, 16 18 e 28
3	16, 17, 18, 21 e 47

A quantificação da proteína de 15,5KDa e pI 4,9 identificada como aSFP (proteína ácida do plasma seminal) na membrana espermática sugere que esta é um potencial marcador

bioquímico para predição de alto desempenho em fertilidade (RONCOLETTA, 2003) por possuir funções preservativas à integridade do espermatozóide.

**Figura 4:** Fotos do gel de poliacrilamida a 12,5 %, com aplicação de PAM com afinidade a heparina das três frações cromatográficas.



#### **4. Estudo de associação entre as proteínas totais, proteínas do pico 3 , proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e fertilidade *in vitro***

Conforme observado na tab. 7, as maiores associações existente foram entre as proteínas totais (PLB) X taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina

do pico 1 (P1A) X taxa de blastocistos, proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) X taxa de clivagem e proteínas ligadoras de heparina do pico 5 (P5A) X taxa de blastocistos. Conforme a tab. 7 pode-se ainda observar que todas as variáveis estudadas apresentaram alta magnitude de associação ( $>0,66$ ).

**Tabela 7:** Regressão linear simples e grau de significância entre as proteínas totais, proteínas do pico 3 , proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e fertilidade *in vitro* (n=5)

	TxCliv	TxBlast
PLB	0,5750 p= 0,1374	<b>0,8544</b> <b>P=0,0247</b>
P3	0,2559 P=0,3845	0,2603 P=0,3798
P1A	0,6408 P=0,1037	<b>0,9225</b> <b>P=0,0094</b>
P2A	0,3075 P=0,3320	0,0645 P=0,6803
P3A	0,3824 P=0,2662	0,5308 P=0,1626
P4A	0,0784 P=0,6483	0,2445 P=0,3971
P5A;	<b>0,8829</b> <b>P=0,0177</b>	<b>0,9624</b> <b>P=0,0005</b>

Onde: PLB- Proteínas Totais; P3- Proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração; P1A, P2A, P3A, P4A e P5A são os picos das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal; Tx Cliv.-Taxa de Clivagem; Tx Blast.- Taxa de blastocistos;

Nesse estudo também foi demonstrado que a afinidade e não somente a presença da proteína ligadora de heparina na membrana está relacionada com o potencial do espermatozóide ser capacitado, sofrer reação acrossômica e consequentemente fertilizar oócitos (BELLIN *et al.*, 1994), visto que o pico 5 que é o de maior afinidade foi o que resultou em maiores taxas de clivagem e produção de blastocistos

Taxas de gestação à primeira inseminação artificial variaram de 2,8 a 69,6 % entre fêmeas inseminadas por touros negativos para a proteína de 30Kda (FFA) e 22,1-91,3% entre fêmeas inseminadas por touros positivos para esta mesma proteína (SPROTT *et al.*, 2000). No presente estudo essa proteína esteve presente nos picos 1, 4 e 5 de afinidade a heparina do plasma seminal, o que sugere que a sua presença

pode estar relacionada às altas taxas de produção de blastocistos.

Conforme observado, o pico 5 que contém as bandas 17, 29 e 56KDa também teve grande associação com as taxas de clivagem e blastocistos. Pode ser que esta proteína de 56 KDa seja a mesma osteopontina relacionada à alta fertilidade em touros Holandeses (KILLIAN *et al.*, 1993)

#### **4.1. Estudo de associação entre as proteínas totais, proteínas ligadoras de heparina e parâmetros andrológicos**

Conforme observado na tab. 8, nenhum dos parâmetros andrológicos apresentou correlação ( $p < 0,05$ ) com proteínas totais, proteínas do pico 3 e proteínas ligadoras de heparina.

