

Identificação das proteínas musculares de suínos submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida com Sódium Dodecil Sulfato (SDS).

S. M. Dierckx¹, P. R. Rodrigues-Ramos², J. Bortolozzi³

Departamento de Produção e Exploração Animal - FMVZ- UNESP - Botucatu – SP, Brasil

Identification of the muscular proteins of pigs submitted to the electroforesis in polyacrilamide gel with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

ABSTRACT: Fragments of two pigs muscles of Landrace, Large White, Duroc purebred and crossbred, the electroforesis was submitted in polyacrilamide gel with SDS, being objectified to verify there would be a specific pattern for pigs and to identify through the molecular weights, the main proteins. The results show that there would be a specific pattern for swine and they were identified miosina heavy chain, actina, troponina, tropomiosina and a light chain of miosina.

Key words: SDS-PAGE, miosina, actina, troponina, tropomiosina, muscles, pigs

© 2004 ALPA. Todos los derechos reservados

Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2004. 12 (1): 8-11

RESUMO: Fragmentos de dois músculos de suínos Landrace, Large White, Duroc e mestiços, foram submetidos a eletroforese em gel de poliácridamida com SDS, objetivando verificar se haveria um padrão específico para suínos e identificar através dos pesos moleculares, as principais proteínas. Os resultados mostraram que haveria um padrão específico para suínos e permitiram que fossem identificadas as cadeia pesadas e uma das leve de miosina, actina, troponina e a tropomiosina.

Palavras chave: SDS-PAGE, miosina, actina, troponina, tropomiosina, músculos, suínos

Introdução

Os músculos são formados por duas proteínas principais: a miosina e a actina. Nos músculos esqueléticos, cardíaco e liso, a miosina forma os filamentos espessos, enquanto que a actina forma os delgados dos sarcômeros, as unidades repetitivas básicas contráteis das fibrilas musculares. Os dois tipos de filamento estão entrelaçados e dispostos paralelamente um ao outro. A contração muscular é de responsabilidade da interação da actina com a miosina e com os componentes adicionais: ATP (produção de energia), Ca²⁺, tropomiosina e a troponina.

A miosina tem peso molecular de 470 KD, contendo 6 cadeias polipeptídicas: 2 pesadas com peso molecular de 200 KD e 4 leves cujos pesos moleculares variam de 15 a 27 KD.

A actina, possui peso molecular de 43 KD e além

de seu papel estrutural, ativa o ATP da miosina, desempenhando por isso importante papel na contração muscular.

A terceira proteína é a troponina, apresenta PM de 66 KD, interage com a actina e a troponina, auxiliando na regulação da interação entre actina e miosina que ocorre durante a contração.

A troponina tem peso molecular de 37 KD. Contém 3 subunidades diferentes: a TnT (37 KD) que se liga a tropomiosina; a TnI (20 KD) que inibe a interação entre a miosina e a actina e a TnC (18KD) reguladora das interações entre TnT e TnI, e outros componentes do sistema contrátil (Smith *et al.*, 1988)

Pette e Schnez (1977), analisando músculos *Psoas* e *soleus* de coelhos submetidos às técnicas de NADH-TR, SDH e mATPase pré incubada, em pH ácido e alcalino, para a diferenciação dos tipos de fibras, e submetendo também as amostras de proteínas miofibrilares, a eletroforese com SDS, em gel de dis-

Recibido Enero 13, 2002. Aceptado julio 15, 2003.

¹ Professora Assitente Doutor - Departamento de Produção e Exploração Animal - FMVZ - UNESP - Botucatu Caixa Postal 560-CEP 18618-000 - Botucatu - SP, Brasil. E-mail: sdierckx@fca.unesp.br

² Professor Assitente Doutor - Departamento de Física e Biofísica - IB - UNESP- Botucatu - SP

³ Professor Titualr - Departamento de Ciências - FC - UNESP - Bauru - SP

co, chegaram aos seguintes resultados: As fibras de contração lenta apresentaram uma cadeia de miosina leve específica para a contração lenta, enquanto as fibras de contração rápida vermelhas ou brancas apresentaram igual padrão eletroforético para as cadeias de miosina leve.

