

Avaliação dos parâmetros espermáticos e perfil proteômico utilizando eletroforese unidimensional de caprinos da raça moxotó e saänen.

Resumo: O presente trabalho avaliou os parâmetros espermáticos bem como o perfil proteômico dos espermatozóides de caprinos (*Capra hircus*) das raças saanen e moxotó. A partir das coletas de sêmen e avaliação de sêmen não se observou diferença significativa quanta concentração e motilidade dos espermatozóides. Porém, uma pequena diferença quanto ao volume do ejaculado foi observado. Os géis de eletroforese unidimensional mostraram bandas protéicas 14, 18, 66 e 97 KDa para ambas as espécies estudadas e bandas entre 28 KDa apenas para espécie moxotó. Mesmo havendo baixa variação quanto o número e a frequência de distribuição das bandas protéicas entre as espécies se faz necessário um estudo em análise usando eletroforese bidimensional que nos permite esclarecer em termos quantitativos as proteínas que estão expressas em cada raça.

Palavras-chave: Caprinos, parâmetros espermáticos, eletroforese 1D.

Introdução

No Nordeste brasileiro concentra-se o maior rebanho de caprinos do país, onde o Ceará ocupa a quarta posição segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

Apesar de numericamente expressivo, o rebanho caprino mantém índices produtivos e reprodutivos deficientes, principalmente em razão dos baixos investimentos em tecnologias no sistema de manejo nutricional, infra-estruturar, manejo sanitário e reprodutivo, que é fruto do sistema de produção adotado pela maioria dos criadores (SANTOS *et al.*, 2005).

Caprinos da raça Saanen considerada uma raça exótica originada da Suíça foram importados para o semiárido nordestino, com o objetivo de aumentar a produção de leite, sendo uma das raças mais utilizadas para produção e melhoramento genético. Enquanto que raça Moxotó, considerada nativa originada do vale do Rio no estado de Pernambuco e caracteriza-se por apresentar pequeno porte, pelagem uniforme, boa prolificidade, alta rusticidade, precocidade reprodutiva e resistência às doenças, porém sem aptidão definida (SANTOS 2005).

Visando o aumento na produtividade e nas condições adaptativas é feito cruzamentos entre raças exóticas e nativas, com características fenotípicas desejáveis, pra obtenção de cabras de grande produção de leite e boa condição adaptativa ao meio (MEDEIROS *et al.*, 1994). A seleção se torna uma ferramenta importante para eficiência reprodutiva e aumento na fertilidade dos animais.

O estudo do proteoma da célula espermática poderá esclarecer as diferenças e peculiaridades de cada raça ao semi-árido, fornecendo um conhecimento mais detalhado das proteínas que poderão ser utilizadas na produção de animais mais especializados, bem como, para a seleção de reprodutores mais férteis (Rego 2010).

A análise proteômica dos fluidos reprodutivos fornece informações importantes para a compreensão dos mecanismos que determinam a capacidade fecundante dos gametas masculinos e, conseqüentemente, dos reprodutores. (MOURA *et al.*, 2011)

Objetivo

O presente estudo tem como objetivo analisar os perfis protéicos das células espermáticas de caprinos da raça saanen e moxotó visando contribuir para os estudos proteômicos.

Materiais e métodos

Animais e coleta do sêmen

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Moxotó e Saanen com idade variando de 18 a 21 meses, os quais tinham fertilidade conhecida, submetidos a regime de criação intensivo na Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral, CE. O sêmen foi colhido usando vagina artificial e os parâmetros espermáticos como volume, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva foram analisados usando microscópio eletrônico para ambas as raças em estudo. Para separação do plasma seminal com os espermatozóides o sêmen foi centrifugado a 1.500g por 30 minutos à 4°C, sendo estes armazenados a -80°C ate o uso da extração de proteínas espermáticas.

Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro, sendo a leitura realizada

no comprimento de onda de 595 nanômetros (nm) e tendo como padrão a Albumina Sérica Bovina (BSA).

Extração de proteínas

O *pellet* de espermatozóides foi descongelado a 37 °C e lavados com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e centrifugados a 4.000 x g por 10 minutos por três vezes. Foi utilizado o detergente CHAPS a 4 % para a lise das células que ficou em mesa agitadora por 2 h e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos coletado o sobrenadante e precipitado em três volumes de acetona/TCA 10% gelada por 16 horas a 20°C. Em seguida os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos, o *pellet* formado foi lavado 3x com acetona pura gelada e secado a temperatura ambiente e ressuscitado em 100 µL de uréia/tioureia. As proteínas totais foram quantificadas pelo o método de Bradford (1976) e a integridade protéica foi analisada por SDS-PAGE.

