

Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações com precocidade sexual em bovinos da raça Nelore doadores de sêmen

Transferrin and albumin polymorphism and its correlation with sexual maturity in bulls

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Paulo Henrique Fransceschini
Departamento de Reprodução
Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias da UNESP
Campus de Jaboticabal
Rodovia Carlos Tonanni, km 5
14870-000 – Jaboticabal – SP
e-mail: roncolet@convex.com.br

1 - Departamento de Reprodução
Animal da Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias da UNESP,
Jaboticabal – SP
2 - Lagoa da Serra Inseminação
Artificial, Sertãozinho – SP

Erika da Silva Carvalho MORANI¹; Marcelo RONCOLETTA¹; Paulo Henrique FRANSCSCHINI¹;
Vera Fernanda Martins Hossepian de LIMA¹; Lúcia Helena RODRIGUES²;
Marcelo Almeida OLIVEIRA²; Carlos da SILVA²

RESUMO

O presente estudo utilizou 16 animais *Bos taurus indicus* da raça Nelore doadores de sêmen. Estes animais foram divididos em grupos de acordo com a idade em que o sêmen congelou pela primeira vez. O grupo I, considerado precoce, apresentou animais com sêmen passível de congelamento com idade inferior a 20 meses. O grupo II, composto por animais que tiveram o sêmen congelado com idade entre 21 e 26 meses. E o grupo III, tido como tardio, composto por animais com sêmen congelável com idade superior a 27 meses. Para análise dos padrões eletroforéticos da transferrina e albumina, amostras de sangue foram colhidas em tubos heparinizados e submetidos a centrifugação de 2.500 G por 15 minutos para separação do plasma sanguíneo. As amostras de plasma sanguíneo foram processadas para que a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida pudesse ser realizada. Para a coloração do gel, usou-se Coomassie Brilliant Blue. Após análise dos padrões eletroforéticos da transferrina e albumina, observou-se que não houve relação detectável entre os fenótipos da albumina e precocidade sexual de touros doadores. Entretanto, em relação à transferrina, foi possível sugerir uma associação entre o alelo T^P com touros portadores de sêmen congelável precocemente ou medianamente em termos de idade à congelamento.

UNITERMOS: Transferrina; Albumina; Maturidade sexual; Sêmen; Congelabilidade.

INTRODUÇÃO

Eletroforese é uma técnica que proporciona a visualização e identificação dos componentes protéicos dos líquidos orgânicos. A análise e a interpretação visando estabelecer as possíveis variações existentes podem viabilizar a detecção de sistemas polimórficos associando-os a características de interesse econômico.

Identificar os animais que sejam comprovadamente superiores geneticamente para características economicamente viáveis é de grande valia, já que acelera o processo de seleção. Buscar touros doadores de sêmen que sejam precoces sexualmente, ou seja, que venham a apresentar sêmen congelável com pouca idade, além de ser de grande interesse econômico para os centros de inseminação artificial, proporciona um importante passo para o desenvolvimento do Melhoramento Genético Animal.

A associação de características desejáveis com os diversos sistemas polimórficos que constituem o sangue possibilita a detecção de marcadores bioquímicos e/ou moleculares. A transferrina e a albumina são dois entre estes diversos sistemas polimórficos. Na tentativa de correlacionar a transferrina com potencial gametogênico dos testículos e número de Células de Sertoli, Bernadtsen *et al.*⁸ demonstraram haver relação positiva entre os níveis de transferrina e a produção espermática.

Analisando outras características, como peso ao nascer e produção à primeira lactação de animais mestiços, Mandal; Dattagupta¹⁴ notaram que, para o fenótipo da albumina, vacas portando o fenótipo Alb AA (Alb FF) tiveram maior peso ao nascer e maior produção de leite à primeira lactação quando comparadas às vacas com fenótipo Alb BB (Alb SS).

