

X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

EFEITO DO CONGELAMENTO DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS MORADA NOVA SOBRE O SEU PERFIL PROTEICO

Francisco Caio Vasconcelos¹, Ylana Santos de Galiza², João Ricardo Furtado³, Diones Oliveira Santos⁴, Ângela Maria Xavier Eloy⁵

¹Mestrando do Curso de Pós-graduação em Zootecnia, bolsista da FUNCAP (UVA); E-mail: caiovasconcelos81@hotmail.com; ²Mestranda do Curso de Pós-graduação em Zootecnia, bolsista da CAPES (UVA). ³Laboratorista da EMBRAPA Caprinos e Ovinos; ^{4,5}Pesquisadores da EMBRAPA Caprinos e Ovinos.

RESUMO

O plasma seminal tem sido recentemente objeto de estudo em várias linhas de pesquisa, em vista da descoberta de seu envolvimento na fertilidade. Foi utilizado um reprodutor ovino da raça Morada Nova visando avaliar o efeito da congelação do plasma seminal sobre a presença de bandas proteicas através da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em géis de poliacrilamida a 12,5%. Observou-se que o processo de congelação não influenciou no perfil proteico do plasma seminal, podendo o mesmo vir a ser utilizado em biotécnicas da reprodução.

Palavras-Chave: Eletroforese 1D; Morada Nova; Plasma Seminal

INTRODUÇÃO

Os ovinos Morada Nova, raça naturalizada brasileira e com origem no Nordeste do Brasil, é uma das principais raças nativas de ovinos deslanados (CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W., 2008). Esta raça apresenta elevada prolificidade e habilidade materna, aliada ao menor intervalo entre partos (SOUZA, W. H. DE; LÔBO, R. N. B.; MORAIS, O. R., 2003).

O conhecimento sobre a bioquímica espermática e as linhas de pesquisas relacionadas aos seus componentes representam uma ferramenta importante para o conhecimento da fertilização, podendo variar de acordo com a época do ano, localização geográfica, e raça do animal. A biologia molecular na área da reprodução animal traz novas alternativas, como o uso da proteômica na determinação de marcadores moleculares no plasma seminal que poderá identificar animais superiores para a reprodução, mais especificamente com características, dentre elas a fertilidade e congelabilidade do sêmen. Portanto, demonstrar o potencial genético de um animal, cuja seleção de genótipos superiores poderá ser incrementada em diversos sistemas de produção animal (ISFOR *et al.*, 2002).

A Eletroforese Unidimensional em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) tem sido utilizada como uma técnica de crucial importância para a separação e quantificação de diferentes proteínas em plasma seminal de diversas espécies, até mesma na humana.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da congelação sobre o perfil das bandas proteicas no plasma seminal.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi executado na Embrapa Caprinos e Ovinos, na cidade de Sobral, localizada na região Norte, em pleno semi-árido cearense, 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.

O presente trabalho conta com a análise e aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) em Pesquisa da Embrapa Caprinos e Ovinos, sendo registrado com o certificado de número 001/2015.

A coleta do sêmen foi realizada usando-se uma vagina artificial, tendo como manequim uma fêmea estrogonada com Cipionato de Estradiol (ECP), aplicado pela via intramuscular.

Após a coleta de sêmen, a amostra foi centrifugada à 10.000g durante 30 minutos, para obtenção do plasma seminal, e os espermatozoides descartados. O plasma seminal foi então congelado em nitrogênio líquido e 24 horas depois foi realizada uma nova coleta de sêmen do mesmo reprodutor para análise do plasma seminal fresco.

No segundo dia, após a coleta, os géis de separação e o de concentração foram preparados para a realização da análise dos plasmas congelado e fresco. Inicialmente a concentração protéica do plasma foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G250* às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro FP-901 (*Chemistry Analyser Labsystems*) pelo método de absorvância, utilizando-se o comprimento de onda de 595 nanômetros (nm), em triplicata, usando a albumina sérica bovina (BSA) para criar uma curva padrão. Em seguida, as amostras foram injetadas nos poços do gel de concentração, onde teve início a corrida eletroforética.

