

X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

“FINGERPRINTING” DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA

Ylana Santos de Galiza¹; Francisco Caio Vasconcelos²; Nadiana Maria Mendes da Silva³;
João Ricardo Furtado⁴, Ângela Maria Xavier Eloy⁵

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia– Universidade Vale do Acaraú- UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: ylana476@hotmail.com; ²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia– Universidade Vale do Acaraú- UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, ³MSC Zootecnista; ⁴Técnico em Biotecnologia – Embrapa Caprinos e Ovinos; ⁵Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: angela.eloy@embrapa.br

RESUMO

A utilização de marcadores bioquímicos por meio de líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal traz novas ferramentas para o melhoramento genético e reprodução 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. No presente trabalho foram utilizados 4 reprodutores ovinos da raça Morada Nova onde se analisou as bandas protéicas através de eletroforese bidimensional (2D). Analisando os géis bidimensionais, depois das proteínas editadas e das comparações, foram detectados, de forma consistente, 52 “spots” proteicos no plasma seminal de ovinos Morada Nova. Desses 52 spots detectados no mapa bidimensional, somente dois apresentaram pI acima de 6,0 com MW de 15,9 e 21,6 k Da, permitindo-nos afirmar que a maioria das proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova é ácida. Esses resultados preliminares mostram que a raça Morada Nova apresenta importantes proteínas no plasma seminal que estão envolvidos na formação dos tecidos e de suas funções.

Palavras-Chave: Ovino, Plasma Seminal, Eletroforese 2D

INTRODUÇÃO

A utilização de marcadores bioquímicos por meio de líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal traz novas ferramentas para o melhoramento genético e reprodução animal (RONCOLETTA et al, 1999). Dentre esses líquidos, o plasma seminal (PS), apresenta grande importância na viabilidade espermática, principalmente em relação às proteínas, por estarem em maior concentração do que outros componentes e, por participarem ativamente do processo de fertilização (BELLIN et al., 1998). Além disso, o PS pode ser utilizado como possível ferramenta para avaliar o potencial genético de algumas espécies como a Morada Nova. O PS possui três funções básicas: meio de transporte para os espermatozoides durante a ejaculação; meio “ativador” para os espermatozoides inicialmente não móveis além de um sistema tampão e meio rico em nutrientes que ajuda a sobrevivência dos espermatozoides após deposição no trato reprodutivo feminino, com influência na fertilidade do reprodutor (WOLFE et al.,1993). Em virtude da importância das proteínas como marcadores de características reprodutivas, e, tendo em vista a escassez de dados, este trabalho tem como objetivo o mapeamento proteico ou *fingerprinting* do plasma seminal da raça Morada Nova.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral, Ceará, na região Norte, em pleno semiárido, 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 da raça Morada Nova, com idade variando de 18 a 21 meses, submetidos a regime de criação intensivo, de modo a eliminar o fator alimentação.

O sêmen foi colhido semanalmente em vagina artificial, e as amostras foram avaliadas quanto à concentração espermática, aspecto, volume do ejaculado, motilidade progressiva retilínea, vigor e proteína total. Após as avaliações, o sêmen foi centrifugado a 1500g durante 30 minutos, à 4°C e re-centrifugado a 10.000g por 60 minutos, a 4°C, para separação do espermatozoide do plasma seminal. Em seguida, foi realizada a dosagem das proteínas totais, através do método de Bradford (1976) e a eletroforese bidimensional (2D) empregando a técnica descrita por O'Farrell (1975) com algumas modificações para determinação dos padrões eletroforéticos bidimensionais das proteínas.