Dentro do contexto abordado, o presente trabalho objetivou relacionar o polimorfismo da transferrina e albumina com a idade à primeira congelamento do sêmen de touros da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 16 animais *Bos taurus indicus* da raça Nelore doadores de sêmen, mantidos sob as mesmas condições de manejo e nutrição, numa Central de Inseminação Artificial. Estes animais foram divididos em 3 grupos, de acordo com a idade em que o sêmen congelou pela primeira vez. O grupo I, considerado precoce, apresentou animais com sêmen passível de congelamento com idade inferior a 20 meses. O grupo II foi composto por animais que tiveram o sêmen congelável com idade que variou entre 21 e 26 meses. E o grupo III, tido como tardio, foi composto por animais que tiveram o sêmen congelado com idade superior a 27 meses.

Objetivando analisar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas, albumina e transferrina, o sangue dos animais foi coletado em tubos heparinizados e posteriormente centrifugados a 2.500 G por 15 minutos para separação do plasma sanguíneo. O sangue foi processado segundo a metodologia descrita a seguir:

1- Transferrinas:

Das amostras analisadas, separaram-se 200 ml de plasma sanguíneo e adicionaram-se 800 ml de Solução de Rivanol a 0,04% (2-ethoxy-2,9-diamino-acridinlactato), a fim de se ter melhor definição das bandas de transferrinas conforme citação de Klister *et al.*¹². Posteriormente, foram submetidas a repouso por aproximadamente dezoito horas a uma temperatura de 4°C, e subseqüentemente feita a centrifugação a 2.500 G por quinze minutos para obtenção do sobrenadante. Deste, tomou-se 1,0 ml, ao qual foi adicionado 0,5 g de Dextrose para prevenir a suspensão da amostra no tampão eletrodo. Foram aplicados 20 ml da amostra em gel de poliacrilamida à concentração de 7,5%.

2- Albumina:

Separaram-se 10 ml de plasma sanguíneo e adicionaram-se 490 ml de uma solução de Dextrose a 40%. Aplicaram-se 4 ml da amostra em gel de poliacrilamida a 10%.

O procedimento visando a determinação dos padrões eletroforéticos das proteínas sanguíneas realizou-se pelo método

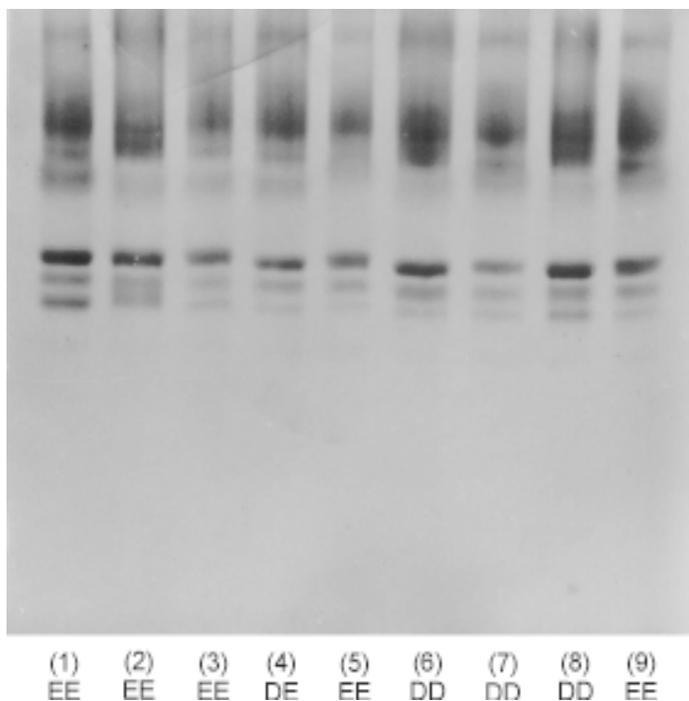


Figura 1

Eletroferograma das transferrinas do sangue proveniente de touros *Bos taurus indicus*, doadores de sêmen, fracionadas por eletroforese vertical, tendo como meio suporte o gel de poliacrilamida a 7,5%. Classificando em termos de idade à congelamento, os animais 1 e 2 são considerados tardios; animais 3, 4, 5 e 6 são medianos; e animais 7, 8 e 9 são precoces.

vertical, tendo o gel de poliacrilamida como meio suporte em concentração de 7,5% para a transferrina e 10% para a albumina. Durante a corrida, a constante de 25 mA foi fixada.