**Tabela 8 : Correlação simples e grau de significância entre as proteínas totais, proteínas do pico 3, proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal e parâmetros andrológicos (n=12 )(p<0,05).**

	PLB	P3	P1A	P2A	P3A	P4A	P5A
CE	-0.16901 P=0.5995	-0.04669 P=0.8854	0.06983 P=0.8293	-0.11774 P=0.7155	-0.06771 P=0.8344	-0.07123 P=0.8259	-0.17988 P=0.5759
MOT	-0.29511 P=0.3517	0.01220 P=0.9700	-0.13901 P=0.6666	-0.09527 P=0.7684	-0.10175 P=0.7530	0.13948 P=0.6655	-0.20779 P=0.5170
VIG	-0.45776 P=0.1345	-0.28162 P=0.3752	0.24711 P=0.4387	-0.17484 P=0.5868	-0.22465 P=0.4827	-0.00854 P=0.9790	-0.06339 P=0.8448
D. MA	0.08983 P=0.7813	0.08306 P=0.7975	0.50244 P=0.0960	-0.04201 P=0.8969	0.22720 P=0.4776	-0.21577 P=0.5006	0.10027 P=0.7565
D.TOT	0.08651 P=0.7892	0.28742 P=0.3650	0.20254 P=0.5278	0.27000 P=0.3960	0.23652 P=0.4592	-0.06565 P=0.8394	0.10398 P=0.7478
CAP	-0.35517 P=0.2572	-0.35878 P=0.2521	-0.06351 P=0.8445	0.04051 P=0.9005	-0.41847 P=0.1758	-0.17857 P=0.5787	-0.32802 P=0.2979

Onde: PLB- Proteínas Totais; P3- Proteínas do pico 3 da cromatografia por gel filtração; P1A, P2A, P3A, P4A e P5A são os picos das proteínas ligadoras de heparina do plasma seminal; CE- Circunferência escrotal; MOT- Motilidade; VIG- Vigor; D.MA- Defeitos Maiores; D.TOT- Defeitos Totais; CAP- Classificação Andrológica por Pontos;

Os resultados observados corroboram com os de SALVADOR (2005) que para as características proteínas totais X circunferência escrotal encontraram associações não significativas.

A avaliação física dos espermatozoides e a circunferência escrotal também não foram correlacionadas com o perfil da proteína ligadora de heparina FAA (BELLIN, 1998).

Esses fatos levam a crer que o perfil de proteínas totais não está somente relacionado com proteínas produzidas pelas glândulas sexuais acessórias, mas também proteínas de origem testicular e epididimária (DACHEUX; DACHEUX, 2002).

Apesar da ausência de correlação esses testes de avaliação de fertilidade não devem ser descartados.

Provavelmente essas proteínas têm funções relacionadas ao potencial fertilizante dos espermatozoides, mas não estão correlacionadas com padrões clínicos.

## CONCLUSÕES

Apesar da visualização evidente na cromatografia de um perfil padrão entre as frações de proteínas do plasma seminal, existe variabilidade na concentração de proteínas totais e também entre as frações específicas entre touros da raça Gir, o que é observado entre amostras do mesmo touro. Portanto esta variabilidade pode ser específica de cada indivíduo ou causada por

variáveis que podem ocorrer durante a colheita.

Os riscos de baixas taxas de clivagem e blastocistos podem ser reduzidos usando na fertilização *in vitro* touros que se apresentarem positivos para proteínas ligadoras de heparina e proteínas totais.

O entendimento da composição de proteínas do sêmen pode ser diretamente aplicável às condições de laboratório, e resultar em maior eficiência na produção de bezerros.