Primeiramente, foi feito um *pool*, composto de todos os animais. Esses foram preparados utilizando 250µg de proteína total, os quais foram submetidos à 2D-PAGE, em duplicata. Para preparação dos géis, as proteínas do plasma seminal (250µg) foram solubilizadas em tampão de reidratação (7 M de uréia; 2 M de tiuréia; 2% de CHAPS; 2% de IPG Buffer - *anfólitos* - na faixa de pH 4 a 7; 25 mM de ditioneína (DTT) e “traços” de azul de bromofenol). A solução foi adicionada à canaleta da bandeja de hidratação *IPGBox* (GE-Healthcare, USA) e incubada com tiras de gradiente imobilizadas (*IPG Strip*) de 13 cm com duração de 16h, aproximadamente. A focalização isoeletrica foi realizada no equipamento *Ettan™ IPGPhor III™* (GE-Healthcare, USA) com a seguinte programação: 500 V (2h), 4.000 V (2h e 30 min), 10.000 V (18.000 Vh) e 50 V (4h). Uma vez focalizadas, as tiras foram equilibradas no tampão de equilíbrio, em duas etapas: na primeira acrescentou-se 57,8 mg de DTT (1% p/v) à solução de equilíbrio. Já na segunda, com o objetivo de alisar as proteínas, adicionou-se 69,3 mg de iodeacetamida (IAA) (3% p/v), homogeneizando cada tira por 15 min em ambas as etapas. Após a etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE 12,5%) com base em seu peso molecular (MW) no equipamento Hoefer SE 600 (GE-Healthcare, USA) com duas programações (100 V, 30 mA, 100 W por 15 min e 230 V, 50 mA e 100 W por 6h) para os dois géis.

Foi utilizado marcador de MW entre 14 e 97 kDa. Após esta separação, que teve duração média de oito horas, os géis foram fixados em mistura de etanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v/v), por 15 min em agitação, e corados após com o *Coomassie G-250 (Blue Silver)*, durante 24h, e em seguida, armazenados em solução de ácido acético 5%. Por fim, os géis foram digitalizados em um equipamento *ImagerScanner II* (GE-Healthcare, USA), e as imagens salvas no formato *tif*. As imagens digitalizadas dos géis foram analisadas utilizando o “*Software ImageMaster Platinum*” versão 7.0 (GE-Healthcare, USA), que permite a detecção, a quantificação e a congruência entre os múltiplos géis, segundo recomendação do manual. As proteínas foram supostamente identificadas com base na comparação de pI e MW no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent disponível “*online*” no portal ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os géis bidimensionais, depois das proteínas editadas e das comparações, foram detectados, de forma consistente, 52 “spots” proteicos no plasma seminal de ovinos Morada Nova (Fig. 1). Desses 52 spots detectados no mapa bidimensional, somente dois apresentaram pI acima de 6,0 com MW de 15,9 e 21,6 kDa, permitindo-nos afirmar que a maioria das proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Morada Nova é ácida, concordando com os dados de SOUZA et al. (2004).