Young e Davey (1981) estudando 3 diferentes músculos bovinos, o masseter (M), o reto abdominal (RA) e esternomandibular (SM), observou que o primeiro possui predominantemente fibras de contração lenta; o segundo, fibras de contração rápida e o terceiro uma mistura entre ambas.

Jarsa *et al.* (1990) estudaram o polimorfismo e a identificação histoquímica em músculos de peixes de 2 espécies diferentes; usando as técnicas de SDH e mATPase para a padronização histoenzimológica e eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), e encontraram o padrão das cadeias leves da miosina, tropomiosina, troponina e proteínas C e M, específicas para os tipos de fibras do músculo.

Sarmah (1994) com o objetivo de estudar o padrão eletroforético e os pesos moleculares da miosina e suas sub-unidades, pela técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida, coletou amostras do músculo *biceps femural* de bubalinos. Obteve, como resultado, a ocorrência de uma cadeia pesada com peso molecular de 200 KD e três leves, LC₁ 25 KD, LC₂ 17 KD e LC₃ 14 KD, semelhantes às três cadeias leves da miosina do coelho.

O objetivos deste trabalho foi determinar e identificar dos possíveis padrões polimórficos das proteínas musculares, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

Material e Métodos

Foram usados 20 suínos (*Suis scrofa domesticus*), com peso ao redor de 90 kg, sendo 5 Landrace, 5 Large White, 5 Duroc e 5 mestiços, de ambos os sexos, abatidos em frigorífico da região de Botucatu -SP.

As amostras com 0,5cm de comprimento por 0,5cm de largura. eram de 2 músculos, o *m. Obturatori externi* (músculo Obturador externo) e o *m. Longus colli* (músculo Longo do pescoço), conforme Figuras 1 e 2. Elas foram colocadas em nitrogênio líquido, permanecendo até o momento das análises.

O processo de maceração seguiu Lemos e Moraes (1992). O teor de proteína foi determinado pela técnica do biureto, sendo aplicado em cada poço o equivalente a 50 mg de proteína. A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, com SDS usada foi a descrita por Hames e Rickwood (1990).

A corrida eletroforética, foi realizada a 4 °C, e a voltagem foi inicialmente mantida em 100 V, até que o indicador passasse para o gel de separação, quando