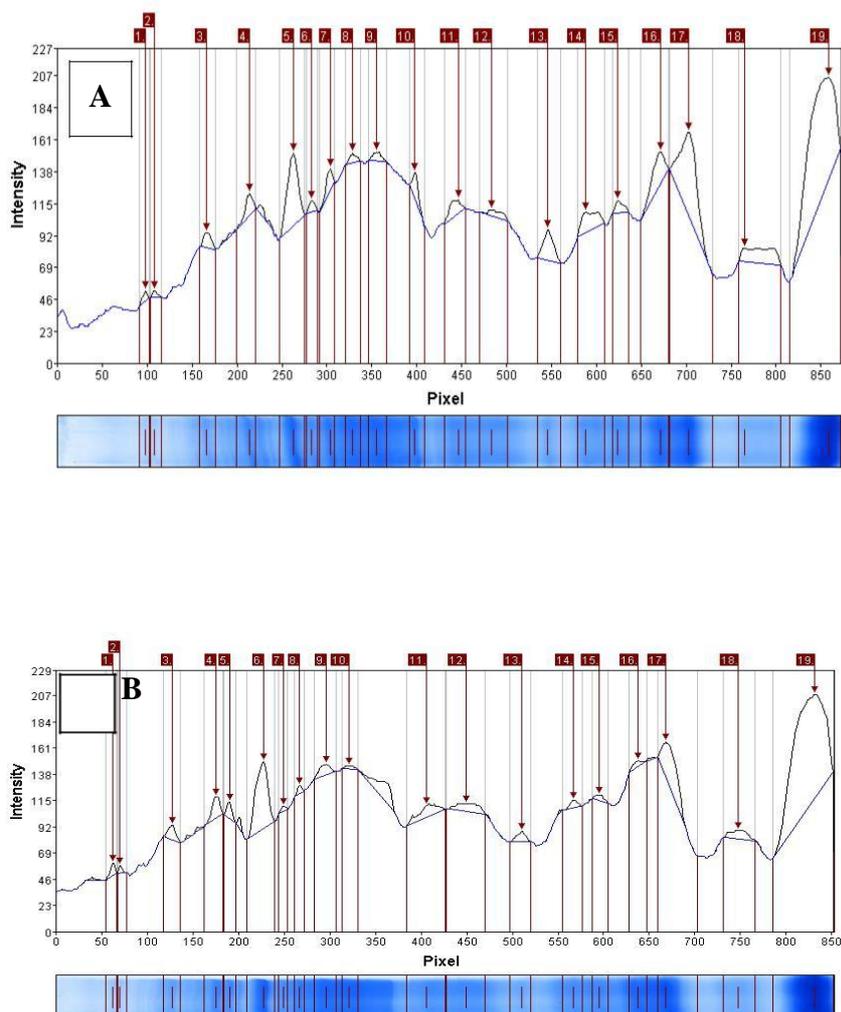
Logo após o fim da corrida foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-25* por aproximadamente duas horas e descorados com etanol (30%) e ácido acético (7,5%) por mais ou menos duas horas, sob agitação constante. Em seguida os géis foram escaneados e analisados usando-se o *software* Bio Doc-IT-LS® 6.0 Documentation System da UVP para determinação da densidade óptica das bandas proteicas expressas em pixels e quantificada em percentagem relativa ao total da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível observar diferença entre o número expresso de bandas proteicas do plasma seminal pós-congelado e fresco. No entanto, quando analisou-se a concentração de proteínas totais através do método descrito por Bradford (1976), houve uma quantidade de proteínas totais maior no plasma fresco (26,25 ug/ul), quando comparado com o plasma pós-congelado (20,05 ug/ul).

É de relevante importância citar que embora os dois plasmas seminais (pós-congelado e fresco) apresentarem o mesmo número de bandas proteicas, no entanto, algumas dessas bandas do plasma seminal fresco demonstraram uma concentração maior do que aquelas do plasma pós-congelado.

Gráfico 1: Plasma seminal pós-congelado (A) e fresco (B) de um reprodutor ovino da raça Morada Nova



SILVA *et al* (2009) avaliando o sêmen (pós-congelado e fresco) de ovinos Morada Nova, verificou que não houve diferença significativa na quantificação das proteínas do plasma seminal de tais animais entre as duas situações do sêmen.

CONCLUSÃO

A criopreservação do plasma seminal de um reprodutor ovino Morada Nova não causou alteração da expressão proteica do mesmo quando analisado através da eletroforese 1D, inferindo-se que o tempo de congelação de 24 horas, utilizado no presente trabalho, não altera a proteômica da amostra.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Caprinos e Ovinos pela disponibilidade do animal e matérias necessários e a FUNCAP pelo apoio financeiro.

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**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.36, p.40-46, 2008.

ISFOR, R. J. et al. Proteomics analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science**. v. 771, p. 155-165, 2002.

SILVA, N. M. M. *et al.* Avaliação do sêmen fresco e pós-congelado de ovinos da raça Morada Nova na região semiárida do Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 36, 2009, Porto Seguro. Inovação e responsabilidade social: **Anais...** Porto Seguro: SBMV, 2009. 3 f. 1 CD-ROM.

SOUZA, W. H. DE; LÔBO, R. N. B.; MORAIS, O. R. Ovinos Santa Inês: Estado de Arte e Perspectivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2, 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2003. p. 501 - 522. CD-ROM.