E no futuro esse entendimento pode gerar algumas tecnologias, como sequenciamento dessas proteínas ou até mesmo o desenvolvimento de kits para diagnóstico dessas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANGASAMY, A.; SINGH, L.P.; AHMED, N. *et al.* Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* v. 90, p. 243-254, 2005.
- ASSUNÇÃO, T.I.; FONTES, W.; SOUZA, M.V. *et al.* Perfil de proteínas do plasma seminal de touros Nelore e sua relação com a fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v. 27, n.2, p.187-188, 2003.
- 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. *J. Anim. Sci.* v. 72, p.2441-2448, 1994.
- BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. *et al.* Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J. Anim.Sci.* v. 76, p. 2032-2039, 1998.
- BOUJRAD, N. ; OGWUEGBU, S.O.; GARNIER, M. *et al.* Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science.* v.268, p. 1609-1612, 1995.
- DACHEUX, J.L. ; DACHEUX, F. Protein secretion in the epididymis. *In: The Epididymis: From molecules in clinical practice.* Ed: by Robaire and Hinton, p. 151-167, 2002.
- EDWARDS, D.R.; BEAUDRY, P.P.; LAING, T.D. *et al.* The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int. J. Obes.* , v.20, p. 9-15, 1996.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) Promotes Bull sperm binding to oviductal epithelium *in vitro* and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol.Reprod.* v. 69, p. 809–815, 2003.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. *et al.* Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen pela de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Sci. Vet.* v. 31, n.1, p. 21-30, 2003.
- KENNEDY, C.G.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. The effects of embryo quality of freezing on subsequent development of thawed low embryo. *Theriog.*, v.19, p.823-832, 1983.
- KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A. ; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* v. 49, p.1202-1207, 1993.
- LARSON; B.L.; SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma. Preliminary and eletrophoretics studies. *J.Biol.Chem.*, v.206, n.2, p. 741-749, 1954.
- LOWRY, O.H. ROSENBROUGH, N.J.; FARS, A.L. *et al.* Proteins measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* V. 193, p. 265-275, 1951.
- MANN, T.; MANN, C.L. *Male reproductive function and semen.* New York. Ed: Springer-Verlag, 1981.



MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

MILLER, D.J., WINER, M.A., AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* v.42, p. 899-915, 1990.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. *et al.* Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Therio.* v.25, p. 591-600, 1986.

RAMOS, A.A. Produção *in vitro* de embriões após punção folicular em vacas Gir submetidas à estimulação hormonal. 2004. 79p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RONCOLETTA, M. Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros. 2003. 104f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências

Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

SALVADOR, D.F. Perfis cromatográfico e eletroforético de proteínas com afinidade a heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelamento do sêmen e reação acrossômica induzida. 2005. 56p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAS. *User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 2002.

SPROTT, L.R.; HARRIS, M.D.; FORREST, D.W.; *et al.* Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. *J. Anim. Sci.* v. 78, p. 795-798, 2000.

## CAPÍTULO 2

### ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS ANDROLÓGICOS E FERTILIDADE *IN VITRO* EM TOUROS DA RAÇA GIR

#### RESUMO

FOLHADELLA, I.M. **Associação entre parâmetros andrológicos e fertilidade *in vitro* em touros da raça Gir.** [Associations among andrological parameters and *in vitro* fertility in Gyr bulls]. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Desde a década de 50, diversos pesquisadores têm testado touros quanto ao potencial reprodutivo em nível de campo e correlacionado com parâmetros de fertilidade *in vitro* (taxas de clivagem, de blastocisto e de blastocistos eclodidos), com resultados bastante divergentes. O objetivo do presente estudo foi de verificar possíveis associações entre parâmetros andrológicos, espermáticos e de fertilização *in vitro* em touros da raça Gir. Cerca de oitenta touros foram submetidos ao exame andrológico, bem como do sêmen, conforme metodologia preconizada pelo CBRA (1998). O exame andrológico consistiu de exame clínico, medida de circunferência escrotal (CE) e avaliação do sêmen (motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais, turbilhonamento e concentração) . Pelo uso do exame andrológico e da classificação andrológica por pontos (CAP)(VALE-FILHO, 1989) modificada, foi possível pontuar e classificar os touros quanto ao seu potencial reprodutivo em satisfatório (acima de 60 pontos), questionável (abaixo de 60 pontos) e insatisfatório (exame clínico anormal), permitindo a identificação precoce de touros com infertilidade ou subfertilidade. O sêmen de nove touros considerados como sendo de melhor congelabilidade (entre eles animais classificados como satisfatórios e questionáveis) foram utilizados na fecundação *in vitro*, após descongelação a 37°C por 30 segundos. Foram avaliadas as taxas de clivagem e de blastocistos, respectivamente às 72 e 168-196 horas pós-fecundação, de acordo com KENNEDY *et al.* (1983). As associações entre os parâmetros andrológicos, espermáticos, CAP e fertilização *in vitro* foram feitas pela regressão linear simples. Os resultados da associação entre as características tiveram média magnitude, e também positiva. Para associação média considerou-se de 0,33 a 0,65. As regressões significativas ( $p < 0,10$ ) foram motilidade X taxa de clivagem e motilidade X taxa de blastocisto. Concluiu-se que, como poucos parâmetros andrológicos avaliados neste experimento possuíram associações significativas entre si, não foi possível estabelecer um método eficiente para predição da fertilidade *in vitro*. Outros estudos são necessários nesta área.

