

Análise da intensidade de volume diferencialmente expressa de proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco e chuvoso do semiárido nordestino

Roberta Vianna do Valle¹, Ângela Maria Xavier Eloy², Nadiana Maria Mendes da Silva³, João Ricardo Furtado⁴

¹Aluna do programa de pós-graduação em Zootecnia da UVA/Embrapa. Bolsista FUNCAP. e-mail: betadovalle@yahoo.com.br

²Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE

³Bolsista de DTI CNPq

⁴Assistente de laboratório da Embrapa Caprinos e Ovinos

Introdução

O estresse provocado por temperaturas ambientais elevadas, além de interferir nos parâmetros fisiológicos como temperatura retal e frequência respiratória, afeta o desempenho reprodutivo dos animais via eixo hipotálamo-pituitária-gônada (River e Rivest, 1991). A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada espécie, podendo diferir entre os tipos e a atuação das proteínas espermáticas.

Os componentes do plasma seminal, especialmente as proteínas, desempenham um papel importante em todos os processos relacionados com a capacidade fecundante dos espermatozoides. Diversas técnicas avançadas na proteômica, como eletroforese bidimensional, espectrometria de massa e cromatografia líquida, têm sido empregadas para a detecção de marcadores bioquímicos de fertilidade, de congelabilidade dos espermatozoides e viabilidade do sêmen (Jobim et al., 2003) de várias espécies de animais domésticos. A proteômica tem como objetivo estudar conjuntos de proteínas expressas pela célula em um dado momento e sob determinadas condições. Sendo assim, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE-PAGE), representa o método clássico e também mais utilizado para a separação e caracterização de proteínas do plasma seminal.

Objetivos

O objetivo desse trabalho foi identificar proteínas com intensidade de porcentagem de volume (% Vol) diferencialmente expressas no plasma seminal de caprinos da raça Moxotó nos períodos seco e chuvoso, com identificação do ponto isoelétrico e massa molecular, através da técnica de eletroforese bidimensional.

Metodologia

O experimento foi realizado na fazenda sede da Embrapa Caprinos e Ovinos e no Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), localizada no município de Sobral, Ceará, na região semiárida do Nordeste, à 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, mínimas e máximas, de 22°C e 35°C,

respectivamente, e umidade do ar de 69%. Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Moxotó, clinicamente sadios, com peso vivo entre 34 e 39 kg e idade variando de três a seis anos, mantidos sob sistema intensivo de criação, recebendo suplementação alimentar.

O sêmen foi colhido, semanalmente, nos meses de maio e junho de 2010 (período seco) e de janeiro e fevereiro de 2011 (período chuvoso) através de vagina artificial. Em seguida, o sêmen foi submetido a duas centrifugações, sendo a primeira a 1.500 g, à 4°C por 30 minutos para a separação do plasma seminal e, a segunda, a 10.000 g, à 4°C por 60 minutos visando retirar os fragmentos celulares. As análises de proteínas totais do plasma seminal foram realizadas através do método descrito por Bradford (1976).

Realizou-se um *pool* individual de cada animal, totalizando 10 *pools*, sendo cinco do período seco e cinco do período chuvoso, todos em duplicata.