A coloração do gel foi feita com Coomassie Brilliant Blue 250-R (MERCK) a 5%. Após evidenciar as bandas, estas foram analisadas e interpretadas de acordo com os dados obtidos na literatura.

RESULTADOS

Através da utilização da técnica de eletroforese, foi possível observar o polimorfismo das duas proteínas estudadas, a albumina e a transferrina.

Após análise dos padrões eletroforéticos das transferrinas, notou-se a presença de três fenótipos Tf DD, Tf DE e Tf EE (Fig. 1 e 2), resultantes da combinação de dois alelos codominantes, Tf^D e Tf^E.

Avaliando os padrões eletroforéticos da albumina, evidenciou-se a presença de apenas dois fenótipos Alb AB e Alb BB (Fig. 3 e 4), determinados pela combinação de dois alelos codominantes, Alb^A (Alb^F) e Alb^B (Alb^S). Os resultados estão dispostos na Tab. 1.

DISCUSSÃO

A partir da descoberta do polimorfismo das transferrinas nos bovinos feita por Ashton³ e por Hickman; Smithies¹⁰, este siste-

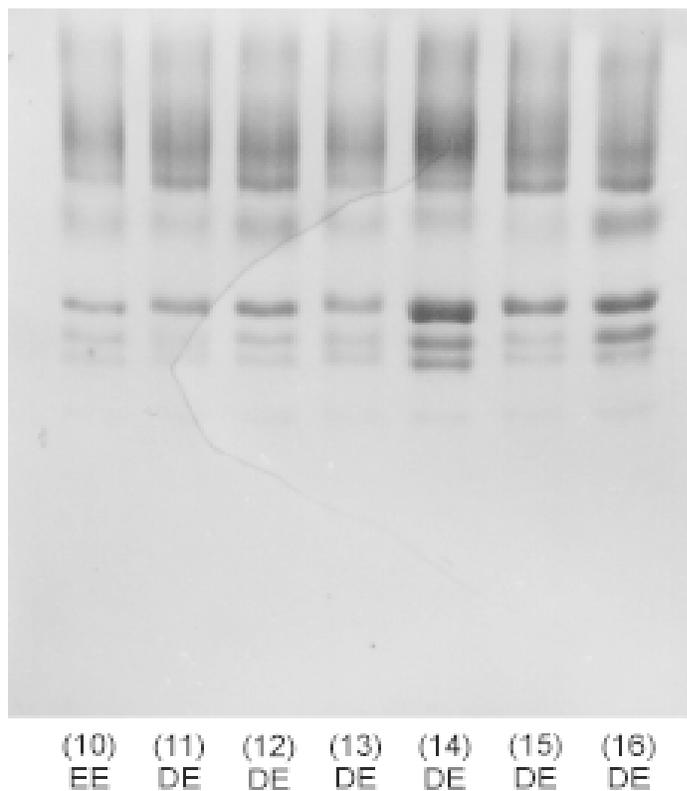
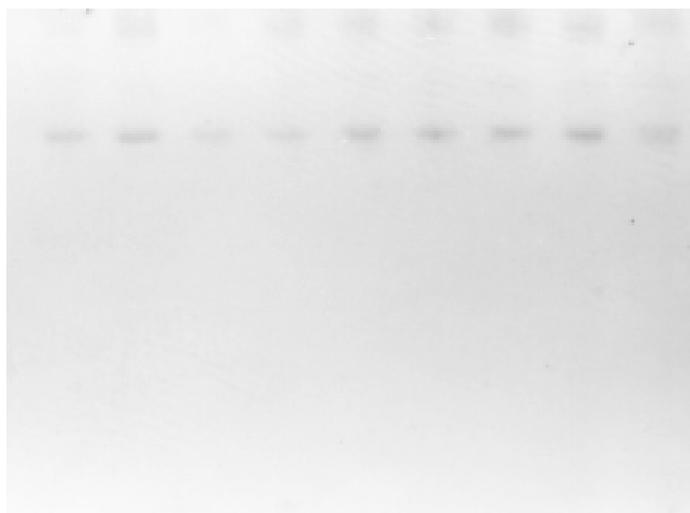