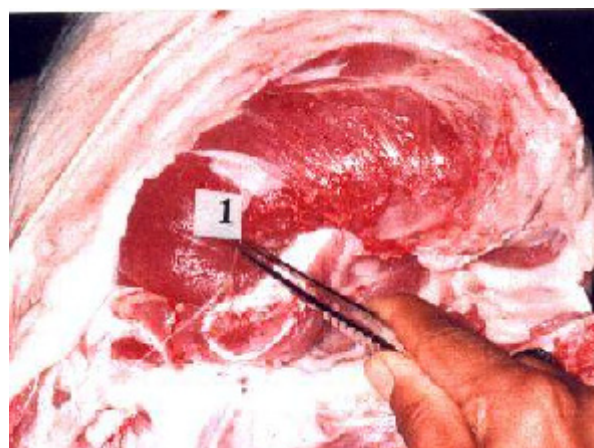


Figura 1. Músculo 1 *Obturatori externi* (Obturador externo) de suínos

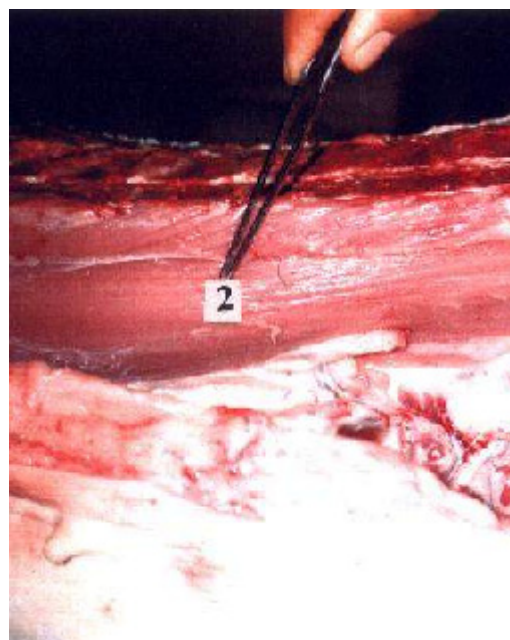


Figura 2. Músculo 2 *Longus colli* (longo do pescoço) de suínos

ocorreu a alteração para 150 V, sendo considerada encerrada logo após o indicador sair do gel.

A coloração do gel foi feita fazendo-se a imersão na solução fixadora por 20 minutos. Em seguida na solução descorante por 2 minutos, na solução Corante Azul de Comassie a 60 ° C, por dez minutos .

Transcorrido o tempo de coloração, a placa foi deixada na solução descorante de Comassie, até evidenciação das bandas. A seguir ela foi deixada por várias horas na solução preservante para que fosse hidratada. Para a análise das placas empregou-se o kit marca SIGMA MW - SDS 200, contendo marcadores com os seguintes pesos moleculares: miosina @ 205KD; b galactose @ 116 KD; fosforilase b @ 97,40

KD; albumina bovina @ 66 KD; albumina de ovo @ 45 KD; e anidrase carbônica @ 29 KD.

O modelo estatístico adotado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = m + GG_i + M: GG_{ij} + e_{ijk}$$

Onde: m = média

GG_i = efeito do i ésimo grupo genético

$M: GG_{ij}$ = efeito do j ésimo músculo dentro de grupo genético

e_{ijk} = erro residual

Resultados e Discussão

As proteínas dos músculos, para a maioria das amostras apresentou um padrão com 24, bandas (Figuras 3 e 4).

A análise de variância não mostrou efeito de grupo genético e nem de músculo dentro de grupo genético, como pode ser observado na figura 3, onde se observa que todos os poços apresentam as mesmas bandas, independentemente do músculo e do grupo genético.

Para melhor discussão e interpretação dos resultados obtidos, o gel foi dividido em regiões, referenciando os marcadores moleculares.

A região 1, situada entre o ponto de aplicação na parte superior do gel e o marcador de maior peso molecular, a miosina (205 KD). Nesta região notou-se a presença de 1 banda., com PM de 251,44 KD.

A região 2, localizada entre os marcadores miosina e *b* galactose (116 KD), possibilitou verificar 2 bandas, com PM de 192,03 e 165,12 correspondentes às cadeias pesadas de miosina, com molecular molecular ao redor de 200 KD (Jaenicke *et al.*, 1994).

A região 3, limitada, superiormente pela *b* galactose e inferiormente pela fosforilase *b* (97,4 KD), apresentou uma banda de fraca intensidade de coloração, com peso molecular de 100,79 que poderia corresponder à a actinina que, segundo Boles *et al.* (1992) teria peso molecular aproximado de 100 KD.

A região 4, limitada pelos marcadores fosforilase *b* e albumina bovina (66 KD) apresentou 6 bandas

