

Perfil eletroforético de proteínas do plasma seminal de caprinos em géis de diferentes concentrações de poliacrilamida

(Electrophoresis profile of seminal proteins in gels with different polyacrylamide concentrations)

Ronaldo Pereira Dias¹; Raquel Silveira F. Gomes²; Angela Maria Xavier Eloy³; João Ricardo Furtado⁴; Alice Andrioli Pinheiro³; Raymundo Rizaldo Pinheiro³

RESUMO

O objetivo do trabalho foi contribuir para o estudo do perfil protéico do plasma seminal de caprinos e a comparação deste perfil entre animais sadios e infectados com a Artrite Encefalite Caprina (CAE). Foram utilizados seis caprinos da raça Anglo-nubiana, três deles infectados e três sadios, com idade variando de 1,5 a 4 anos. Um ejaculado de cada animal foi colhido através da vagina artificial. Em seguida, o sêmen foi centrifugado para separação do plasma e posterior mensuração das proteínas totais pelo método de Bradford. Amostras do plasma seminal foram processadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nas concentrações, 7,5%, 12% e 15%, para análise das bandas de alto e baixo peso molecular. Os resultados mostram que os animais portadores da CAE apresentam concentrações de proteínas totais mais elevadas do que os animais sadios e revelaram, no gel de poliacrilamida a 15%, maior número médio de bandas de baixo peso molecular. Portanto, mesmo não havendo sido observada diferença quanto à presença de bandas protéicas entre os animais, a variação quanto à quantidade de proteínas de baixo peso molecular entre sadios e doentes sugere mais estudos sobre o assunto.

Palavras Chaves: caprino; CAE; plasma seminal; eletroforese

ABSTRACT

The aim of this work it was to contribute to the study of the protein profile of the plasma semen from Anglo-nubian goat and to compare this profile between healthy and infected animals with CAE (arthritis encephalitis caprine). It has been used six animals being three of them healthy and another three infected, with age varying between 1.5 and 4 years. One

¹ Bolsista CNPq/PIBIC/Bolsista Embrapa Caprinos; ronaldodias01@yahoo.com.br;

² Bolsista da Embrapa Caprinos;

³ Pesquisador da Embrapa Caprinos;

⁴ Assistente de Pesquisa Embrapa Caprinos

ejaculate from each animal was obtained through method artificial vagina. Afterwards, the semen was centrifuged aiming the plasma separation and the total protein analyze by Bradford method. Samples plasma were processed and submitted to electrophoresis in polyacrylamide gels in different concentrations: 7.5%, 12% and 15%, for analysis of the bands of high and low molecular weight. The results show that the animals infected by CAE presented proteins total concentrations higher than found in healthy animals and also showed in polyacrylamide gel to 15% an elevated medium numbers of proteins with low molecular weight. Therefore, although there has not been observed difference between the incidence of proteins bands, the variations observed concerning to the amount of proteins with low molecular weight between the animals healthy and infected suggest more studies about the subject.

Keywords: goat; CAE; electrophoresis; seminal plasma

INTRODUÇÃO

A Eletroforese é uma técnica que permite a qualificação dos componentes protéicos dos líquidos orgânicos, conforme o tamanho, a forma ou carga, através da migração das partículas carregadas eletricamente num determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. Na eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE), as proteínas migram através de poros, impulsionadas por um campo elétrico. A resistência do gel à passagem de moléculas aumenta para concentrações crescentes de acrilamida, ou seja, a facilidade com que as proteínas migram através do gel depende da concentração de poliácridamida e do peso molecular delas. A escolha da concentração do gel deve respeitar o peso molecular das proteínas que se deseja qualificar, para que as bandas protéicas possam ser melhor expressas.

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade infecciosa viral específica de caprinos, crônica e multissistêmica causada por um lentivírus. Caracteriza-se por quatro formas clinicamente distintas: nervosa, articular, respiratória e mamária. O vírus já foi verificado no plasma seminal de animais infectados (Andrioli, 2001).

