

USO DA ELETROFORESE NO DIAGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE SÊMEM DE BOVINOS

Terezinha Aparecida M. Gomes CASTRO

Professora Doutora, Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva, SP.

Rita M. Ladeira & CASTRO JR., Fernando Gomes de PIRES

Pesquisador Científico, Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 60, 13460-000, Nova Odessa, SP.

RESUMO

Foram utilizados oito touros do ecotipo Mantiqueira com idade média de 3,5 anos, pertencentes à Estação Experimental de Zootecnia de Nova Odessa/SP. As amostras de sêmem colhidas pelo processo de Vagina Artificial e centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C Aliquotas do plasma seminal foram usadas para eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A análise eletroforética mostrou variação nas frações protéicas das amostras provenientes de animais com distúrbios na esfera reprodutiva.

Palavra chave: sêmem; proteínas; eletroforese.

ABSTRACT

Eight Mantiqueira bulls, with average age 3,5 years old at "Estação Experimental de Zootecnia de Nova Odessa/SP" were used. The semen was collected with artificial vagina. The whole ejaculation was centrifuged at 2500 rpm for 15 minutes at 4°C and the seminal plasma was used for electrophoresis in polyacrilamide gel 10%. The electrophoretical analysis showed variation in the proteic patterns of the samples from animals with problems in reproductive tract.

1. INTRODUÇÃO

A eletroforese vem sendo usada desde a década de 50 para padronizar e identificar os componentes protéicos do plasma seminal, procurando identificar os componentes bioquímicos responsáveis por patologias ou diferenciação dos animais quanto ao grau de fertilidade. O estudo das proteínas seminais se deve em parte à observação de que a infertilidade em mulheres poderia ser de causa imunológica e se as proteínas são os antígenos responsáveis pela ocorrência de infertilidade, tornou-se necessária uma identificação mais profunda do teor protéico, tanto para diagnóstico como para fins terapêuticos. Dependendo da espécie, o teor protéico do plasma seminal de mamíferos varia de 3 a 7% (MANN, 1988). Os estudos têm mostrado que proteínas aderidas à membrana espermática são semelhantes às aquelas existentes no plasma seminal e isto sugere que estas proteínas são provenientes da interação plasma seminal e célula espermática sendo, então, importantes no processo de fertilização. Estudos realizados por KILLIAN, G. J. e col (1993) mostraram que o conteúdo do plasma seminal pode influenciar a fertilidade dos machos. Os autores sugeriram ainda a existência de quatro frações protéicas associadas à fertilidade. Utilizando-se de técnicas eletroforéticas em gel de acetato de celulose, ROCHA e col (1974) analisaram o perfil eletroforético de amostras de plasma seminal de touros com diferentes anomalias reprodutivas e observaram variações estatísticas significativas no teor das diferentes frações protéicas. CASTRO e col (1986) analisando as proteínas seminais de bovinos da raça Mantiqueira em regime de colheita de sêmem encontraram um teor protéico variando de 4,8 a 5,8g/ 100ml e presença de oito frações em eletroforese em gel de poliacrilamida. AMANN e col (1987) relataram que a motilidade e fertilidade do sêmem de equinos congelado-descongelado variavam amplamente entre animais e esta variação era devida em parte à composição protéica visto que por eletroforese em PAGE-SDS duas das frações protéicas detectadas apresentaram correlação significativa entre a quantidade de proteína e motilidade espermática. Tendo em vista a importância das proteínas na avaliação da qualidade do sêmem, o presente trabalho teve como objetivo a análise eletroforética das proteínas seminais de touros do ecotipo Mantiqueira tanto em regime de colheita de sêmem como em animais com distúrbios reprodutivos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados oito animais do ecotipo Mantiqueira, com idade média de 3,5 anos pertencentes à Estação Experimental de Zootecnia de Nova Odessa, São Paulo.