**Palavras chave:** Características andrológicas, fecundação *in vitro*, fertilidade, touros Gir

## ASSOCIATIONS AMONG ANDROLOGICAL PARAMETERS AND IN VITRO FERTILITY IN GYR BULLS

FOLHADELLA, I.M. **Associação entre parâmetros andrológicos e fertilidade *in vitro* em touros da raça Gir.** [Associations among andrological parameters and *in vitro* fertility in Gyr bulls]. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

### ABSTRACT

Since the 50<sup>th</sup>, several researchers have tested bulls to breeding potential in field and its correlation with parameters of *in vitro* fertility (cleavage, blastocysts and hatched blastocysts rates), with divergent results. The aim of the present study was to verify possible associations among andrological, spermatic and *in vitro* fertilization parameters in Gyr bulls. About eighty bulls were submitted to breeding soundness and physical evaluations according to CBRA (1998). Breeding soundness evaluation was carried through clinical examination, measure of scrotal circumference (SC) and evaluation of the semen to motility, vigor, major, minor and total defects, cloud and concentration. Through breeding soundness evaluation and Andrological Classification by Points (ACP) (VALE-FILHO, 1989) modified, were possible to classify reproductive potential of bulls in satisfactory (above 60 points), questionable (below 60 points) and unsatisfactory breeders (abnormal clinical examination), allowing the earlier identification of bulls with infertility or subfertility. Bulls semen (n=9) with better freezability (satisfactory and questionable classification) were used in *in vitro* fertilization after thawed at 37°C per 30 seconds. The cleavage and blastocyst rate were evaluated, respectively, with 72 and 168-196 hours after fertilization, according to KENNEDY *et al.* (1983). Andrological, spermatoc characteristics, ACP and *in vitro* fertilization were analyzed by Simple Linear Regression. The results were of mean magnitude, and also positive. For mean association was considered 0.33 to 0.65. Significant regression ( $p < 0,10$ ) was motility X cleavage rate and motility X blastocyst rate. We concluded that as few andrological parameters evaluated in this research showed significant associations among them, exist difficulty to establish a method of prediction *in vitro* fertility based on these characteristics. Others studies are necessary in this area.

**Key-words:** Andrological characteristics, *in vitro* fertilization, fertility, Gyr bulls

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica utilizada para a obtenção e multiplicação de animais geneticamente de interesse ou em extinção, podendo ainda ser utilizada como uma importante ferramenta na clonagem, manipulação de genes e transferência nuclear.

Com a difusão da produção de embriões em laboratório, elevou-se a necessidade de provas a serem utilizadas no controle de qualidade, tanto dos ovócitos quanto dos espermatozoides utilizados.

