

MAPEAMENTO UNIDIMENSIONAL (1D) DE BANDAS PROTÉICAS NOS ESPERMATOZOIDES DE CAPRINOS MOXOTÓ

Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos¹, Amanda Aragão Ávila², Fábio Carreiro Chaves de Melo³, Roberta Vianna do Vale⁴, Ângela Maria Xavier Eloy⁵, Fátima Révia Granja Lima⁶

Resumo

O espermatozoide é a célula reprodutiva masculina que contribui no processo de fecundação com seu DNA, sendo essas células formadas por organelas como a mitocôndria e proteínas (Hafez e Hafez, 2004). Alguns trabalhos têm se interessado em estabelecer o perfil das bandas proteicas presentes no plasma seminal de caprinos, no entanto, esses estudos esquecem que a modulação dessas proteínas depende de sua interação com as células espermáticas. Objetivou-se neste trabalho mapear as proteínas, visando a identificação de bandas proteicas nos espermatozoides na raça Moxotó. Foram utilizados ejaculados de cinco reprodutores caprinos. Para extração das proteínas espermáticas, as amostras foram lavadas em solução Tris-Cloride (TC), após a terceira lavagem, adicionou-se TC na amostra a qual foi estocada, sendo o sobrenadante utilizado para identificar as bandas através da eletroforese unidimensional (1D) SDS-PAGE. Foram identificadas 19 diferentes bandas no gel. dentre as identificadas, as bandas de 23 kDa e 26 kDa aparecem em maiores concentrações no gel e as de peso molecular de 18 kDa e 64 kDa, apresentaram menores concentrações. Essas proteínas são importantes para futuros estudos visando conhecer o aspecto molecular da raça.

Palavras-chave: acrossoma, *Capra hircus*, fertilidade, peso molecular.

Introdução

O espermatozoide é a célula reprodutiva masculina que contribui no processo de fecundação com seu DNA para completar o número diploide do zigoto a ser formado (Hafez e Hafez, 2004). Essas células são formadas por organelas como a mitocôndria e proteínas presentes tanto na região da membrana espermática, no acrossoma, na cabeça e cauda do espermatozoide (Hafez e Hafez, 2004). Alguns trabalhos estão interessados em estabelecer o perfil das bandas proteicas presentes no plasma seminal de caprinos

como em estudos de Teixeira et al. (2009) com a raça Anglo-Nubiano, que estabeleceu bandas como indicativo de fertilidade ao longo do ano no Nordeste. No entanto, esses estudos esquecem que a modulação dessas proteínas depende de sua interação com as células espermáticas, sendo poucos os estudos sobre a proteômica dessas células.

Em estudos com ovinos de raça Morada Nova (Santos et al., 2012), observaram no perfil proteico dos espermatozoides bandas variando entre 25-75 kDa, sendo estas importantes na biossinalização intracelular (Moura et al., 2011), o que explica em parte, a importância da caracterização das proteínas presentes nos espermatozoides. Assim como no mesmo estudo, foi observada a banda 104 kDa (Santos et al., 2012), podendo esta ser responsável pela redução da integridade do acrossoma (La Falci et al., 2002), justificando que a ocorrência da reação do acrossoma pode acontecer de forma que não ocorra fertilização. Portanto, novas pesquisas têm surgido com o intuito de selecionar animais com indicativos de superioridade, investigando as proteínas espermáticas de modo a esclarecer a capacidade fecundante dos espermatozoides.

O presente estudo tem como objetivo identificar e mapear as proteínas extraídas dos espermatozoides, visando contribuir para os estudos proteômicos da raça Moxotó (*Capra hircus*).

Material e Métodos

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Moxotó, com idade variando de 18 a 21 meses, os quais tinham fertilidade conhecida, submetidos a regime de criação intensivo na Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. O sêmen foi colhido em setembro de 2011, em vagina artificial e, centrifugado a 1.500g por 30 minutos à 4°C para separação do plasma seminal dos espermatozoides, sendo estes armazenados a -20°C. Foi feito um “pool” dos espermatozoides coletados, com 200µl de cada amostra que foi homogeneizada.