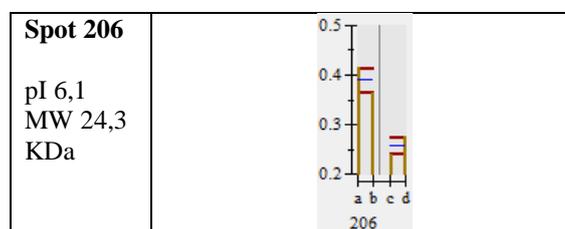
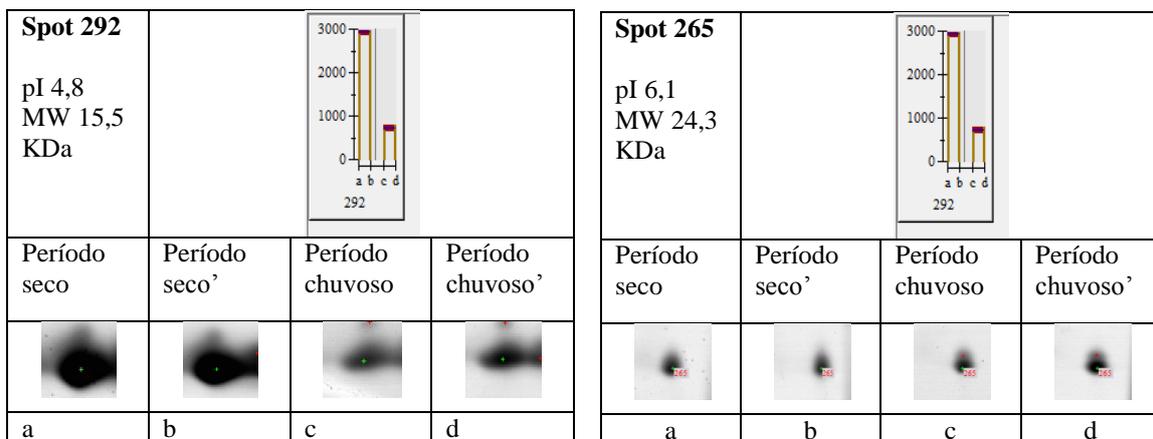
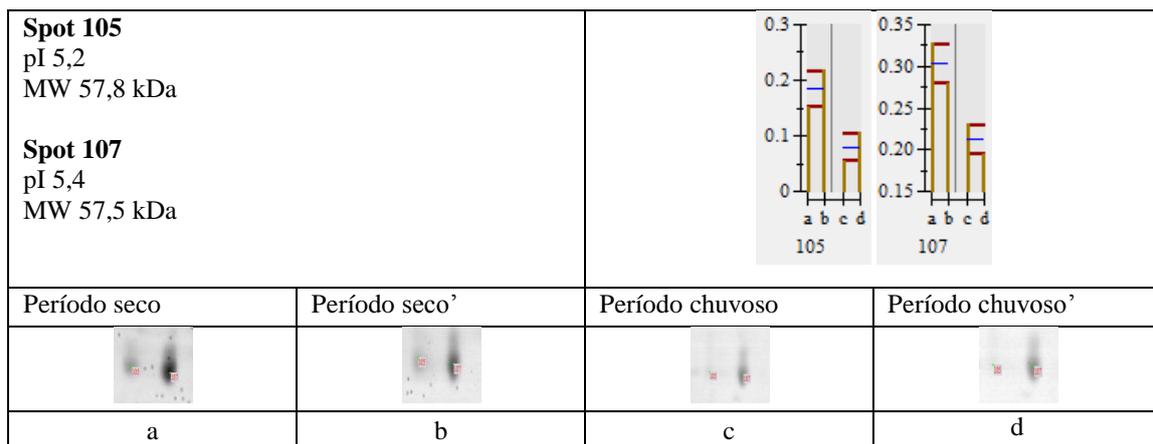
Para a eletroforese bidimensional, um volume contendo 400 µg de proteína foi adicionado a uma quantidade de solução de re-hidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, Ditioneitol (DTT) 65 mM, anfólitos livre 0,5% (IPG buffer, 4-7), CHAPS 0,5% e “traços” de azul de bromofenol suficientes para 250 µg. Essa solução foi incubada com tiras de 13 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7 por, aproximadamente, 16 horas. A focalização isoeletrica foi conduzida em um equipamento ETTAN™ IPGphorII™, sendo as tiras incubadas em duas soluções de equilíbrio logo após essa etapa. A primeira continha Tris (pH 8,8; 1,5 M) 50mM, Glicerol 87%, Uréia 6M, SDS 2%, “traços” de azul de bromofenol, água Milli-Q (q.s.p. 50 mL), adicionadas a 57,8 mg de DTT, enquanto que a segunda era adicionada 69,3 de iodocetamida ao invés de DTT. Os tempos de imersão das tiras foram de 15 minutos para cada solução, sob agitação. Após o equilíbrio, as fitas foram posicionadas no gel 2D SDS-PAGE. Após a corrida, os géis foram fixados por 15 minutos em solução I (etanol 30%, ácido fosfórico 2%) e corados em 200mL/gel solução II (Coomassie Blue G-250 – solução aquosa a 2%) por cerca de 24 horas. Depois os géis foram digitalizados através do programa LabScan (Amersham Biosciences). Em seguida a análise das imagens foi realizada através do programa Image Master 2D versão 6.0 (Amersham Biosciences). Os dados foram analisado através da estatística descritiva, sendo realizada a comparação da intensidade de % Vol dos *spots* entre os períodos seco e chuvoso.

