

ASSOCIAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E MOTILIDADE ESPERMÁTICA EM COELHOS SUBMETIDOS À DOPING GENÉTICO

URTIAGA, Gabriel*, CAMPOS, Vinicius Farias, COLLARES, Thaís Farias, SELAU, Lisiane, SEIXAS, Fabiana Kömmling, DESCHAMPS, João Carlos

COLLARES, Tiago

Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas, *gabrielurtiaga@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O plasma seminal é uma mistura de fluidos secretados pelo testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias; contém diferentes componentes, tais como açúcares, lipídeos, proteínas e íons. O plasma seminal está envolvido na manutenção das funções espermáticas e na fertilização (Kareskoski & Katila, 2008; Wojtczak *et al.*, 2005).

O papel do plasma seminal e suas proteínas na maturidade espermática tem sido amplamente estudado, apresentando resultados contrastantes nas diferentes espécies animais. Em humanos, touros e carneiros o plasma seminal auxilia a motilidade espermática através do incremento da viabilidade e integridade de membrana das células (Baas *et al.*, 1983; Pickett *et al.*, 1975). Por outro lado, em coelhos, estudos demonstraram que o plasma seminal não é o meio ideal para a manutenção espermática, obtendo-se um incremento nos parâmetros de motilidade espermática a partir da adição de outros componentes ou aumento da diluição do sêmen (Castellini *et al.*, 2000).

O Doping Genético é caracterizado pela utilização não-terapêutica de genes, elementos genéticos e/ou células que potencializem a performance atlética (Wells, 2009); seu uso é proibido em competições esportivas, porém ainda não foi desenvolvido um mecanismo eficiente de detecção dessa prática. Dentre os genes candidatos à prática de doping genético estão o do hormônio do crescimento, os reguladores da miostatina e o da eritropoetina (EPO) (Haisma & De, 2006).

A EPO é um hormônio glicoproteico com importante função na regulação da eritropoese em resposta às alterações nos níveis de oxigênio circulante e, embora seu uso seja ilegal, sua forma recombinante é muito utilizada por atletas em competições esportivas devido ao seu efeito de incremento na capacidade aeróbica (Jelkmann, 2003).

Os reflexos reprodutivos do uso da EPO *in vivo* ainda não foram descritos. Estudos *in vitro*, a partir do cultivo de células, demonstraram que seu uso estimula a esteroidogênese, provocando o aumento da produção de testosterona em células de Leydig, sugerindo que a administração de EPO *in vivo* afeta a espermatogênese (Mioni *et al.*, 1992; Yamazaki *et al.*, 2004).

Este trabalho buscou avaliar a correlação entre o perfil das proteínas do plasma seminal e a motilidade espermática em coelhos submetidos a doping genético.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento, foram utilizados 12 coelhos adultos da raça Nova Zelândia Albino pesando entre 4,5 e 5Kg. Os coelhos foram divididos em 3 grupos: grupo I recebeu 3 injeções sub-cutâneas semanais contendo 25UI/kg de EPO Recombinante comercial, o grupo II recebeu 2 injeções intra-musculares de vetor contendo o gene (cDNA) da EPO de coelhos e promotor CMV (pTARGET/EPO) no dia 0 do estudo e o grupo III (controle) recebeu apenas o vetor (pTARGET) sem o gene da EPO também no dia 0 do estudo. Os grupos II e III receberam um total de 400µg de DNA plasmidial injetados na musculatura da perna. A eritropoetina recombinante comercial utilizada foi Eprex (Issy-les-Moulineaux, France).

Um ejaculado por macho foi coletado semanalmente ao longo de 5 semanas. A motilidade espermática foi avaliada por microscopia de contraste de fase e o perfil proteico dos ejaculados foi analisado *in silico* através de imagens de eletroforeses. As eletroforeses (SDS-PAGE) unidimensionais do tipo descontínuas foram realizadas com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell®. Foram usados géis de poliacrilamida concentrados a 15%. As amostras foram concentradas a 50V por 20min, e a corrida a 100V por aproximadamente 2h. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™. Os géis foram corados a temperatura ambiente com Coomassie Brilliant Blue em *over-night* e, posteriormente, analisados com o software TotalLab TL 100 v. 2006.

Após a coleta dos dados, foram computadas as medidas descritivas de motilidade espermática por banda e por tratamento e, posteriormente, aplicado teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação das médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de análises *in silico*, foram eleitas dez bandas proteicas mais claramente identificadas no dia 0 do experimento. Os fatores encontrados apresentaram pesos moleculares entre 18kDa e 190kDa. Apenas duas bandas, 95kDa e 33kDa, estavam presentes em todas as amostras coletadas.

A partir dos resultados do teste de Mann-Whitney, concluiu-se que em coelhos submetidos ao doping genético, grupo I, a presença do fator proteico de 48kDa está correlacionada à motilidade espermática inferior a 70%. Contrariamente, a presença da banda proteica de 18kDa correlacionou-se positivamente à motilidade, demonstrando que sua presença relaciona-se à alta motilidade.