Para extração das proteínas espermáticas, as amostras foram descongeladas em 200µl de solução de Krebs e centrifugadas a 10.000g por 5 minutos à 4°C, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o “*pelet*” foi lavado, mantendo-se a força gravitacional em 10.000g por 10 minutos à 4°C, com 800µl da solução Tris-Cloride (TC) por três vezes, também desprezando-se o sobrenadante. Após a lavagem, adicionou-se 200µl de TC na amostra a qual foi estocada durante uma hora a -20°C. Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais

realizada pelo método de Bradford (1976) e para identificação das bandas proteicas através da eletroforese unidimensional (1D) SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5% de concentração, em duplicata. As bandas proteicas foram analisadas através do programa BioDoc-It and VisiDoc-It, Gel Documentation System da UVP.

Resultados e Discussões

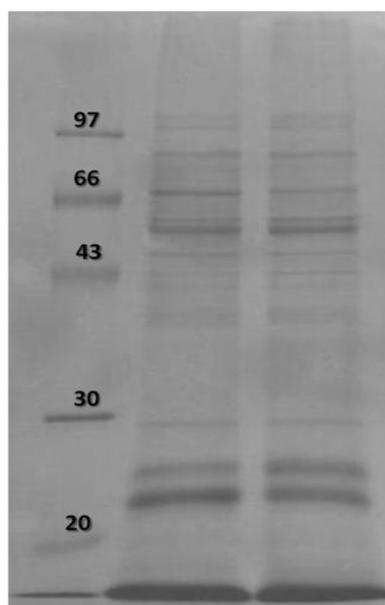
Foram identificadas 19 diferentes bandas no gel (Figura 1), distribuídas conforme representadas na Tabela 1, cujos pesos variaram de 16 a 103 kDa. Onze bandas tiveram peso molecular ≤ 50 kDa, enquanto nove tiveram peso acima (>50 kDa), tendo portanto maior quantidade de proteínas de baixo peso molecular. Observou-se boa reprodutibilidade quanto a presença dessas bandas no gel (R1 e R2), demonstrando maior confiabilidade dos resultados.

Tabela 1. Pesos moleculares das bandas proteicas dos espermatozoides de caprinos Moxotó.

Pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
R1	103	97	85	75	70	64	60	56	49	47	43	42	39	38	29	26	23	18	16
R2	103	97	85		71		61	57	50	47	44	42	39	38	30	26	23	18	16

R1 e R2 representam as repetições do "Pool" aplicadas ao gel.

Figura 1. Gel de poliacrilamida unidimensional SDS-PAGE a 12,5% dos espermatozoides de caprinos Moxotó antes da estação de monta.



Dentre as bandas moleculares identificadas, as bandas 23 kDa, 26 kDa e 85 kDa aparecem em maiores concentrações no gel, 7,63%, 8,16%, e 5,94%, respectivamente. A proteína de 26 kDa, a Prostaglandina D-sintetase (PGDS), tem sido alvo de estudos por conferir baixa fertilidade aos touros no Brasil nas raças Limousin (Chacur et al., 2003) e Nelore das variedades padrão e mocho (Chacur et al., 2006). Havendo controvérsia na espécie suína, pois em trabalho realizado por Flowers (2001) foi demonstrado a importância biológica da proteína de 26 kDa, presente no plasma seminal do machos suínos, e que a sua concentração elevada no ejaculado, correspondeu ao aumento das taxas parição (mais de 86%) e no aumento do número de leitões nascidos vivos (> 11). Em bovinos, a PGDS também foi localizada na região apical do acrossoma dos espermatozoides ejaculados (Gerena et.al, 2000), assim como no presente estudo com caprinos Moxotó, podendo caracterizar essa como uma proteína presente nos espermatozoides da raça. No entanto, há necessidade de trabalhos na espécie caprina.

A banda de 85 kDa foi observada em suínos por Bianchi et al. (2008), sendo esta relacionada com a integridade da membrana plasmática, sendo > 55% em sêmen de carneiro pós congelamento.

As bandas de 18 kDa, 64 kDa e 75 kDa, apresentaram menores concentrações, 3,82%, 2,41% e 2,20%, respectivamente. Jobim et al. (2005) encontraram em carneiros *spots* de 17-18 kDa – pI 4,8 e 18-19 kDa – pI 5,2, sendo consideradas como as BSP's A1/A2. Tais proteínas também poderiam corresponder as caltrinas, que são decapacitantes de baixo peso molecular que previnem o aumentando da concentração de íon Ca^{+2} , evitando a capacitação espermática precoce provocada pelo processo de criopreservação (Flesch e Gadella, 2000).