Figura 2

Eletroferograma das transferrinas do sangue proveniente de touros *Bos taurus indicus*, doadores de sêmen, fracionadas por eletroforese vertical, tendo como meio suporte o gel de poliacrilamida a 7,5%. Classificados em termos de idade à congelamento, os animais 10, 11, 13, 14 e 16 são medianos e os animais 12 e 15 são precoces.

ma tem sido intensamente estudado. Em decorrência do polimorfismo, diversos autores estudaram e descobriram os alelos presentes neste sistema: Tf^A, Tf^D e Tf^E (Ashton³ e Hickman; Smithies¹⁰); Tf^B e Tf^F (Ashton⁴); Tf^G (Osterhoff; Van Heerden¹⁵); Tf^D₁ e Tf^D₂ (Ashton; Lampkin⁷) e (Kristjansson; Hickman¹³); Tf^H (Sartore; Bernoco¹⁷); Tf^N (Braend; Khanna⁹); Tf^X (Abe *et al.*¹); Tf^I (Soos *et al.*²⁰); e Tf^J (Tsuji *et al.*²²).



(1) BB (2) BB (3) BB (4) BB (5) BB (6) BB (7) RR (8) RR (9) AB

Figura 3

Electroferograma das albuminas do sangue proveniente de touros *Bos taurus indicus*, doadores de sêmen, fracionadas por eletroforese vertical, tendo como meio suporte o gel de poliacrilamida a 10%. Classificados em termos de idade à congelação, os animais 1, 2 e 3 são considerados precoces; os animais 4, 5, 6 e 7 são medianos; e os animais 8 e 9 são tardios.

Tabela 1

Classificação dos touros quanto à idade à primeira congelação de sêmen relacionando-os ao fenótipo transferrina e albumina. Jaboticabal, 1996.

| Classif. dos touros | Data de nascimento | Idade à primeira congelação (meses) | Fenótipo da transferrina | Fenótipo da albumina |
|---------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Precoce | 01/10/94 | 17 | DE | AB |
| Precoce | 16/02/93 | 18 | EE | BB |
| Precoce | 18/12/93 | 19 | DD | BB |
| Precoce | 24/08/94 | 20 | DE | AB |
| Precoce | 30/11/93 | 20 | DD | BB |
| Mediano | 10/08/93 | 22 | DE | BB |
| Mediano | 07/09/93 | 22 | DE | BB |
| Mediano | 06/09/93 | 23 | DD | BB |
| Mediano | 12/10/93 | 24 | DD | BB |
| Mediano | 01/08/93 | 24 | EE | BB |
| Mediano | 28/08/93 | 24 | EE | BB |
| Mediano | 27/02/94 | 25 | EE | AB |
| Mediano | 28/08/92 | 26 | DE | BB |
| Mediano | 22/11/94 | -- | DE | BB |
| Tardio | 07/12/93 | 28 | EE | BB |
| Tardio | 21/08/92 | 36 | EE | AB |