É bem sabido, que ao nível de laboratório, existe um efeito touro-específico na taxa de clivagem e no desenvolvimento embrionário. É possível encontrar touros que produzem embriões com maior competência para se desenvolver ao estágio de blastocistos ou para sobrevivência pós-transferência. Algumas diferenças entre touros podem estar relacionadas no modo como as células espermáticas reagem aos fatores capacitantes em meio de cultivo. É possível, contudo, que existam genes transmitidos pelo touro e/ou vaca que determinam o sucesso do desenvolvimento embrionário (HANSEN, 2006).

Desde a década de 50, diversos experimentos vêm testando touros e correlacionando seus parâmetros de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, com resultados bastante divergentes. Taxas de fertilidade *in vitro* têm sido correlacionadas com taxas de não-retorno com sêmen congelado e taxa de concepção em monta natural. A maioria dos experimentos indica que os resultados de fertilização *in vitro* são úteis como indicadores da fertilidade de touros a campo (PARKINSON, 2004). Entretanto, alguns trabalhos não observaram relação (SCHNEIDER *et al*, 1999).

O objetivo do presente estudo foi associar parâmetros andrológicos com a fertilidade *in vitro* em touros da raça Gir.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Local de Execução do Estudo

O trabalho foi realizado no laboratório de Reprodução Animal da Embrapa/Gado de Leite - Juiz de Fora/M.G, e em fazendas no estado de Minas Gerais.

#### 1.1. Exame Andrológico

Avaliaram-se cerca de 80 touros da raça Gir. Para o exame andrológico utilizou-se a técnica segundo o Manual de exame andrológico do CBRA (1998).

Desses animais, nove, com diferentes perfis andrológicos (satisfatório e questionável), mas que apresentaram boa congelabilidade do sêmen, foram selecionados, e o sêmen utilizado na fecundação *in vitro*. Foram utilizados seis animais em triplicata, um em duplicata e dois com uma única repetição.

#### a) Congelamento do sêmen

Foi realizado conforme descrição no capítulo 1.

### 2. Classificação dos Touros Quanto à Aptidão Reprodutiva Baseada no CAP

Para classificar os touros quanto ao seu potencial reprodutivo foi utilizada a Classificação Andrológica por Pontos (CAP) de acordo com a tabela abaixo (Tab. 9), com algumas modificações. Para valores de motilidade, vigor, e defeitos maiores e totais diferentes, usou-se a média.

**Tabela 9:** Classificação Andrológica por Pontos (CAP) para touros, baseada na circunferência escrotal e características do sêmen.

	Excelente	Bom	Regular	Fraco
Motilidade espermática				
De massa (1-5)	Vigor 5	Vigor 4-5	Vigor 4	Vigor 3 (0-3)
Individual (%)	Acima 70%	60-70%	50-60%	Abaixo 50%
Total de pontos	20	12	10	3
Morfologia espermática				
Defeitos maiores	Abaixo 10%	10-19%	20-29%	Acima 29%
Total de defeitos	Abaixo 25%	26-39%	40-59%	Acima 59%
Total de pontos	40	25	10	3
Circunferência escrotal Idade (meses)				
<i>Bos taurus</i>				
6-12	Acima 30	26 a 30	Abaixo 26	Abaixo 26
12-14	Acima 34 cm	30-34 cm	Abaixo 30 cm	Abaixo 30 cm
15-20	Acima 36 cm	31-36 cm	Abaixo 31cm	Abaixo 31 cm
21-30	Acima 38 cm	32-38 cm	Abaixo 32 cm	Abaixo 32 cm
>30	Acima 39 cm	34-39 cm	Abaixo 34 cm	Abaixo 34 cm
<i>Bos indicus</i>				
18-24				
24-29				
30-41				
42-60				
>60				
Total de pontos	40	24	10	10

Fonte: Adaptado de VALE FILHO (1988).

### 3. Fecundação *in vitro* (FIV)

Foi realizada conforme o procedimento descrito no capítulo 1.