Os prejuízos econômicos decorrentes de uma das quatro formas clínicas da CAE foram considerados significativos, principalmente pela diminuição do período de vida produtiva do animal. Dentro do contexto abordado, o presente trabalho objetivou contribuir para o estudo do perfil protéico do plasma seminal de caprinos e a sua comparação entre animais sadios e infectados com CAE.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – Embrapa Caprinos, localizado no município de Sobral, Estado do Ceará. No experimento foram utilizados seis machos da raça Anglo-nubiana, divididos em dois grupos, três positivos para Artrite Encefalite Caprina (CAE) e três negativos para a enfermidade. O diagnóstico da CAE foi realizado pelo teste de imunodifusão em gel de agarose, utilizando antígeno experimental produzido na própria Embrapa Caprinos. Durante o experimento, os animais positivos e os negativos foram mantidos num sistema de semiconfinamento, tendo acesso ao campo durante a maior parte do dia, mas sem contato entre positivos e negativos. Com relação à alimentação, os animais positivos eram suplementados com leucena (*Leucaena leucocephala*) e capim elefante picado no cocho e mais 300g de uma mistura concentrada à base de milho e soja, tendo uma dieta à base de leucena (*Leucaena leucocephala*). A alimentação dos animais negativos era com capim elefante picado no cocho e suplementados também, com 100 gramas de uma mistura concentrada à base de milho e soja. As colheitas de sêmen, uma por animal, foram realizadas em vagina artificial, na presença de uma fêmea estrogenada, como manequim, com sinais evidentes de estro. Logo em seguida as amostras de sêmen foram centrifugadas a 3.000 rpm por um tempo de 40 minutos, a 4 °C separando-se o plasma seminal para determinação da concentração protéica total e do perfil protéico através de eletroforese desnaturante, em gel SDS–PAGE. A proteína total foi mensurada de acordo com Bradford (1976), em espectrofotômetro. Em seguida, cada amostra foi analisada em gel de poliácridamida a 7,5%, 12% e 15%, a 170 volts e 0.05 A, durante 90 minutos. A revelação dos géis se deu através de coloração feita com corante azul de coomassie R250, em agitação constante. Em seguida, o gel foi submetido a solução descorante alcóolica/acética trocando a solução a cada 10 minutos por três vezes. Posteriormente, os géis foram submetidos a fixação em solução à base de glicerol e etanol para manter sua integridade, e permaneceram em temperatura ambiente entre duas folhas de papel celofane envoltas em uma placa de vidro sem a presença de bolhas de ar até a secagem total. Transcorrido o tempo de secagem, foram visualizadas as bandas protéicas de cada animal e contadas baseando-se no padrão, como referência.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Na análise das proteínas totais do plasma seminal, o grupo infectado apresentou valor médio de $38,96 \pm 16,9$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, enquanto que o grupo dos animais sadios a média foi de $15,32 \pm 6,11$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mostrando um aumento das proteínas em animais infectados pela CAE.

Analisando o gel de poliacrilamida a 12%, verificou-se que, em média, o número de bandas protéicas apresentou-se maior entre a faixa de peso molecular 43 kDa e 30 kDa, enquanto que os géis de 7,5% e de 15% apresentaram maior incidência de bandas com peso superior a 94 kDa, observando-se, também, maior quantidade total de bandas identificadas. No gel de 7,5%, foi observado que o número total de bandas visualizadas foi inferior aos outros géis. Neste este gel, verificaram-se bandas protéicas mais densas no grupo de animais sadios, com peso molecular próximo a 67 kDa. Já no gel de 15%, observou-se que as bandas de peso superior a 30 kDa foram bem divididas de forma semelhante ao gel de 12%, embora a visualização individual das bandas tenha sido prejudicada pela proximidade entre elas, podendo-se avaliar essa diferença observando-se a distância entre as bandas padrões em cada gel. As bandas protéicas situadas entre a faixas de peso molecular 30 kDa e 20 kDa, tiveram sua visualização em média inferior ao gel de 12%, pela possível união de bandas protéicas de diferentes pesos moleculares devido à alta resistência do gel à passagem das proteínas. Analisando a média da frequência de bandas, podemos observar que no gel de 15% tem-se uma maior frequência de bandas, a partir do padrão de 30 kDa das amostras do grupo de animais infectados.

CONCLUSÕES

Dentro do proposto no experimento conclui-se que:

1. Na análise dos padrões eletroforéticos das proteínas no gel de poliacrilamida a 12%, não houve diferença ($P < 0,05$) entre animais sadios e infectados.
2. O gel de poliacrilamida a 12%, mostrou-se mais eficaz na identificação de uma maior quantidade de proteínas do plasma seminal caprino e uma melhor qualidade na separação das bandas protéicas, possibilitando uma melhor visualização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

PINHEIRO, A.A. Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostra de sêmen, fluido uterino e embriões. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. Tese Doutorado. 68p.

SILVA JUNIOR, J.G. Eletroforese de proteínas: Guia teórico-prático. Rio de Janeiro. 2001 Editora Interciência. Rio de Janeiro, 126p.