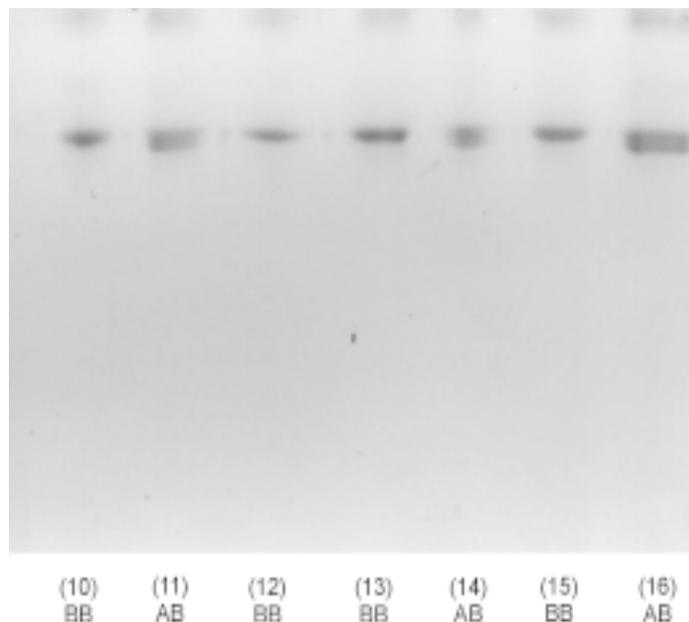


Figura 4

Electroferograma das albuminas do sangue proveniente de touros *Bos taurus indicus*, doadores de sêmen, fracionadas por eletroforese vertical, tendo como meio suporte o gel de poliacrilamida a 10%. Classificando em termos de idade à congelação, os animais 10, 12, 13, 15 e 16 são medianos e os animais 11 e 14 são precoces.

Com a identificação dos padrões eletroforéticos das transferrinas (Fig. 1 e 2), correlacionados com a característica precocidade sexual de touros doadores de sêmen, foi possível a associação de que o alelo Tf^D pode estar relacionado com a provável possibilidade de que touros portadores deste alelo possam vir a ser touros precoces sexualmente ou medianamente, já que houve maior incidência deste alelo Tf^D nos animais destas categorias. Verificando o padrão eletroforético das transferrinas em touros considerados tardios em relação à idade de congelação do sêmen, o alelo Tf^D não esteve presente em animais assim considerados. Osterhoff; Neethling¹⁶ relataram que animais homocigotos para o alelo Tf^D não eram resistentes ao estresse climático como indivíduos homocigotos para Tf^E. Alicerçando-se nos achados do presente trabalho e nas observações feitas por Osterhoff; Neethling¹⁶, animais homocigotos Tf^{EE} são mais resistentes ao estresse térmico porém mais tardios em relação à congelação de sêmen. Estes achados podem ser considerados, de certa forma, paradoxais, uma vez que animais mais bem adaptados às condições de meio ambiente apresentam melhor performance reprodutiva. Assim, outros estudos deverão ser feitos nesta área para que se possa comprovar esta hipótese.

Autores como Arochi *et al.*² determinaram o polimorfismo bioquímico das transferrinas de animais Zebu (*Bos indicus*) e verificaram a presença dos fenótipos AD, AE, DD e DE. A frequência do alelo Tf^A foi 0,18, para o alelo Tf^D 0,46 e o alelo Tf^E 0,36. Jain *et al.*¹¹, ao estudar bovinos da raça Jersey, verificaram a superioridade do alelo Tf^D em relação ao alelo Tf^A para produção de leite. Saveli¹⁸ analisou o polimorfismo bioquímico das transferrinas em touros da raça Estonian Black Pied e Estonian Red e detectou que a taxa de concepção à primeira inseminação foi mais elevada em touros que apresentavam o alelo Tf^D. Deste modo, comprova-se a ne-

cessidade de estudar e associar o polimorfismo destas proteínas com determinadas características, uma vez que diversos autores já demonstraram as prováveis relações existentes.

