



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
Consciência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE *SPOT's* NO PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES MORADA NOVA POR ELETROFORESE BIDIMENCIONAL SOBRE A TAXA DE FERTILIDADE

Francisco Caio Vasconcelos¹, Ângela Maria Xavier Eloy², Diônes Oliveira Santos³, Ylana Santos de Galiza⁴, João Ricardo Furtado⁵

¹ Mestrando do Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Bolsista da FUNCAP (UVA); E-mail: caiovasconcelos81@hotmail.com.

² Pesquisadora/Orientadora da Embrapa Caprinos e Ovinos; E-mail: angela.elay@embrapa.br

³ Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos

⁴ Mestranda do Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Bolsista da CAPES (UVA)

⁵ Laboratorista da Embrapa Caprinos e Ovinos

Resumo: Este estudo trabalhou com ovinos Morada Nova uma raça naturalizada brasileira e com origem no Nordeste do Brasil, apresentando índices reprodutivos satisfatórios. O plasma seminal desses animais tem sido objeto de estudo de várias linhas de pesquisa, pois demonstra grande importância na viabilidade espermática, especialmente em relação às proteínas, devido sua maior concentração do que outros componentes e, por estar ligada, diretamente ao processo de fecundação. O experimento foi executado na Embrapa Caprinos e Ovinos, na cidade de Sobral, localizada na região Norte cearense, utilizando dados de dois animais, identificados como 33 e 319, da estação de monta do biênio 2013/2014. Foram usados a taxa de fertilidade desses animais e a quantidades de *Spot's* encontrados no plasma seminal a partir de géis bidimensionais, sendo esses *Spot's* visualizados por meio do Software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Foi possível observar que o animal 319, apresentou uma maior quantidade de *Spot's* (Supostas proteínas), foi também o animal com uma maior taxa de fertilidade ao diagnóstico de prenhez, atingindo uma eficiência de 83,0 %.

Palavras-Chave: Eletroforese 2D; Fertilidade; Morada Nova

INTRODUÇÃO

A raça Morada Nova, naturalizada brasileira e com origem no Nordeste do Brasil, apresenta elevada prolificidade, aliada ao menor intervalo entre partos e elevada habilidade materna (SOUZA et al., 2003). A eficiência reprodutiva é o principal fator para o aumento da lucratividade do rebanho, sendo a taxa de fertilidade, em grande parte, influenciada pelo macho. A fertilidade do reprodutor é avaliada pela capacidade de fecundar um maior número de fêmeas, variando, entre os animais domésticos, de 50 a 80% e dependendo, quase que exclusivamente, da capacidade funcional do sêmen ejaculado (LOVE e KENNEY, 1998).



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
ConsCiência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

O plasma seminal tem sido objeto de estudo de várias linhas de pesquisa, sob a justificativa da sua 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 fecundação (BELLIN et al., 1998). Durante muitos anos, ele foi considerado, apenas como um meio de transporte e sustentação dos espermatozoides, desde a ejaculação até a fertilização (KRAUS et al., 2005; TROEDSSON et al., 2005). Porém, Wolfe et al. (1993), baseando-se nas diferenças apresentadas na qualidade seminal, com o uso de bovinos férteis e com degeneração testicular experimental, sugeriram que os conteúdos do plasma seminal influenciavam na fertilidade masculina.

De acordo com Gasset (1997); Mortarino (1998); Roncoletta et al. (1999), os perfis eletroforéticos do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica em casos de infertilidade em touros. Já as proteínas solúveis e estruturais têm um importante papel no metabolismo do espermatozoide, com interferência na fertilidade dos touros (KILLIAN, 1999; RONCOLETTA et al., 1999).

Os *Spot's* são possíveis proteínas presentes nos géis bidimensionais, visualizadas por meio de programas de computador, como o Software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Esses *Spot's* são identificados e analisados de acordo com seus Pontos Isoelétricos (pI) e suas Massas Moleculares (MW), para posterior confirmação no espectrômetro de Massa.

Objetivou-se com este estudo quantificar e relacionar os *Spot's* encontrados no plasma seminal com a fertilidade dos reprodutores Morada Nova.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado na Embrapa Caprinos e Ovinos, na cidade de Sobral, localizada na região Norte, em pleno semiárido 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 mínima e máxima, de 22°C e 35°C, respectivamente.

A coleta do sêmen foi feita em setembro de 2013, antes da estação de monta 2013/2014 para avaliação dos aspectos andrológicos e seminais dos reprodutores. A coleta foi realizado com o auxílio de uma fêmea estrogênada com Cipionato de Estradiol como manequim, para estimular o aparecimento do estro e facilitar a coleta.

Logo após a coleta e anotações dos dados necessários, o material colhido foi levado para o laboratório onde foi centrifugado a 1500 g à 4 °C por 30 minutos, separando, assim o plasma seminal dos espermatozoides. Desta forma, foi determinada a proteína total por meio do plasma seminal utilizando o método de Bradford (1976).



