

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA NO PERÍODO CHUVOSO¹

Nadiana Maria Mendes Silva², Ângela Maria Xavier Eloy³, Raymundo Rizaldo Pinheiro³,
Roberta Vianna do Valle⁴, João Ricardo Furtado⁵, Nágila Mendes Silva⁶

¹Parte da Dissertação do primeiro autor, financiada pela Embrapa Caprinos e ovinos

²Aluna do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. e-mail: nadiana.mendes@gmail.com

³Aluna do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE. e-mail:

⁴Pesquisador (a) Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE.

⁵Assistente de laboratório Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE.

⁶Aluna de Graduação da UFC, Fortaleza-CE.

Resumo: O plasma seminal tem sido recentemente objeto de estudo em várias linhas de pesquisa, em vista da descoberta de sua importância na viabilidade espermática. Relatos em várias espécies sugerem que no plasma são encontradas proteínas que podem influenciar a fertilidade do macho. Portanto, a identificação das bandas protéicas presentes no plasma seminal representa uma técnica que poderá avaliar a capacidade de fecundação dos animais, podendo ser considerados como marcadores de animais superiores. Logo, este trabalho teve como objetivo relacionar as proteínas identificadas no plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova com a fertilidade dos mesmos. Foram avaliados quatro reprodutores ovinos da raça Morada Nova quanto a sua fertilidade no período seco do semi-árido do Nordeste, onde se analisou as bandas protéicas através de eletroforese unidimensional (SDS PAGE) em géis de poliacrilamida a 12,5%. Observou-se a presença de uma banda de peso molecular 25 kDa presente apenas no animal que obteve o maior índice de fertilidade (100%), sendo essa, provavelmente, uma isoforma da prostaglandina D sintetase. As bandas de 33 e 41 kDa foram identificadas no animal que obteve o menor índice de fertilidade, devendo ser estudadas posteriormente.

Palavras-chave: eletroforese unidimensional, fertilidade, peso molecular

SEMINAL PLASMA PROTEIN AND ITS RELATION TO FERTILITY OF MORADA NOVA'S SHEEP DURING RAINY SEASON

Abstract: Seminal plasma has recently been studied in several lines of research, given the discovery of its importance in sperm viability. Reports suggest that in several species are found proteins in the plasma that may influence male fertility. Therefore, the identification of protein bands present in seminal plasma is a technique that can evaluate the fertilization capacity of the animals, they can be considered as markers of higher animals. Thus, this work was to correlate the proteins identified in seminal plasma of Morada Nova's sheep with their fertility. Four Morada Nova's male were evaluated for their fertility during the dry season in the Northeast's semi-arid, where the protein bands was analyzed by one-dimensional electrophoresis (SDS PAGE) on polyacrylamide gels at 12,5%. We observed the presence of a band of molecular weight 25 kDa present only in the animal that had the highest fertility rate (100%), and this is probably an isoform of prostaglandin D synthetase. The bands of 33 and 41 kDa were identified in the animal that had the lowest fertility rate, and should be studied further.

Keywords: one-dimensional electrophoresis, fertility, molecular weight

Introdução

O plasma seminal tem sido recentemente objeto de estudo em várias linhas de pesquisa, em vista da descoberta de sua importância na viabilidade espermática. O conhecimento

sobre a bioquímica espermática e os estudos relacionados aos componentes do plasma seminal representam uma ferramenta importante para o conhecimento da fertilização. Portanto, a identificação do perfil protéico do sêmen de animais mais férteis através de estudos moleculares representa uma técnica que poderá avaliar a capacidade destes para fecundar, podendo ser considerados como marcadores de animais superiores (Teixeira, 2008).

Relatos em várias espécies sugerem que no plasma são encontradas proteínas que podem influenciar a fertilidade do macho (Killian et al., 1993; Koistinen et al., 2000). Com isso, este trabalho teve como objetivo identificar as bandas protéicas presentes no período chuvoso pré-estação de monta e relacioná-las com os valores do teste de prenhez positivo das fêmeas cobertas.

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 quatro machos e 40 fêmeas da raça Morada Nova, em idade reprodutiva. Para análise das proteínas o sêmen foi colhido em vagina artificial, no período chuvoso (fevereiro/2009) e as amostras foram avaliadas quanto à concentração espermática, aspecto, volume do ejaculado, motilidade progressiva individual 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.

A estação de monta compreendeu um período de 45 dias onde cada macho foi exposto a 10 fêmeas a medida que essas apresentavam-se em estro. As coberturas e recoberturas ocorriam no período da manhã e da tarde.