O sêmem foi colhido através de vagina artificial e em seguida centrifugado a 2500rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (plasma seminal) foi retirado cuidadosamente e resfriado a 5°C onde foi mantido até o momento do uso. A concentração protéica foi determinada em todas as amostras de acordo com o método do Biureto modificado usando a soroalbumina bovina como padrão (URIEL, 1961). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 10% de acordo com a técnica de GORDON (1965) pelo método horizontal em placas de 20x20cm durante 6 horas a 25mA. Foram aplicadas cerca de 100ug de cada amostra no gel e após a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue -R 250.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise do gel (Figura 1) e densitometria (Figura 2) pode-se observar as diferenças entre os perfis eletroforéticos das diferentes amostras de plasma seminal.

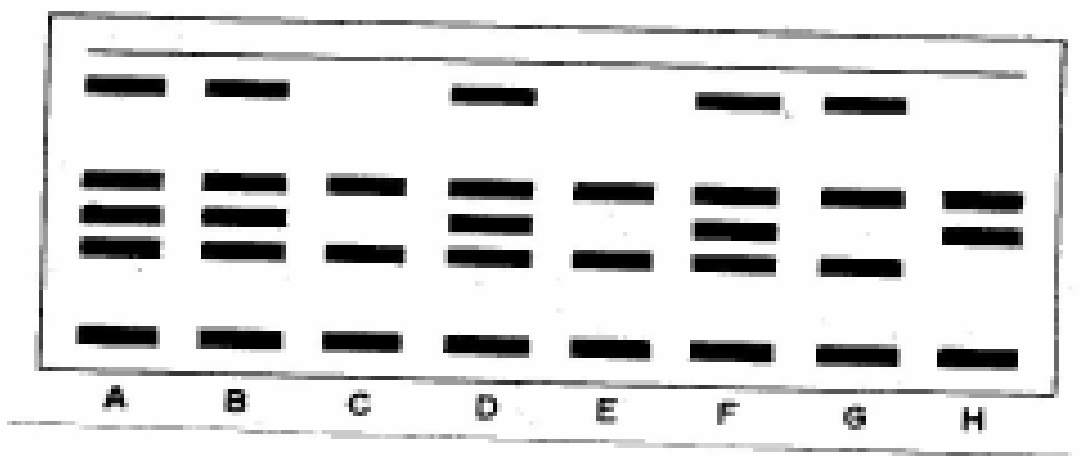


Figura 1- Eletroforese das proteínas seminais de bovinos do ecotipo Mantiqueira.

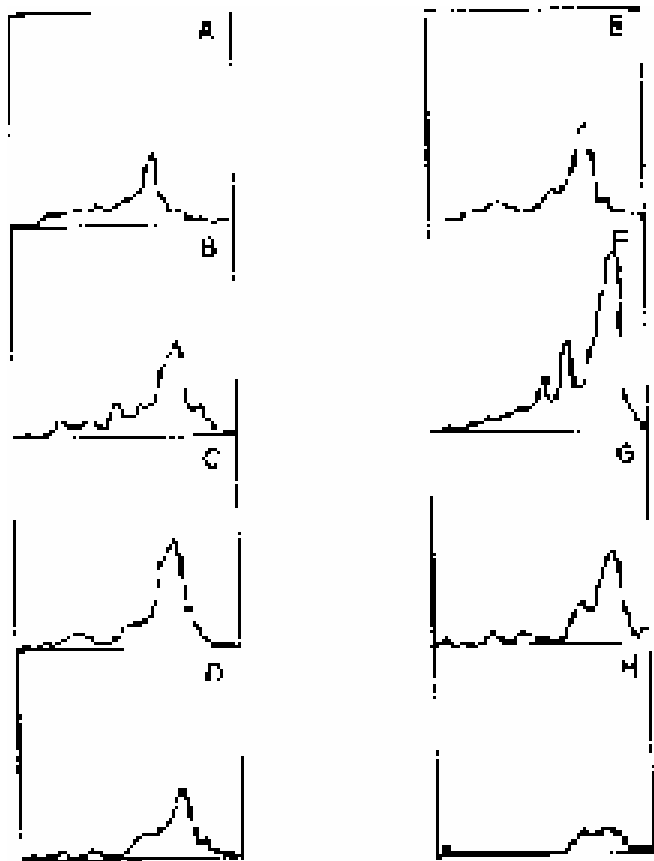


Figura 2- Densitometria das proteínas seminais de sêmem de bovinos do ecotipo Mantiqueira.