Resultados e Discussões

Dados de intensidade de *spots* por % Vol diferencialmente expressos entre os períodos seco e chuvoso foram detectados através de histograma (Figura 1). Os *spots* que foram identificados apresentaram no período seco uma diferença de volume pelo menos maior que duas vezes em relação ao período chuvoso. É importante frisar que os *spots*, em geral, não apresentarem nenhum desvio padrão da média de intensidade em ambas repetições.

Os *spots* **105** e **107** apresentaram uma média aritmética de intensidade de %Vol diferencialmente expressa no período seco e chuvoso de, aproximadamente, 0,20% e 0,10%, e 0,31% e 0,22%, respectivamente, sendo esses *spots* mais expressos no período seco, de acordo com o histograma gerado pelo programa Image Master. Em relação aos pontos isoelétricos (pI) e massa molecular (MW), Rêgo et al. (2011), estudando o plasma seminal de ovinos Santa Inês, identificaram *spots* com pI variando entre 4,2 a 6,1 e MW entre 16,6 a 61,3 kDa como sendo *Ram Seminal Vesicles Protein 22 kDa* (RSVP-22). Provavelmente os *spots* **105** e **107**, que apresentaram pI 5,4 e 5,2 e MW 57,5 e 57,8 kDa, respectivamente em ambos os períodos estudados, sejam a RSVP-22.

Observou-se uma elevada intensidade de %Vol diferencialmente expressa nos *spots* **292** e **265** no período seco em relação ao período chuvoso, com pI 4,8 e 6,1 e MW 15,5 e 24,3, respectivamente. As proteínas referentes aos *spots* **206** e **265** apresentaram pI 6,1 e MW de 24,3 kDa, semelhantes aos valores da espermadesina detectadas no fluido das glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2006) e plasma seminal de bovinos (Tedeschi et al., 2000).



Período seco	Período seco'	Período chuvoso	Período chuvoso'
			
a	b	c	D

Figura 1: Resultado da análise computacional de alguns spots diferencialmente expressos nos períodos seco e chuvoso de plasma seminal de caprinos Moxotó no semiárido do Nordeste. No gráfico as barras vermelhas indicam o desvio padrão da média da intensidade dos volumes e a azul indica a média aritmética.

Considerações finais

A análise computacional de géis bidimensionais do plasma seminal de caprinos da raça Moxotó revelou que essas proteínas detectadas são diferencialmente expressas, sendo observado maior intensidade de volume no período seco em relação ao chuvoso. Entretanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos que controlam a diferenciação dos vários tipos celulares ainda não estão elucidados, necessitando de mais estudos. Esses resultados são fruto do primeiro estudo da proteômica seminal realizado na raça Moxotó na região semiárida.

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.
- JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R, SALBEGO, C.G. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Sci Vet**, v. 31, p.21-30,2003.
- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN. G. J. Proteins of accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididimal sperm from Hosltein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p. 214-222, 2006
- RÊGO, J.P.A.; SOUZA, C.E.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.; GOZZO, F.C.; MOURA, A.A.A. Major proteins from the seminal plasma of adult Santa Ines rams. **Anim Reprod Sci**, 2011.
- RIVER, C.; RIVEST, S. Effect of stress of the activity of the hypothalamic-pituitary gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.45, p.523-532, 1991.

TEDESCHI, G. et al. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p.6175-6179, 2000.