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
Consciência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

Este método baseia-se na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G250* as membranas das proteínas, fazendo com que as estas adquiram uma coloração azul. Foi utilizado o espectrofotômetro modelo Ultrospec 2100 (GE Healthcare), adotando-se 595 nanômetros (nm) de comprimento de onda. A mensuração foi realizada em triplicata, utilizando a albumina sérica bovina (BSA) na determinação de uma curva padrão em concentrações conhecidas (0, 5, 10, 15, 20 ug/uL) de BSA.

Em seguida foi iniciada a Eletroforese Bidimensional com a Focalização Isoelétrica das “tiras” (pH 4 – 7), dividido em duas etapas: na primeira foi feita a Reidratação destas, deixando as mesmas por 16 horas overnight, para as proteínas aderirem à tira, sendo em seguida submetidas à Focalizadas por um período de cerca de oito horas para as proteínas se ordenarem nas tiras de acordo com o seus respectivos valores de pH (4 – 7).

Ao término dessa etapa as tiras foram Equilibradas com o uso de soluções que iriam destruir as ligações dissulfeto e impedir o rearranjo dessas ligações para não ocorrer superestimação das proteínas. Posteriormente, as tiras foram colocadas no gel de poliacrilamida à 12 % para dá início a corrida eletroforética, sendo submetidas a dois programas: Programa 1 (30 mA, 100 W por 15 minutos); Programa 2 (50 mA, 100 W por oito horas). Terminando essa corrida os géis foram retirados das placas com cuidado para não ocorrerem quebras e foram levados para cubas de vidro, sob agitação lenta à 25 rpm por um período de cerca de 12 horas, mergulhado numa solução de Comassie Brillant Blue (CBB).

Ao final desse período foi retirada a solução de CBB e colocada a solução de revelação por um período de cerca de oito horas.

Posteriormente, a este período, os géis foram levados ao ImageScanner II (GE Healthcare) para ser feito o Scanner dos mesmos e essas imagens serem, analisadas, posteriormente no Software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare).

A Taxa de Fertilidade de cada animal foi calculada dividindo o número de matrizes prenhas pelo número de matrizes cobertas, multiplicando esse resultado por 100 para se obter um resultado final em percentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O reprodutor 33 acasalou nove fêmeas, destas seis emprenharam, atingindo uma taxa de fertilidade de 66,7 % e o reprodutor 319 emprenhou cinco das seis fêmeas cobertas obtendo-se uma taxa de fertilidade de 83,0 % (Tabela 1).

Ao analisar e comparar a quantidade de *Spot's* encontrados nos géis bidimensionais dos animais 33



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
ConsCiência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

e 319, através do Software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), com a taxa de fertilidade desses animais foi possível observar que o animal 319, que apresentou uma maior quantidade de *Spot's*, foi também o animal com uma maior taxa de fertilidade, atingindo uma eficiência de 83,0 % (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de *Spot's* e *Spot's* correspondentes (matches) presentes nos Géis Bidimensionais e a Taxa de Fertilidade por animal.

Animal	R1	R2	Nº Médio de <i>Spot's</i>	Spots Correspondentes (Matches)	Taxa de Fertilidade (%)
33	32	27	29,5	32	66,7
319	42	41	41,5	44	83,0

Devido isto, o estudo funcional das proteínas é de crucial importância para a eficiência reprodutiva do macho. O plasma seminal dos ruminantes apresenta sua composição proteica variável, sendo a espécie e a estação do ano fatores de maior relevância (TEXEIRA *et al.*, 2009).

A grande maioria das proteínas seminais têm origem no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias, que se relacionam com os componentes da membrana espermática e estão envolvidas em vários procedimentos regulatórios integrados com a finalidade espermática e demais vertentes da capacidade fertilizante masculina (MOURA *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

A presença de um número expressivo de *Spot's* (Supostas proteínas) influencia diretamente a fertilidade reprodutiva de machos Morada Nova.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Caprinos e Ovinos pela disponibilidade dos animais e matérias necessários e à FUNCAP pelo apoio financeiro.

À Pesquisadora Dra. Ângela Maria Xavier Eloy pela orientação no projeto de pesquisa e pela disponibilidade em ajudar na resolução dos problemas.

Ao Pesquisador Dr. Diônes Oliveira Santos pela Co-orientação e ajuda quando preciso e solicitado.



XI Encontro de
Pós-Graduação
e Pesquisa
Consciência e Paz
Universidade Estadual Vale do Acaraú



**GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ**
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLIN, M.E. *et al.* Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science.**, v.76, p.2032-2039, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

GASSET, M. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorycholine-bound complexes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 250, p. 735-744, 1997.

KILLIAN, G.J. The role of marker protein in reproductive efficiency. Pennsylvania. **Veterinary Science Extension**, Pennsylvania, v. 29, p. 1112-1120, 1999.

KRAUS, M. *et al.* Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**. v.65, p. 33-46, 2005.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, v.50, p.955-972, 1998.

MORTARINO, M. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of Bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, Milano, v.19, p. 797-801, 1998.

MOURA, A. A. *et al.* Comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.169-188, 2007.

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**, 1999, v.36, p. 36-42.

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.

TEIXEIRA, A. V. C. *et al.* 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Anim. Reprod.** 6(4): 516-525, 2009.

TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v.58, p.453-456, 2005.

WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDELL, 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.1083-91, 1993.