

# X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

## PERFIL PROTEÔMICO DO PLASMA SEMINAL DE CAPRINOS SAANEN

**Katianne Freitas dos Santos<sup>1\*</sup>, Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão<sup>2</sup>, João Garcia Alves Filho<sup>3</sup>, Ângela Maria Xavier Eloy<sup>4</sup>, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia - UVA, Ceará. Bolsista CNPq. E-mail: [katiannefreitas@hotmail.com](mailto:katiannefreitas@hotmail.com); <sup>2</sup>Estudante do Curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA, Ceará; E-mail: [paulodetarsoara-gao10@gmail.com](mailto:paulodetarsoara-gao10@gmail.com); <sup>3</sup>Professor Substituto do curso de Biologia da UVA, Ceará; E-mail: [garciabio@gmail.com](mailto:garciabio@gmail.com); <sup>4</sup>Co-orientadora, pesquisadora na Empresa Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral-CE) E-mail: [angela.eloy@embrapa.br](mailto:angela.eloy@embrapa.br); <sup>5</sup>Orientador, professor Efetivo da UVA, Ceará; E-mail: [rmaranguape@gmail.com](mailto:rmaranguape@gmail.com)

### RESUMO

O estudo dos componentes do plasma seminal representa uma alternativa para avaliar o desempenho reprodutivo dos animais, através do conhecimento de fatores que interferem diretamente no processo de fertilização, maturação e capacitação. Apesar de existirem muitos trabalhos sobre o conhecimento da importância do plasma seminal, ainda existem diversas proteínas a serem identificadas, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional. Através de técnicas proteômicas, é possível separar centenas de proteínas. Além disso, os estudos proteômicos são importantes para a detecção de processamentos pós-traducionais. O objetivo deste estudo foi detectar e identificar algumas proteínas presentes no plasma seminal de caprinos da raça Saanen utilizando a eletroforese bidimensional. No presente trabalho, foi realizada a purificação do plasma seminal, quantificação pelo método de Bradford, eletroforese bidimensional e identificação de 10 proteínas, a partir de dados de pI e massa molecular. Os géis obtidos apresentaram 291 *spots* distribuídos na faixa de pH 3-10. Foram identificadas proteínas relacionadas à espermatogênese e capacitação dos espermatozoides. Contudo, ainda é necessário mais estudos acerca dessas proteínas.

**Palavras-Chave:** biomarcadores; eletroforese bidimensional; proteínas

### INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil protéico do plasma seminal de caprinos Saanen. A raça de caprinos Saanen é originária da Suíça, vem se destacando por ser uma das mais utilizadas para produção e melhoramento genético do rebanho de caprinos leiteiros. O plasma seminal é um fluido bioquimicamente complexo atua no transporte dos espermatozoides, capacitação e maturação. Algumas proteínas do fluido seminal participam da regulação de diversos processos associados à fisiologia reprodutiva. São substâncias originadas do plasma sanguíneo, epidídimo e, principalmente das glândulas sexuais acessórias (JOBIM et al., 2011). Constituídos por compostos orgânicos e inorgânicos, a saber: íons, sódio, potássio, cloreto e magnésio, açúcares, aminoácidos, lipídeos, carboidratos e as proteínas especiais, incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, inibidores, imunossuppressores, sendo os constituintes orgânicos mais abundantes (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Algumas dessas proteínas podem afetar a morfologia espermática, a motilidade, a reação acrossômica, a capacitação espermática, e o transporte dos espermatozóides, melhorando a ovulação, o aumento do fluxo sanguíneo para o útero e tubas uterinas e, em consequência, a fertilidade (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Estudos proteômicos do plasma seminal podem contribuir para a identificação de proteínas, a nível molecular, que possam atuar sobre a fertilidade ou como ocorre o processo de maturação e capacitação do espermatozóides. A obtenção de uma eletroforese bidimensional (2DE) de qualidade fornece o perfil de proteínas expressas, permitindo o mapeamento de marcadores moleculares relacionadas à reprodução, produção, podendo contribuir para a conservação da espécie e conhecimento prévio das proteínas (BREWIS e GADELLA, 2010).