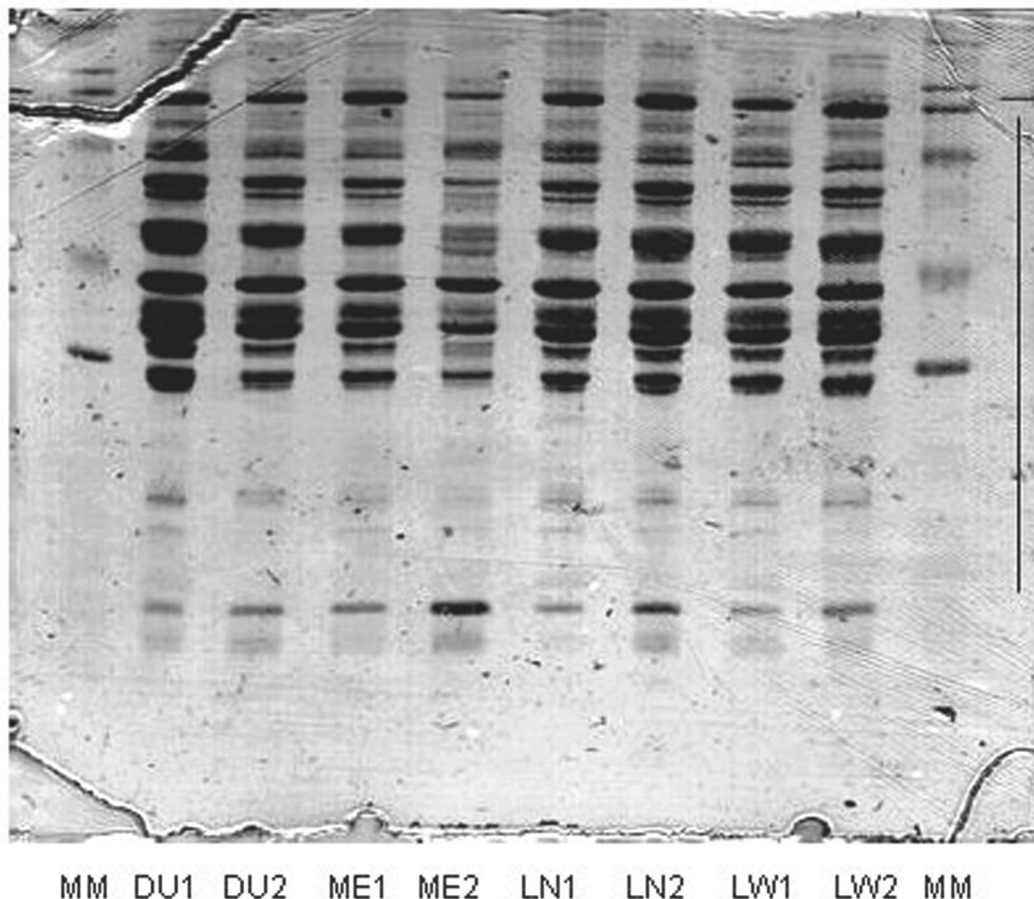


Figura 3. Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida com SDS 12,5% dos músculos Obturador externo (1) e Longo do pescoço (2) de suínos Landrace (LN), Large White (LW), Duroc (DU) e Mestiços (ME), e os marcadores moleculares (MM).