Em coelhos submetidos ao tratamento com EPO recombinante, grupo II, apenas o fator proteico de 63kDa demonstrou relação direta com a motilidade espermática. A presença dessa banda proteica está relacionada à motilidade superior a 70%. Coelhos do grupo controle não demonstraram em seus ejaculados relação entre motilidade espermática e a presença dos fatores proteicos analisados.

Segundo Mioni *et al.* (1992), a administração de eritropoetina recombinante estimula o processo de esteroidogênese em células de leydig cultivadas *in vitro*. Posteriormente, foi ratificado tal resultado a partir da identificação de receptores proteicos de membrana para EPO em células de leydig. Nesse mesmo estudo

verificou-se o aumento da produção de testosterona em células de leydig cultivadas sob a administração de rHuEPO (Yamazaki *et al.*, 2004).

Souza *et al.* (2010), relacionou o aumento dos níveis de secreção andrógênica com alterações na expressão de algumas proteínas do plasma seminal de carneiros. Outros estudos já demonstraram a influência de fatores proteicos em parâmetros reprodutivos animais. Segundo Campos *et al.* (2010), existe associação entre a presença do fator proteico de 38kDa no plasma seminal de peixes (*Rhamdia quelen*) e baixa motilidade espermática. Bianchi *et al.* (2008) demonstrou que a presença do fator proteico 26 kDa está associada à baixa integridade de membrana plasmática pós-descongelamento de espermatozoides suínos.

O aumento dos níveis de EPO, portanto, ao estimular o aumento dos níveis de testosterona, pode acarretar mudança no perfil proteico do plasma seminal; acarretando alteração na motilidade espermática. Gacci *et al.* (2010) sugere que alterações nos níveis de testosterona provocam mudanças na motilidade espermática. Ergun *et al.* (2007), demonstrou que o incremento na produção de testosterona está relacionado à diminuição na motilidade espermática em humanos.

4 CONCLUSÕES

Estes resultados sugerem que a administração de rHuEPO e vetores contendo o gene da EPO provocam alterações nos perfis proteicos do plasma seminal e, conseqüentemente, alterações na motilidade espermática.

5 REFERÊNCIAS

BAAS, J. W., MOLAN, P. C., SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa, **J. Reprod. Fertil.**, v.68, p. 275-280, 1983.

BIANCHI, I., COLLARES, T., CAMPOS, V.F., CAVALCANTI, P.V., KAEFER, C., CORRÊA, E.K., DELLAGOSTIN, O.A., LUCIA JR, T., DESCHAMPS, J.C., CORRÊA, M.N. Seminal plasma factor associated to post-thawing swine sperm membrane integrity, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, p. 384-388, 2008.

CAMPOS, V.F., SEIXAS, F.K., KAEFER, C., CAVALCANTI, P.V., AMARAL, M.G., LUCIA JR, T. DESCHAMPS, J.C., COLLARES, T. Association between the presence of a 38kDa factor in the seminal plasma and inhibition of sperm motility in jundiá fish *Rhamdia quelen*, **Ci. Anim. Bras.**, v. 11, p. 402-409, 2010.

CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P., MORONI, M., MINELLI, A. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa, **Anim. Reprod. Sci.**, v.63, p. 275-282, 2000.

ERGUN, A., KOSE, S. K., AYDOS, K., ATA, A., AVCI, A. Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones, **Arch. Androl**, v.53, p. 21-23, 2007.

GACCI, M., CORONA, G., APOLONE, A., LANCIOTTI, M., TOSI, N., GIANCANE, S., MASIERI, L., SERNI, S., MAGGI, M., CARINI, M. Influence of serum testosterone on urinary continence and sexual activity in patients undergoing radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer, **Prostate Cancer Prostatic. Dis.**, 2010.

HAISMA, H. J. & DE, H. O. Gene doping, **Int. J. Sports Med.**, v.27, p. 257-266, 2006.

JELKMANN, W. Erythropoietin, **J. Endocrinol. Invest**, v.26, p. 832-837, 2003.

KARESKOSKI, M. & KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity, **Anim. Reprod. Sci.**, v.107, p. 249-256, 2008.

MIONI, R., GOTTARDELLO, F., BORDON, P., MONTINI, G., FORESTA, C. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells, **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v.127, p. 459-465, 1992.

PICKETT, B. W., SULLIVAN, J. J., BYERS, W. W., PACE, M. M., REMMENG, E. E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa, **Fertil. Steril.**, v.26, p. 167-174, 1975.

SOUZA, C. E., ARAUJO, A. A., OLIVEIRA, J. T., LIMA SOUZA, A. C., NEIVA, J. N., MOURA, A. A. Reproductive development of Santa Ines rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins, **Reprod. Domest. Anim**, v.45, p. 644-653, 2010.

WELLS, D. J. Gene doping: possibilities and practicalities, **Med. Sport Sci.**, v.54, p. 166-175, 2009.

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G. J., CIERESZKO, A. Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma, **Fish. Shellfish. Immunol.**, v.19, p. 387-391, 2005.

YAMAZAKI, T., KANZAKI, M., KAMIDONO, S., FUJISAWA, M. Effect of erythropoietin on Leydig cell is associated with the activation of Stat5 pathway, **Mol. Cell Endocrinol.**, v.213, p. 193-198, 2004.