## METODOLOGIA

Foram selecionados cinco reprodutores caprinos da raça Saanen, da fazenda experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral-CE). A coleta de sêmen foi feita através de vagina artificial, para obtenção do plasma seminal, as amostras foram centrifugadas duas vezes, sendo a primeira a 1.500 g por 30 minutos a 4 °C, para separação do plasma seminal dos espermatozóides, e a segunda a 10.000 g por 60 minutos a 4 °C, para remoção de restos de espermatozóides e retirada de restante dos fragmentos de células, havendo separação completa do plasma, o qual foi transferido para microtubos (*Eppendorf*) e mantido à - 80 °C até a realização das análises. Em seguida as amostras de plasma seminal passaram por um processo de purificação de proteínas se utilizando o *Clean up kit*, o procedimento seguiu através de precipitações quantitativas de proteínas, deixando para trás substâncias que pudessem interferir nas dimensões da corrida como a focalização isoeletrica (IEF).

O protocolo seguido para essa purificação esta de acordo com os parâmetros GE-Healthcare (GE). Em seguida as proteínas totais do plasma seminal foram avaliadas e mensuradas seguindo a metodologia de Bradford (1976). As proteínas do plasma seminal (250 µg) foram solubilizadas em tampão de reidratação (uréia 7M/tiouréia 2M, 1% CHAPS, 1% DTT; 0,5% (v/v), anfólitos (pH de 3-10) e azul de bromofenol em um volume final de 250 µL por amostra. A mistura de proteína foi então reidratada em tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13cm de comprimento e pH de 3-10 em temperatura ambiente por 16 horas.

A focalização isoeletrica foi realizada no equipamento *EttanIPGphor* III. Após a IEF, as tiras foram armazenadas em freezer -80 °C para análises posteriores. As *strips* de IPG foram equilibradas com a solução de equilíbrio I (Uréia 6M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DDT) por 15 min e em seguida, com a solução de equilíbrio II (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida) por mais 15 minutos. Após a etapa de equilíbrio, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) com base em seu peso molecular (MW) no equipamento Hoefer SE 600 (*GE-Healthcare*, USA) com duas programações (100 V, 30 mA, 100 W por 15 min e 230 V, 50 mA e 100 W por 6h) para os dois géis. Foi utilizado marcador de MW entre 14 e 97 kDa. Após esta separação, que teve duração de oito horas, aproximadamente, os géis foram fixados em mistura de etanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v/v), por 15 min em agitação, e corados após com o *Coomassie G-250 (Blue Silver)*, durante 24 h, e em seguida, armazenados em solução de ácido acético 5%.

A análise dos géis bidimensionais foram feitas através da digitalização das imagens captadas em ImageScanner II (GE Healthcare, USA). As imagens digitalizadas dos géis foram analisadas

utilizando o *software ImageMaster Platinum* versão 6.0 (*GE-Healthcare*, USA), que permite a detecção de spots, entre as triplicatas dos géis. As proteínas foram supostamente identificadas com base na comparação de pI e MW no banco de dados UniProt utilizando a ferramenta TagIdent disponível *online* no portal ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>). Esta ferramenta gera uma lista de peptídeos e proteínas a partir dos valores informados nos campos de massa molecular aparente e pI fazendo uma seleção dentro de uma busca específica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi obtido um gel 2DE com uma faixa de pH ampla (pH 3-10). O gel 2DE apresentou 291 *spots* bem definidos (Figura 1). Com base em bancos de dados de proteínas, foi possível identificar 10 *spots* a partir da informação de pI e massa molecular (Tabela 1). Dentre as proteínas identificadas, algumas estão relacionadas com os processos de espermatogênese e capacitação. Foi encontrado o elemento modulador de AMPc o qual atua na regulação da transcrição (PATI, 1999). Análises posteriores por espectrometria de massa são fundamentais para identificar as proteínas com maior precisão podendo também identificar novas proteínas, como também sua atuação.