#### 3.1. Avaliação da motilidade pós-descongelamento

As palhetas de sêmen utilizadas na fecundação *in vitro* foram descongeladas em banho-Maria a 37°C por 30 segundos. Uma gota de sêmen foi adicionada à lâmina previamente aquecida a 37°C e com uma lamínula, e observou-se em microscopia ótica com aumentos de 100 e 400 vezes. A motilidade foi então classificada entre 0 e 100%.

#### 3.2. Avaliação da motilidade pós-centrifugação

Após o *swim up*, o sêmen sofreu centrifugação a 700G e uma gota de sêmen foi adicionada à lâmina previamente aquecida a 37°C e com uma lamínula, e observou-se em microscopia ótica com aumentos de 100 e 400 vezes. A motilidade foi então classificada entre 0 e 100%.

### 4. Análise Estatística

As associações entre circunferência escrotal, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos totais, classificação andrológica por pontos (CAP), taxa de clivagem e taxa de blastocisto foram dadas pela Regressão Linear Simples usando o programa estatístico SAS (2002). Para os dados de

taxa de clivagem e taxa de blastocistos usou-se a média das repetições.

Para as associações entre motilidade pós-descongelamento, motilidade pós-centrifugação e taxa de clivagem foram obtidas pela Análise de Regressão (EXCEL, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Associação Entre Motilidade e taxa de clivagem

**Tabela 10:** Associações entre motilidade pós descongelamento e pós-centrifugação com parâmetros de fertilidade *in vitro*

	Característica avaliada	Significância (P)	R <sup>2</sup>
Motilidade pós-descongelação	Taxa de clivagem	0,191	0,093
Motilidade pós-centrifugação	Taxa de clivagem	<b>0,015</b>	<b>0,262</b>

Para a associação entre Motilidade Pós-centrifugação X taxa de clivagem o resultado foi significativo ( $p < 0,015$ ), entretanto de baixa magnitude. De forma geral a motilidade é o teste mais utilizado em amostras de sêmen fresco ou congelado para qualquer espécie de animais domésticos (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

ZHANG *et al.* (1999) encontraram resultados semelhantes a este estudo. Estes demonstraram correlações significativas entre testes de sêmen *in vitro* (concentração espermática total e motilidade) com testes de ligação à zona pelúcida e produção *in vitro* de blastocistos. Entretanto, a baixa fertilidade ocorre até quando amostras de sêmen congelado/descongelado têm número adequado de espermatozóides móveis (AMANN, 1989; PACE *et al.*, 1981).

As associações gerais entre as características laboratoriais avaliadas estão descritas na tab. 10.

Os resultados da associação tiveram baixa magnitude, significativo, e também positivo e não significativo. Para associação baixa, consideraram-se valores menores de 0.33. A associação que não foi significativa ( $P > 0,05$ ) foi: Motilidade pós-descongelamento X taxa de clivagem.

### 2. Associação Entre Parâmetros Andrológicos *in vivo* e fertilidade *in vitro*

As regressões entre os parâmetros de fertilidade *in vivo* e *in vitro* estão descritas na tab. 11.

Os resultados da associação entre as características tiveram média magnitude, e também positiva. Para associação média consideraram-se valores de 0.33 a 0.65. As regressões significativas ( $p < 0,10$ ) foram motilidade X taxa de clivagem e motilidade X taxa de blastocistos.

**Tabela 11** : Associações entre parâmetros de fertilidade *in vivo* e *in vitro*

	CE	MOT	VIG	DMA	DTOT	CAP
TxCliv	0,059 P=0,528	<b>0,419</b> <b>P=0,060</b>	0,190 P=0,241	0,043 P=0,594	0,002 P=0,918	0,043 P=0,591
TxBlast	0,097 P=0,414	<b>0,339</b> <b>P=0,100</b>	0,153 P=0,297	0,205 P=0,221	0,039 P=0,612	0,249 P=0,171

Onde: CE- Circunferência escrotal; MOT- Motilidade; VIG- Vigor; DMA- Defeitos Maiores; DTOT- Defeitos Totais; CAP- Classificação Andrológica por Pontos; TxCliv – Taxa de Clivagem; TxBlast – Taxa de blastocistos

Segundo RODRIGUEZ-MARTINEZ (2000), a avaliação da função espermática em amostras de sêmen apresenta resultados com maior eficiência para a inseminação artificial do que para a fecundação *in vitro*.