Avaliou-se a fertilidade através do número de fêmeas cobertas pelo número de fêmeas com diagnóstico de prenhez positivo. Utilizou-se o programa Excel para comparação da médias através do teste t de student.

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram que houve diferença estatística ($P < 0,05$) quanto ao volume do ejaculado, concentração espermática e proteína total, não havendo essa diferença ($P > 0,05$) na motilidade progressiva individual e vigor. O valor médio da proteína total foi de 18,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ variando de 18,71 a 28,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Observou-se que o animal 2 diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) dos animais estudados (Tabela 1). Souza et al. (2002) encontraram em carneiros pós-púberes valor médio de 19,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,

Tabela 1. Avaliação individual dos parâmetros espermáticos dos ovinos da raça Morada Nova

Parâmetros espermáticos	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D
Volume do ejaculado (mL)	1,4 ^a	0,9 ^b	0,9 ^b	1,4 ^a
Motilidade (%) / Vigor	70/3 ^a	90/4 ^a	90/4 ^a	90/4 ^a
Concentração ($\times 10^6$ spz/mL)	3.92 ^b	6.34 ^a	3.8 ^b	5.88 ^a
Proteínas totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	19,36 ^a	28,04 ^b	18,71 ^a	20,31 ^a

^{ab} Letras distintas diferem estatisticamente através do teste t de student a 5%.

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 freqüência as bandas >50 kDa. Também foi observado que o número de bandas diferiu entre os animais (11-21 bandas), apesar de serem da mesma raça, com idades aproximadas e criados em um mesmo sistema de produção (Tabela 2).

Tabela 2. Relação das bandas protéicas que se diferenciaram nos animais da raça Morada Nova, o número total de bandas encontradas no gel de eletroforese e a taxa de fertilidade de cada animal avaliado

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D
	-	16	16	
	-	19	19	19
	25	-	-	-
	-	29	29	-
Bandas protéicas diferenciadas	-	-	-	33
	-	37	37	-
	-	39	39	-
	-	-	-	41
	-	-	47	47
	72	72	-	-
	90	-	-	-
Total de bandas	11	21	19	14
Fertilidade comprovada (%)	100	87,5	85,7	62,5

Observou-se que a banda de 25 kDa só se expressou no animal que obteve o maior índice de fertilidade (Animal A). Essa proteína provavelmente possa ser uma isoforma da prostaglandina D sintetase identificada por Killian et al. (1993), associada a alta fertilidade de bovinos. Em ovinos essa proteína aparece no testículo e epidídimo durante o desenvolvimento fetal, sendo detectada na puberdade uma isoforma com peso de 30 kDa sendo convertida a outra isoforma de 27 kDa com o amadurecimento do animal (FOUCHÉCOURT et al., 1999). Em ovinos esta proteína não foi relacionada na síntese de prostaglandinas, sendo sua fertilidade provavelmente relacionada a capacidade de transportar substâncias hidrofóbicas, incluindo testosterona e retinóides (FOUCHÉCOURT et al., 1999).

No animal D foi identificada duas proteínas (33 e 41 kDa) que não foram identificadas nos demais animais, devendo ser estudada posteriormente pois provavelmente possa estar relacionada ao seu menor índice de fertilidade.

Conclusões

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

A banda de 25 kDa encontrada nesse trabalho provavelmente seja uma isoforma da prostaglandina D sintetase, devendo ser estudada posteriormente.

As proteínas de 33 e 41 kDa devem ser estudadas para saber sua relação com a fertilidade desses animais.

Referências Bibliográficas

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

FOUCHECOURT, S.; DACHEUX, F.; J.L. Glutathion- independent prostaglantin D synthase in ram allio epididymal fluids; origin and regulation. **Biology of Reproduction**. V. p. 558-566, 1999.

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.

KOISTINEN, H; KOISTINEN, R; HYDEN-GRANSGNUS, O. et al. Seminal plasma glicodelin and fertilization in vitro. **Journal Andrology**., n. 21, v. 5 p. 636-640, 2000.

TEIXEIRA, A. C., Mapeamento eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Anglo-Nubiana ao longo do ano no Nordeste do Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA. Sobral, 2008

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. et al. Caracterísitcas reprodutivas, concentrações de proteínas seminais e testosteronemia de carneiros Santa Inês durante o primeiro ano de vida. **VI Reunião Regional da SBBq – Nordeste**. 2002