A, B, D e F – animais normais.

C e E – animais com problemas reprodutivos.

G – animal com maturidade sexual retardada.

H – animal com degeneração testicular.

Os resultados após eletroforese em gel de poliacilamida mostram uma variação entre as diferentes frações protéicas principalmente entre as sub-frações da globulina (a, b e d). Já a albumina é uma fração presente em todas as amostras. As amostras A, B, D e F apresentam um perfil eletroforético semelhante ao obtido por CASTRO e col (1986) em amostras de plasma seminal de touros em regime de colheita de sêmem para fins de Inseminação Artificial. As amostras C e E correspondem a animais com problemas na esfera reprodutiva e que apresentam alterações na porcentagem de células vivas com valores de 50 a 60% e motilidade progressiva de 2 (características físicas). Observou-se ainda alterações a nível de cabeça dobrada ou enrolada com retenção de gota protoplasmática distal e fraturas da peça intermediária (características morfológicas). Estas amostras, quando submetidas a processos de congelamento para criopreservação apresentaram também problemas de congelabilidade.

Na amostra G, correspondente a touro com maturidade sexual retardada, observou-se praticamente ausência da fração b-globulina enquanto que a amostra H, oriunda de animal com degeneração testicular, houve uma diminuição significativa da globulina total.

Estes dados corroboram a importância das proteínas na avaliação da qualidade do sêmem, como visto por ROCHA e col (1974) analisando o perfil eletroforético de amostras de plasma seminal de touros com distúrbios reprodutivos; AMANN e col (1987) analisando as diferenças na composição das proteínas seminais de garanhões com motilidade espermática variável e HIRAO e col (1986) analisando as características eletroforéticas das proteínas do fluido seminal coletado nas diferentes regiões do epidídimo de reprodutores suínos cujas variações provavelmente estejam relacionadas com a maturação funcional do espermatozóide.

4. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a eletroforese é uma técnica que pode ser usada tanto na padronização de amostras de sêmem de bovinos sadios como no diagnóstico precoce de alterações na esfera reprodutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P. Avaliation of sperm quality can we pick the winners? In: Anais do 11º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 1995. p. 206-212.

AMANN, R. P.; CRISTAWELL, M. J.; SOUIRES, E. L. Proteins in stallion seminal plasma. J. Reprod. Fert. Suppl. 35 p. 11-13, 1987.

CASTRO, T. A. M. G.; MACHADO, E. C. P.; LIEPIN, N. R. Níveis de proteína total e eletroforese das proteínas do plasma seminal de bovinos do ecotipo Mantiqueira. Nova Odessa - SP: B. Industr. Anim. 43 (1): 37-44, jan. / jun. 1986.

CASTRO, T. A. M. G.; PIRES, R. M. L.; CASTRO JÚNIOR, F. G. Características morfológicas e físico-químicas do sêmem de bovinos do tipo tropical. Anais da 38ª Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 20-25 de julho de 2001, Piracicaba, SP.

GORDON, A. H. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. In: WORK, T. S. & WORK, E. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Amsterdam, North Holland, 1969, v.1, p. 1-45.

HIRAO, K.; IZUKA, J.; KOYAMA, H. Electrophoretical characteristics of boar epididimal fluid protein. Journal of the College of Dayring, Hokaido, 19 (2), 303, 1986.

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

MANN, T. The Biochemistry of semen and of the Male Reproductive Tract. 2ª ed. London: Methuen & Co Ltd, 1988.

URIEL, J. Interaction entre des protéines sériques et des cations métalliques. Biol. Med., Paris, 50, p. 27-30, 1961.