Eletroforese unidimensional

A eletroforese na presença de SDS foi realizada utilizando as cinco amostras de espermatozóides de cada raça. A partir das leituras das absorvâncias foi obtida uma média para cada triplicata, com bases nessas médias o valor de µg/µL em cada amostra foi calculado, posteriormente realizou-se o nivelamento para que cada poço apresentasse a mesma quantidade de proteínas (25,95µg/µL), para o padrão foi utilizado marcador molecular de baixo peso. O tempo de corrida foi estimado em uma hora e trinta minutos, nas seguintes condições: 150 V, 30 mA. Foi colocado na solução de fixação (Etanol 40 %, Ácido acético 10%) por 15 minutos e posteriormente corado com Comassie Brilliant Blue G-250 por 24 horas e descorado com água quente.

Resultados e discussões

De acordo os parâmetros espermáticos das amostras não se observaram diferença significativa dos valores obtidos de concentração e motilidade espermática. Contudo, com relação ao volume do sêmen, verificou-se uma diferença numérica razoável entre as raças. Tais resultados sugerem uma adaptação da raça Saanen às condições climáticas do semiárido, tendo em vista a comparação com uma raça rústica como a Moxotó.

A dosagem de proteínas totais dos animais da raça moxotó apresentou os valores de 27,85µg/µl, 26,8µg/µL, 17,25 µg/µL, 26,8µg/µL, 27,9 µg/µL para os animais 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Com relação aos animais da raça saänen, os valores foram de 25,95 µg/µl, 18,85 µg/µL, 22,2 µg/µL, 14,25 µg/µL e 28,6µg/µL para os animais 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Nas análises dos géis de eletroforese observou-se bandas protéicas entre 14, 18, 66 e 97 KDa para ambas as espécies estudadas e bandas entre 28 KDa apenas para espécie saänen. Algumas proteínas apresentaram bandas de baixo peso molecular (< 30 kDa), dentre elas as de 14-15 kDa podendo estas se tratarem de espermadesinas, uma vez que elas apresentam baixo peso molecular (Tadesthi, et al. 2000). Além disso, proteínas de 18-20 KDa podem estar associadas à superfície da membrana do espermatozóide de vários animais domésticos (Jobim et. al., 2003). Algumas proteínas que atuam na motilidade progressiva em bovinos podem ter massa de 37,5kDa (Shivaji et al. 1990), ou variando de 28 a 30kDa (Manjunath, 1984). As proteínas de 97 KDa atuam na função de proteção dos espermatozóides, tanto na prevenção (PÉREZ-PÉ et al., 2001) quanto no reparo (BARRIOS et al., 2000) aos danos na membrana espermática sofridos durante a criopreservação.

Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos foi possível encontrar diferenças entre as duas raças tanto no volume do sêmen como na distribuição de bandas protéicas por SDS-PAGE. É provável que este número seja ainda maior, para isso torna-se necessário o uso de técnicas complementares como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa para a identificação das proteínas de forma mais precisa.

Agradecimentos

Agradeço ao programa de pós-graduação em zootecnia UVA/Embrapa, ao meu orientador Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha e minha Co-orientadora Dr. Angela Maria Xavier Eloy, aos órgãos de financiamento CAPES e FUNCAP, as instituições parceiras UVA, NUBIS e Embrapa que me permitiu o uso de suas infra-estruturas e animais e por fim a todos os meus companheiros de trabalho nesse projeto, tanto do NUBIS, Embrapa e UVA que me auxiliaram direto e indiretamente para realização desse trabalho o meu muito obrigado a todos.

Referência bibliográfica

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BARRIOS, B. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction, Madison**, v.63, p.1531-1537, 2000.

BECHMAN-SHAKED, O. et al. Presence of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human sperm. **International Journal of Andrology, Schaumburg**, v.23, 702–708, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Senso Agropecuário**, 2010 Disponível em: www.ibge.gov.br.

MANJUNATH, P. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in Bull seminal plasma. In: SAIRAM, M.R.; ATKINSON, L.E. (Eds.) Gonadal proteins and peptides and their biological significance. Singapore: **World Scientific**, 1984. p.49-61.

MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, R.N.; GIRÃO, E.S. et al. Caprinos: princípios básicos para sua exploração. Teresina: **Embrapa-Meio Norte**, 1994. 177p.

MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A.; RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.A.M.; OLIVEIRA, R.V.; MENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.

Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes Dev**, v.20, p.411-416, 2006.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology, Amsterdam**, v.56, p.425-434, 2001.

Premkumar E, Bhargava PM. Transcription and translation in bovine spermatozoa. **Nat New Biol**, v.240: p.139-143, 1972.

RÊGO, J. P. A. Análise proteômica do plasma seminal de carneiros santa inês adultos. Fortaleza-CE. 2010. 107f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia)**. Universidade Federal do Ceará – UFC.

SANTOS, B. C. F.; *et al.* Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semi-árido do nordeste brasileiro. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 29, n. 1, p. 142-149, jan./fev. 2005.

SHIVAJI, S. et al. Proteins of seminal plasma. New York: **John Wiley and Sons**, 1990. 526p.

TEDESTHI G., OURGE E, MORTARINO M., NEGRI A. & RONCHI S. Purification and primary structure of a spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, 20, 6175-6179, 2000.

VILLEMURE, M. et al. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. **Reprod. Biol. Endocr.**, 1, 39, 2003.