## GRÁFICOS

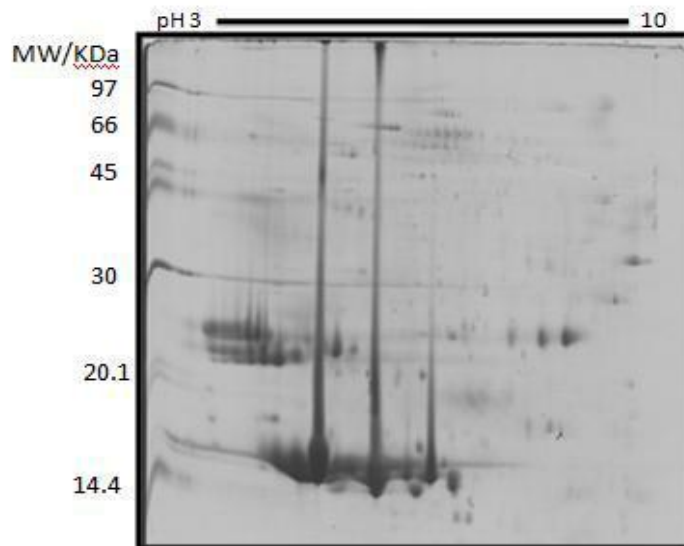


Figura 1- Perfil de proteínas do plasma seminal. A esquerda o marcador de baixo peso molecular (MW).

**Tabela 1:** Proteínas do plasma seminal identificadas com base no banco de dados de proteínas (ExpASY) utilizando os dados de Massa e Ponto isoelétrico após eletroforese bidimensionais utilizando *strips* de pH imobilizado de 3,0 a 10,0.

Spot	Proteína	N. Acesso	pI Teórico	pI Experimental	Massa Teórico	Massa Experimental
1	Modulador de Elemento de Resposta do AMP cíclico	Q03060	6,16	6,1	13260	13260
2	Modulador de Elemento de Respostas do AMP cíclico	Q03060	6,16	6,1	13260	13260
3	Modulador de Elemento de Respostas do AMP cíclico	Q03060	6,2	6,1	38940	38089
3	Proteína-19 Associada à espermatogênese, Mitocondrial.	Q9DAQ9	5,58	5,6	14025	15015
4	Proteína-19 Associada à espermatogênese, Mitocondrial.	Q920Q3	5,2	5,4	15242	15968
5	Proteína-19 Associada à espermatogênese, Mitocondrial.	Q9DAQ9	5,17	5,0	15224	15239
6	Proteína-19 Associada à espermatogênese	Q3SZQ3	5,86	5,9	15232	14614
8	Proteína Tioredoxina contendo o domínio 8	Q6A555	9,41	9,4	13139	14294
9	Nucleotídeo Difosfato Cinase homólogo 5	P56597	5,89	5,9	24236	26840
10	Agmatinase, Mitocondrial	A2AS89	5,89	6	34362	36121

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostra a grande diversidade de proteínas presente no plasma seminal de caprinos Saanen, revelando que muitas ainda não estão cadastradas nos bancos de dados protéicos. Ainda é necessário estudos para aprimorar a identificação destas proteínas que irá contribuir para o mapeamento de marcadores moleculares para fertilização e conhecimento da fisiologia da reprodução.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, NUBIS- (Núcleo de Biotecnologia de Sobral) e Embrapa Caprinos e Ovinos que através do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, abriram oportunidades de realização deste trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo para realização do mestrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREWIS, I.A. e GADELLA, B.M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. **Molecular Human Reproduction**, Oxford University Press, v.16, p.68-79, 2010.

HAFEZ, E.S.E. **Anatomia da reprodução masculina**. IN: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal, 7ª ed. Editora Manole Ltda, Barueri – SP, p. 3-12, 2004.

JOBIM, M.I.M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R.M.; SIEME, H.; MATTOS, R.C. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.76, p.765-771, 2011.

PATI, D.; MEISTRICH, M.L.; PLO, S. E. Human Cdc34 and Rad6B Ubiquitin-Conjugating Enzymes Target Repressors of Cyclic AMP-Induced Transcription for Proteolysis. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 5001-5013, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-70, 2005.