O polimorfismo da albumina em bovinos, de diversas raças, foi demonstrado por autores como Ashton *et al.*⁵; Ashton; Lampkin⁶; Sartore; Bernoco¹⁷; Spooner; Oliver²¹. Na análise dos padrões eletroforéticos da albumina (Fig. 3 e 4), correlacionados com a característica precocidade sexual, não foi possível estabelecer relação entre as características estudadas, já que os quatro animais heterozigotos estavam compreendidos nas três categorias, precoce, mediano e tardio em relação à idade em que o sêmen foi passível de congelamento.

Senapati *et al.*¹⁹ demonstraram que animais mestiços de Hariana, portadores do fenótipo Alb AA, são economicamente superiores em determinadas características reprodutivas, tais como número de serviços por concepção, intervalos entre partos e produção de leite. Sugerem ainda a possibilidade de um marcador bioquímico para produção de leite de vacas mestiças baseado, também, no fenótipo da albumina.

Outros estudos com enfoque no tema ora apresentado, envolvendo maior número de animais, são fundamentais para se estabelecer a relação entre os sistemas polimórficos e a característica precocidade para congelamento de sêmen. Em se confirmando tal relação, esta avaliação poderá ser utilizada como ferramenta auxiliar na seleção de touros doadores de sêmen.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que não houve relação entre o estudo dos padrões eletroforéticos da proteína albumina e a característica precocidade sexual de touros doadores de sêmen. Entretanto, estabeleceu-se uma relação entre os padrões eletroforéticos da transferrina e a congelamento do sêmen, sugerindo que o alelo Tf^D possa estar associado a touros que venham apresentar sêmen congelável precocemente ou mesmo medianamente em termos de idade à congelamento.

SUMMARY

The association between biochemical polymorphic systems and early sexual maturity was assessed subjecting 16 animals (from 17 to 36 months old) to electrophoretic studies, searching for transferrin and albumin polymorphisms. Two albumin alleles, Alb^A (Alb^F) and Alb^B (Alb^S), but only either as Alb^B homozygotes or Alb^AB heterozygotes were observed. There were no Alb^A homozygotes. It was not possible to detect relationships between albumin genotypes and early sexual maturity. Regarding transferrin, it was possible to detect two alleles (Tf^D and Tf^E). When trying to establish a relationship between transferrin electrophoretic pattern and the desirable economic trait (early sexual maturity) it is suggested that the Tf^D allele could be associated with bulls that probably will provide freezable semen at an early age.