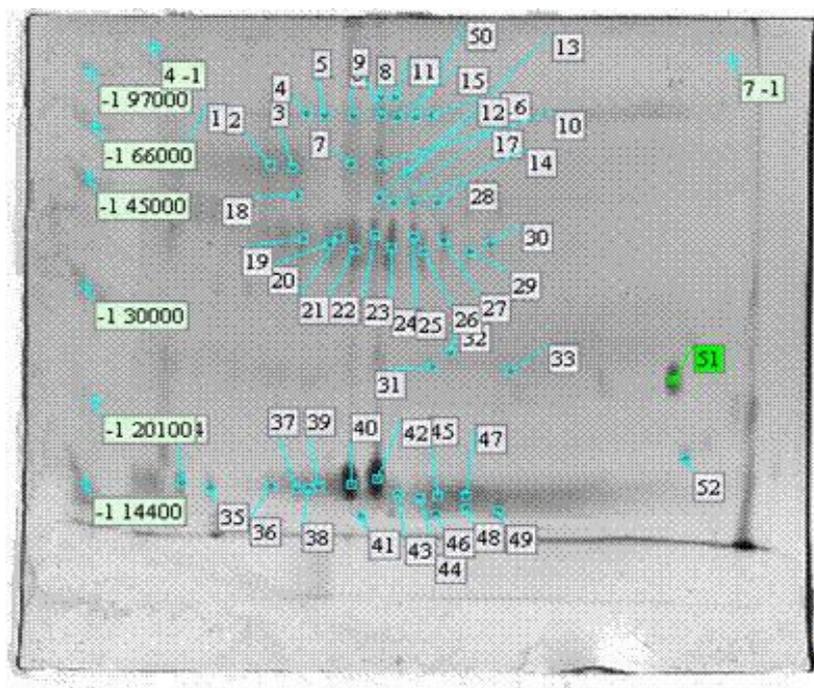


Figura 1. Perfil bidimensional “fingerprinting” de proteínas do plasma seminal de pool de ovinos Morada Nova, gerado pelo software ImageMaster Platinum versão 7.0

Neste universo, observa-se que 78,78% dos spots possuem peso molecular menor que 50 kDa e 21,12% são maiores que 50 kDa. SOUZA et al. (2004), estudando proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês, observaram peso molecular abaixo de 75 kDa e pIs ácidos na maioria das proteínas do plasma seminal, e poucas com pI acima de 8. Segundo BERGERON et al. (2005) e CARDOZO et al (2006), proteínas com peso molecular entre 14-24 kDa foram as mais predominantes no plasma seminal ovino, concordando com os achados desse trabalho. JOBIM et al. (2005) detectaram 21 spots, com peso molecular variando de 15 a 115 kDa e pI de 3,2 a 8,7 no plasma seminal ovino.

Utilizando a ferramenta TagIdent disponível “online” no portal ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>), com UniProtKB/Swiss-Prot database (539616 entries),

foram encontradas possíveis proteínas importantes na formação dos tecidos e de suas funções, sendo algumas delas mencionadas abaixo:

<u>BMP15 SHEEP (Q9MZE2)</u> Bone morphogenetic protein 15	Pode estar envolvida no desenvolvimento testicular
<u>FSHB SHEEP (P01227)</u> Follitropin subunit beta	Estimula o desenvolvimento folicular e a espermatogênese
<u>PA21B SHEEP (P14419)</u> Phospholipase A2	Cataliza a hidrólise dependente do cálcio no grupo 2 acyl e fosfoglicerídeos
<u>ADX SHEEP (P29330)</u> Adrenodoxin	Essencial para a síntese de vários hormônios esteroides
<u>IL15 SHEEP (Q9XSJ6)</u> Interleukin-15	Cytoquina que estimula a produção de linfócitos T

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho, pioneiro para a raça Morada Nova, permitiu conhecer a distribuição e variação da massa molecular e o ponto isoelétrico das bandas proteicas nos animais da raça Morada Nova, identificando as possíveis proteínas presentes no plasma seminal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a instituição de ensino UVA pela oportunidade em realizar o programa de pós-graduação juntamente com a Embrapa Caprinos e Ovinos. A Capes pela concessão da bolsa de mestrado. A minha orientadora Dra Ângela Eloy e toda a equipe do laboratório de proteômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLIN, M. E., Hawkins, H.E., Ax, R.L. Fertility of range beef grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal plasma. **Journal Animal Science**, v.72, p.2441-2448, 1994.

- BERGERON, A. et al. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p.461-470, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.
- CARDOZO, J.A. et al. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006.
- FERNANDES, A. A. O. et al., Avaliação dos fatores ambientais no desenvolvimento corporal de cordeiros desmamados da raça Morada Nova. **Rev. Bras. Zootec.**, 30, 1460-1465, 2001.
- JOBIM, M.I.M. et al. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.63, p.2053-2062, 2005.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
- 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.
- SOUZA, C. E. et al. Seminal plasma proteins, testis development and semen criteria in the ram. In: **Annual Meeting of the American Society of Andrology**, 29, 2004, Baltimore, Maryland. Proceedings... Baltimore: American Society of Andrology, 2004. p. 91 (abstract).
- WOLFE, D.F., BRADLEY, J. T. & RIDDEL, M.G.Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology** , v 40, p.1083- 1091, 1993.