A interação imperfeita entre espermatozoides e zona pelúcida é a maior causa para baixas taxas de fertilização na FIV em humanos, e está associada com defeitos nos espermatozoides e não nos oócitos (LIU *et al.*, 2000). LIU ; BAKER (2002) relataram que a proporção de espermatozoides que penetram a zona pelúcida, o número de espermatozoides que ligam-se a zona pelúcida e o percentual de espermatozoides com morfologia normal estar fortemente relacionados às taxas de fertilização *in vitro*, o que não foi observado em nosso estudo.

Contudo, os efeitos da morfologia espermática na fertilização e desenvolvimento embrionário são influenciados por características individuais

dos touros, incluindo sua resposta à capacitação *in vitro* (WALTERS *et al.*, 2005)

Também diferente dos resultados observados no presente trabalho, MARQUANT-LE GUIENNE *et al.* (1990) demonstraram que a fecundação *in vitro* pode ser um instrumento valioso para a avaliação da fertilidade *in vivo* (ZHANG *et al.*, 1999). Todavia, nenhum dos parâmetros considerados (taxa de clivagem e taxa de blastocistos), que estão relacionados com os touros individualmente pode ser utilizado como boa estimativa da fertilidade *in vivo* do touro (PUGLISI *et al.*, 2004). Diferentes ejaculados de um mesmo touro diferem nas suas respostas aos testes de fertilização, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ZHANG *et al.*, 1998)

## CONCLUSÕES

A avaliação andrológica não demonstrou ser um bom método para seleção de touros superiores para utilização na fecundação *in vitro*.

As diferenças entre touros encontradas na fertilização *in vitro* são provavelmente decorrentes da composição química do plasma seminal e membrana espermática e em função das diferenças individuais entre touros.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* v. 10, p. 89-98, 1989.
- HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle—an overview. *Theriog.* v. 65, p. 119-125, 2006
- LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* v. 15, p. 702-708, 2000.
- LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J. Androl.* v.4, p. 281-285, 2002.
- MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M. *et al.* Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* v. 30, p. 259-266, 1990.
- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J.; ELLIOT, F.L. *et al.* Effect of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5ml French straws. *J. Anim. Sci.* v. 53, p. 693-701, 1981.
- PUGLISI, D.; BALDUZZI, D.; GALLI, A. *In vitro* sperm penetration speed and its relationship with in vivo bull fertility. *Reprod. Dom. Anim.* v. 39, p. 424-428, 2004
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: Chenoweth PJ, editor. Topics in bull fertility. Ithaca NY: International Veterinary Information Service; 2000. p. A0502-600 (<http://www.ivis.org>).
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. v. 16, 2005, Goiânia, GO. Anais:Palestras.
- SAS. *User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 2002.
- SCHNEIDER, C.S.; ELLINGTON, J.E.; WRIGHT, R.W. JR.: Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriog.* v. 51, p. 1085-1098, 1999.
- SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPIANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSPF: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriog.* v. 45, p. 633-642, 1996.
- WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G. *et al.* Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. *Theriog.* v. 63, p. 1925-1937, 2005
- VALE FILHO, V.R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 7, 1988. Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: CBRA, 1988, v.1, p. 418-438.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. The effect of ejaculates on the *in vitro* and *in vivo* fertility of young AI bulls. In: Gametes: Development and function. Sero Symposium, Rome, p. 623.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIN, N. *et al.* Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-program. *Int. J. Androl.*, v. 22, p. 253-260, 1999.