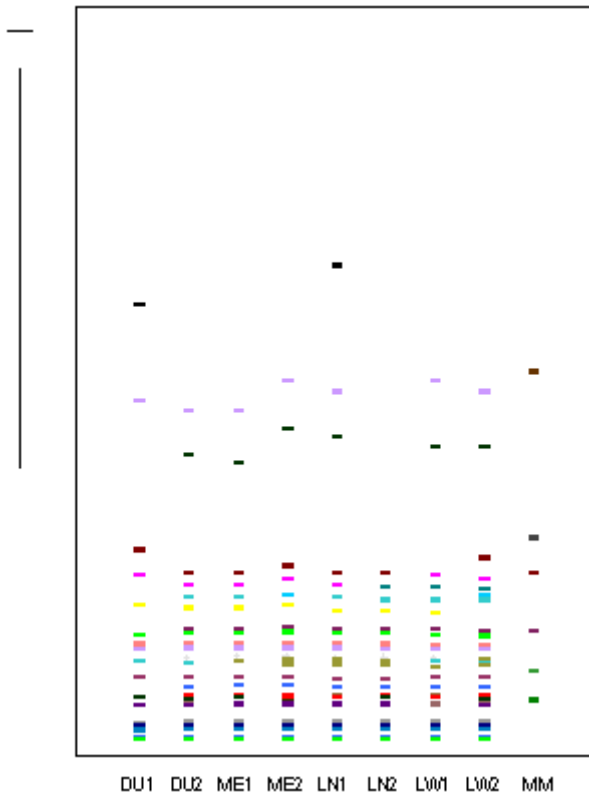


Figura 4. Eletroferograma dos padrões de SDS das proteínas dos músculos Obturador externo (1) e Longo do pescoço (2) de suínos Landrace (LN), Large White (LW), Duroc (DU) e Mestiços (ME), e marcadores moleculares (MM).

correspondentes às proteínas com os seguintes pesos moleculares: 93,28; 89,00; 85,07; 82,94; 77,80 e 67,13 KD. A última, corresponde à tropomiosina.

A região 5, situada entre a albumina bovina (66 KD) e albumina de ovo (45 KD), mostrou 6 bandas fracas. Elas são, respectivamente: 64,39; 58,81; 56,68; 51,19; 50,07; 49,27 e 47,73 KD.

A região 6, situada entre os marcadores albumina do ovo e a anidrase carbônica (29 KD), apresentou 6 bandas 41,13; 36,65; 33,54; 31,01 e 30,37 KD, que corresponderiam a actina com PM de aproximadamente 45 KD, a troponina com 37,74 KD e concordantemente com Boles *et al.* (1994), que também detectou uma banda com peso molecular ao redor de 41 KD.

A última região não permitiu identificar as proteínas restantes, pois elas se situaram abaixo do marcador molecular de menor peso, tendo sido observadas 8 bandas. Embora não seja possível a confirmação, tendo-se em vista a falta de marcadores de mais baixo peso molecular, possivelmente nesta última região do gel poderíamos encontrar as bandas correspondentes às cadeias leves de miosina com peso molecular variando de 15 a 27 KD e também, as subunidades da troponina a TnI (20KD) e a TnC (18KD).

A eletroforese das proteínas nativas em gel de poliácridamida a 12,5% com SDS não mostrou diferenças no padrão eletroforético para grupos genéticos e músculos. Isto pode ser explicado talvez, pelo fato de que quando as proteínas são tratadas com SDS, a migração ocorre por diferença de peso molecular entre as proteínas. Indicado neste trabalho, que não houve diferença entre elas, assim, as proteínas são as mesmas e permaneceram preservadas, permitindo que fossem identificadas.

Conclusões

1. Há realmente um padrão eletroforético específico para suínos, que não foi alterado pelo efeito de músculo ou grupo genético
2. A técnica usada permitiu a identificação das cadeias pesadas e de uma das leve de miosina, da actina, troponina e tropomiosina, além da presença de várias bandas com baixo peso molecular.

Literatura Citada

- Hames, B.D., D. Rickwood. 1990. Gel electrophoresis of proteins, 2ª ed. New York.
- Jarsa, P.K., C. L. Talesar, S. Kiran. 1991 Polymorphism of myofibrillar proteins in histochemically identified myotomal muscle fibre types of *Neteropneustes fossilis* (Bloch) and *Labeo rohita* (Kamilton) J. of Fish Biol. 38:165-173.
- Lemos, A.L.S.C., M. A. C. Moraes. 1992. Identificação eletroforética de peixes de água doce (Família *Pimelodidae*) de valor comercial. Alim. Nutr. 4:57-63.
- Pette, D., V. Schnez. 1977. Myosin lighth chain patterns of individual st and slow-twitch fibres of rabbit muscles. Histochemistry, v.54, p.97-107.
- Sarmah, S., L. N. Singh. 1994. Electrophoretic pattern and molecular weight of buffalo myosin and its subunits. Indian Vet. J. 71:256-259.
- Young, O. A., C. L. Davey. 1981. Electrophoretic analysis of proteins from single bovine muscle fibres. Biochem. J. 195:317-327.