UNITERMS: Transferrin; Albumin; Sexual maturity; Semen; Freezability.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABE, T.; OOISHI, T.; AMANO, K.; KONDOH, K.; NOZAMA, T.; NAMIKAWA, K.; KOGA, O.; HAYASHIDA, S.; OTSUKA, J. Studies on the native farm animals in Asia. I. On blood groups and serum protein polymorphism of East Asian cattle. **Japanese J. Zootech. Sci.**, v.39, p.523-35, 1968.
- 2- AROCHI, B.E.; VELAZQUEZ, E.A.; BERRUECOS, V.J.M. Determination of biochemical polymorphism of serum haemoglobin, transferrin and albumin in zebu (*Bos indicus*) mini-cows in Mexico by starch gel electrophoresis. **Veterinaria-Mexico**, v.26, n.1, p.31-6, 1995.
- 3- ASHTON, G.C. Serum protein differences in cattle by starch gel electrophoresis. **Nature, London**, v.180, p.917-9, 1957.
- 4- ASHTON, G.C. Beta-globulin alleles in some zebu cattle. **Nature, London**, v.184, p.1135-6, 1959.
- 5- ASHTON, G.C.; FALLON, G.R.; SUTHERLAND, D.N. Transferrin (B globulin) type and milk and butterfat production in dairy cows. **J. Agric. Sci.**, v.62, p.27-34, 1964.
- 6- ASHTON, G.C.; LAMPKIN, G.H. Serum albumin and transferrin polymorphism in East African cattle. **Nature, London**, v.205, p.209-10, 1965a.
- 7- ASHTON, G.C.; LAMPKIN, G.H. Transferrin and post-albumin polymorphism in East African cattle. **Genet. Res. Camb.**, v.179, p.467-8, 1965b.
- 8- BERNADTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PARKER, W.G. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biol. Reprod.**, v.37, p.60-7, 1987.
- 9- BRAEND, M.; KHANNA, N.D. Serum transferrin of Norwegian red cattle. **Acta Vet. Scand.**, v.8, p.150-6, 1967.
- 10- HICKMAN, C.G.; SMITHIES, O. Evidence for inherited differences in serum proteins of cattle. **Proc. Genet. Soc.**, v.2, p.39-46, 1957.
- 11- JAIN, A.; SINGH, A.; KHAN, F.H. Transferrin polymorphism in Jersey cattle. **Indian J. Dairy Sci.**, v.45, n.6, p.300-2, 1992.
- 12- KLISTER, P.; NITSCHMANN, H.; WITTENBACK, A.; STUDER, M.; MAUERHOFER, M. Humanes siderophilin: Isolierung mittels Rivanol aus Blutplasma und Plasmafraktionen, analytische Bestimmung und Kristallisation. **Vox Sang.**, v.5, p.403-15, 1960.
- 13- KRISTJANSSON, F.K.; HICKMAN, C.G. Subdivision of allele Tf^D for transferrin in Holstein and Ayrshire cattle. **Genetics**, v.52, p.627-30, 1965.
- 14- MANDAL, B.K.; DATTAGUPTA, R. Serum albumin polymorphism and relationship to economic traits in crossbred cattle. **Animal Blood and Biochemical Genetics**, v.16, p.229-33, 1985.
- 15- OSTERHOFF, D.R.; HEERDEN, J.A.H. Transferrin types in South African cattle breeds. In: EUROPEAN ANIMAL BLOOD GROUPS CONFERENCE, 9., 1964, Prague. **Proceedings**, p.301-7b.
- 16- OSTERHOFF, D.R.; NEETHLING, L.P. Recent studies on cattle transferrins. **Afr. Vet. Med. Ass.**, v.40, p.75-80, 1969.
- 17- SARTORE, G.; BERNOCO, D. Research on biochemical polymorphism in the indigenous cattle of Piedmont. In: EUROPEAN CONFERENCE ON BLOOD GROUPS AND BIOCHEMICAL POLYMORPHISM, 10., 1966, Paris. **Proceedings**, p.283-7.
- 18- SAVELI, O. The relationship of transferrin types with fertilizing ability of bull semen. **Anim. Breed. Abstr.**, v.41, n.4, p.184, 1973.
- 19- SENAPATI, P.K.; DATTAGUPTA, R.; GHATTERJEE, A.R.; SINHA, R. Albumin polymorphism and its association with economic traits in Hariana and its exotic halfbreeds. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.67, n.1, p.42-7, 1997.
- 20- SOOS, P.J.S.; CSONTOS, G.; GIPPERT, E. A further type of cattle serum transferrin. **Acta Vet. Acad. Sci. hungaricael.**, v.23, p.303-5, 1973.
- 21- SPOONER, F.R.L.; OLIVER, R.A. Albumin polymorphism in British cattle. **Anim. Prod.**, v.11, p.59-63, 1969.
- 22- TSUJI, S.; FUKUSHIMA, T.; SHIOMI, M.; ABE, T. A new serum transferrin phenotype observed in Japanese Black cattle. **Animal Blood and Biochemical Genetics**, v.12, p.299-305, 1981.

Recebido para publicação: 30/04/1997
Aprovado para publicação: 21/05/1998