



Caracterização protéica do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova¹

Nadiana Maria Mendes Silva², Ângela Maria Xavier Eloy³, João Ricardo Furtado⁴, Diones Oliveira Santos⁵, Nágila Mendes Silva⁶, Andréa Zilá Barroso de Souza⁷, Roberta Vianna do Valle⁸, Tatiana Santos Primo⁹

- ¹ Parte da dissertação da primeira autora, financiada pela Embrapa Caprinos e Ovinos
- ² Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. e-mail: nadiana.mendes@gmail.com
- ³ Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos. e-mail: angela@cnpq.embrapa.br
- ⁴ Laboratorista Embrapa Caprinos e Ovinos. e-mail: ricardo@cnpq.embrapa.br
- ⁵ Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos. e-mail: diones@cnpq.embrapa.br
- ⁶ Aluna de Graduação do curso de Biologia da UVA, Sobral-CE. e-mail: nagingha_mendes@hotmail.com
- ⁷ Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – UFRSA, Mossoró-RN. e-mail: andreazila@hotmail.com
- ⁸ Aluna de Graduação da UFBA, Salvador-BA. e-mail: betadovalle@hotmail.com
- ⁹ Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. e-mail: tati_primo@hotmail.com

Resumo: A biologia molecular na área da reprodução animal traz novas ferramentas para o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal. Logo, a caracterização das proteínas seminais nos permitirá a identificação de como as mesmas se apresentam dentro da raça estudada e relacioná-las a fertilidade. Foram utilizados 14 reprodutores ovinos da raça Morada Nova onde se analisou as bandas protéicas através de eletroforese unidimensional SDS PAGE, em géis de poliacrilamida a 12,5%, corados por Coomassie Blue. Quatro bandas protéicas, presentes em 100% das amostras de plasma seminal, foram quantificadas de acordo com o peso molecular: 14 kDa; 20 kDa, 22 kDa e 55 kDa. Neste estudo 12 dos 14 animais apresentaram a banda de peso molecular 66 kDa, identificada por outros autores como a albumina. As proteínas de peso molecular 33, 50, 52 e 115 kDa foram as que apresentaram menor frequência, aparecendo cada uma em animais diferenciados. Este trabalho nos permitiu visualizarmos a distribuição e variação do peso molecular das bandas protéicas nos diferentes animais da raça Morada Nova.

Palavras-chave: eletroforese unidimensional, peso molecular, proteína seminal

Characterization of seminal plasma protein in sheep Morada Nova

Abstract: The molecular biology in the area of animal reproduction brings new tools for genetic improvement through the use of biochemical markers in body fluids to demonstrate the genetic potential of an animal. Therefore, the characterization of seminal proteins will enable us to identify how they present themselves within the breed studied and relate them to fertility. We used 14 breeding sheep Morada Nova and analyzed the protein bands by one-dimensional electrophoresis on polyacrylamide gels or 12.5%, stained with Coomassie Blue. Four protein bands, present in 100% of seminal plasma samples were quantified according to the molecular weight: 14 kDa, 20 kDa, 22 kDa and 55 kDa. In this study 12 of the 14 animals showed a band of molecular weight 66 kDa, identified by other authors such as albumin. Protein molecular weight 33, 50, 52 and 115 kDa showed the lowest frequency, each appearing in different animals. This work allowed us to visualize the distribution and variation of the molecular weight of protein bands in different animals of the Morada Nova.

Keywords: dimensional electrophoresis, molecular weight, seminal protein

INTRODUÇÃO

A biologia molecular na área da reprodução animal traz novas ferramentas para o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal, cuja seleção de genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas possa ser incrementada (Roncoletta et al., 1999).

O plasma seminal tem um papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fertilização (Kraus et al., 2005), proporcionando boas condições para a manutenção da motilidade, da sobrevivência e do transporte espermático, tanto no sistema reprodutor do macho, quanto da fêmea (Topfer-Petersen et al., 2005). Outras funções e características dos espermatozoides que podem ser influenciadas por proteínas do plasma seminal incluem a capacitação e a reação acrossômica (Manjunath & Therien, 2002). Por isso, a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies, pela identificação dos polipetídeos, pode fornecer elementos para a certificação da fertilidade e da congelabilidade do sêmen (Killian et al., 1993; Roncoletta et al. 1999; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2007).