A banda de 64 kDa é a prealbumin epididimal specific (PES), também encontrada no epidídimo e secretada sob o controle da testosterona. Esta liga-se a região periacrossômica dos espermatozoides imaturos e permanece ligada mesmo após a ejaculação, podendo estar envolvida nos processos de reação acrossômica (Fournier-Delpech et al., 1988). A de 75 kDa pode ser uma osteopontina (OPN), a qual, é uma proteína ácida, com peso molecular entre 25 a 75 kDa (Moura et al., 2011). A OPN possui funções como adesão celular, o que sugere sua participação na interação entre espermatozoide e oócito (Gonçalves et al., 2007).

As bandas de 70-71 kDa, 60-61 kDa, 56-57 kDa, 50-49 kDa, foram mapeadas, tendo como peso molecular um valor referente a variação entre os dois pesos, possuindo concentrações intermediárias no gel, devendo ser investigadas em estudos futuros.

Considerações finais

Algumas bandas proteicas provavelmente ligadas a fertilidade e infertilidade foram descritas neste trabalho para a raça naturalizada Moxotó. Essas proteínas são importantes para futuros estudos visando a conservação dos caracteres reprodutivos da raça, estudos esses associados a testes *in vitro* e *in vivo* que comprovem a função destas proteínas.

Referências Bibliográficas

BIANCHI, I.; CAMPOS, V. F.; CAVALCANTI, P. V.; KAEFFER, C.; CORRÊA, E. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; LUCIA JUNIOR, T.; DESCHAMPS, J. C.; CORRÊA, M. N. Fatr do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-congelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 384-388, 2008.

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

CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos Taurus indicus*). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 87-93, 2006.

CHACUR, M. G. M.; RABESQUINE, M. M.; MACHADO NETO, N. B. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal: correlação com o quadro espermático. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 185-186, 2003.

FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**, USA, p.1-4. 2001.

FOURNIER-DEKPECH, S.; HOLLAND, M. K.; SKUDLAREK, M. D.; RANKIN, T. L.; ORGEBIN-CRIST, M. C.; COUROT, M. A ram epididymal secretory shares common antigenic determinants with rat epididymal proteins and human seminal plasma proteins. **Reproduction, Nutrition Development**, 1988, 40, 735-744.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (αv and $\alpha 5$) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.468-474, 2007.

GERENA, R. L.; EGUCHI, N.; URADE, Y.; KILLIAN, G. J. Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in adult murine testis and epididymis. **Journal of Andrology**, v.21, p.848-854, 2000.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a ed. Manole Ltda, Barueri-SP, 2004.

JOBIM, M. I. M. et al. BSP A1/A2 proteins in RAM seminal plasma. **Theriogenology**, v. 63, p.2053-2062, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/15823360>>. Acesso: ago 2012.

LA FALCI, V. S. N.; TORTORELLA, H.; RODRIGUES, J. L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v.57, p.1035-1048, 2002.

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**, v.35, n.2, p.139-144. Belo Horizonte, MG, 2011.

TEIXEIRA, A. V. C.; ELOY, A. M. X. FURTADO, J. R.; PINHEIRO, R. R.; PONTES, M. S. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Animal Reproduction**, v.6, n.4, p.516-525, Oct./Dec. 2009.

SANTOS, F. C. P.; ELOY, A. M. X.; FERREIRA, K. S. M.; SILVA, N. M. M.; FURTADO, J. R.; LIMA, F. R. G. Proteínas dos espermatozoides de ovinos Morada Nova. Brasília, DF. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia (SBZ). **Anais...** 2012.

¹ Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. Bolsistas CAPES. E-mail: fagnercavalcante@hotmail.com

² Aluna do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. Bolsistas Funcap.

³ Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. Bolsistas Funcap.

⁴ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA/Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. Bolsistas Funcap.

⁵ Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, Orientadora. E-mail: angela@cnpq.embrapa.br

⁶ Docente do curso de graduação em Zootecnia da UVA, Co-orientadora.