Muitos são os trabalhos com eletroforese para isolar e identificar as proteínas do sêmen seja do espermatozóide ou do plasma seminal, mas poucos são os dados de trabalhos relacionados à espécie ovina e mais precisamente da raça Morada Nova. Logo este trabalho teve como objetivo caracterizar as bandas protéicas presentes nos ovinos da raça Morada Nova criados na região Norte do estado do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral, Ceará, na região Norte, em pleno semi-árido, a 3°42' de latitude

Sul e 40°21' de longitude Oeste, e uma altitude de 83 metros. A temperatura média anual é de 28°C, com médias, mínima e máxima, de 22°C e 35°C, respectivamente, e umidade relativa do ar de 69%.

Foram utilizados 14 machos da raça Morada Nova, com idade variando de 18 a 21 meses, submetidos a regime de criação semi-intensivo. O sêmen foi colhido em vagina artificial, no mês de dezembro/2008 e as amostras foram avaliadas quanto à concentração, aspecto, volume, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor. O sêmen foi centrifugado a 3.000 rcf para separação do plasma seminal e em seguida recentrifugado a 10.000 rcf para retirada de restos celulares.

Foram realizadas as análises de proteínas totais através do método descrito por Bradford (1976) e em seguida eletroforese Unidimensional SDS-PAGE a 12,5%. As bandas protéicas foram analisadas através do programa BioDoc-It and VisiDoc-It, Gel Documentation System da UVP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística quanto ao volume do ejaculado, motilidade progressiva, vigor e concentração espermática ($P>0,05$) entre os animais estudados. O valor médio da proteína total foi de 15,13µg/µl variando de 9,55 a 22,37µg/µl. Os géis de eletroforese unidimensional nos mostraram que houve uma diferença na distribuição das bandas protéicas entre os animais, onde o peso delas variaram de 14 a 125 kDa, sendo a maior frequência as bandas >50 kDa. Também foi observado que o número de bandas diferiu entre os animais (11-16 bandas), apesar de serem da mesma raça, com idades aproximadas e criados em um mesmo sistema.

Observou-se a presença das bandas de peso 14, 20, 22 e 55 kDa presente em 100% dos animais avaliados. Sendo a de 14 kDa relacionada a manutenção da motilidade espermática em caprinos (Jobim, et al. 2003) e segundo Villemure et al. (2003) responsável por ligar a membrana espermática durante o transito epididimário atuando na capacitação espermática dessa espécie. A banda de 55 kDa foi identificada por diversos autores como sendo a osteopontina (CANCEL et al. 1997; KILLIAN et al., 1993; FRAZER & BUCCI, 1996).

As proteínas de peso molecular 66 e 96 kDa foram identificadas em 85,7% dos animais, sendo a de 66 kDa já identificada por Oberst et al., (2002) como a albumina.

As bandas que apresentaram menor frequência foram as de 33, 50, 52 e 115 kDa, sendo estas identificadas cada uma em animais distintos, devendo serem estudadas futuramente.

CONCLUSÕES

Este trabalho nos permitiu conhecer a distribuição e variação do peso molecular das bandas protéicas em diferentes animais da raça Morada Nova, dando suporte a futuros estudos de biologia molecular.

As bandas de 33, 50, 52 e 115 kDa, por terem sido as de menor frequência, distintas nos demais animais, devem ser estudadas futuramente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** **72**, 248-254, 1976
2. CANCEL. A. M. et al. Osteopontin is the 55-Kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**. v.57, p. 1293-1301, 1997.
3. FRAZER, G. S., BUCCI, D. M. Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**. v.46, p. 1389-1402, 1996.
4. JOBIM, M.I.M. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.61, p.255-266, 2004
5. KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A., ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bulls seminal plasma. **Biology of Reproduction, Champaign**, v.49, p.1202-1207, 1993
6. KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal Reproduction Immunology**, v.65, p.33-46, 2005
7. MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal Reprod. Immunology**, v.53, p.109-119, 2002
8. MOURA, A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.169-188, 2007
9. OBERST E. R., ET AL..Imunoidentificação de albumina e osteopontina no plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p. 21-28, jan/jun. 2002
10. RONCOLETTA, M.et al.. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 143-148, 1999
11. TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005