

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



ESTUDO DA DNase DO PLASMA SEMINAL DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

BERNEIRA, Elias Figueroa Rodrigues*; AGUIAR, Ingrid Manoela Amaral Cardoso de; AMARAL, Marta Gonçalves; COLLARES, Thaís Farias; CAMPOS, Vinicius Farias; LEON, Priscila Marques Moura de; COLLARES, Tiago; DESCHAMPS, João Carlos.

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Campus Universitário, CEP 96010-900. * elias.berneira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Jundiá é o nome comum dado aos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia* espécie *Rhamdia quelen*, é nativo da América do Sul, e facilmente encontrado na região sul do Brasil. Seu cultivo vem crescendo devido a sua boa adaptação ao ambiente e aparente potencial de crescimento no inverno, sendo caracterizado como rústicos, por sua resistência a baixas temperaturas (Baldisseroto *et al.*, 2004).

A maioria dos relatos sobre sêmen de peixes, encontrados na literatura, são estudos qualitativos e quantitativos dos espermatozoides (Ferreira *et al.*, 2001). Alguns pesquisadores (Horam *et al.*, 1991; Lavitrano *et al.*, 1997; Lanes *et al.*, 2009) sugeriram que determinados componentes do plasma seminal, como a DNase, poderiam exercer um efeito inibitório do espermatozoide; esta enzima é encontrada no plasma seminal de mamíferos, aves e peixes. Foi demonstrado que o DNA exógeno poderia se associar ao espermatozoide de suínos (Lavitrano *et al.*, 1997). Quando ocorre a interação do DNA exógeno com o endógeno permite a ativação de nucleases que, eventualmente, levam a um processo de morte celular semelhante à apoptose (Sfpadafora *et al.*, 1998). Em 2009, até então, apenas um estudo relatou a presença e o comportamento da DNase no sêmen de linguado *Paralichthys orbiganus*, diante da adição de DNA exógeno (Lanes *et al.* 2009).

Neste trabalho, pesquisamos alguns fatores, tais como temperatura, tempo de ação e desnaturação da enzima, concentração do plasma seminal e presença de EDTA, que poderão alterar o comportamento da DNase sobre o DNA exógeno e quais seriam as condições adequadas para impedir a ação da DNase, a fim de estabelecer um protocolo para a técnica de SMGT utilizada na geração de peixes transgênicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O sêmen do Jundiá *Rhamdia quelen* foi coletado de 12 machos com peso médio de 600g mantidos na Estação de Aquacultura da UFPel. Após a coleta, o ejaculado foi mantido a 4°C até o início da experimentação, que ocorreu no Centro de Biotecnologia/UFPel.

O sêmen foi centrifugado, com o objetivo de separar o plasma seminal dos espermatozoides. O plasma seminal de cada amostra foi medido e armazenado a -20°C. Depois, o *pellet* foi lavado com solução isotônica, centrifugado novamente e esse sobrenadante foi armazenado a -20°C. Este processo de lavagem foi repetido mais quatro vezes.

Foi realizada a detecção da presença de proteínas, através do gel de bis-acrylamida a 15% pelo método SDS PAGE. As proteínas foram quantificadas com Kit específico BCA Protein Assay Reagent™, conforme instruções do fabricante.

Para observação da temperatura de incubação ideal e o tempo de duração da atividade da DNase no plasma seminal, foi incubado EGFP (Enhanced Green Fluorescent Proteins) 250 ng/μL no plasma seminal, como DNA exógeno, com temperatura constante de 23°C por 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, para análise do tempo de ação da enzima. Na análise da temperatura foi utilizada a mesma concentração de DNA e de plasma seminal nas seguintes temperaturas: 33°C, 43°C, 53°C e 63°C.

Outra análise foi a temperatura ideal de desnaturação da DNase. Para isto foi incubado um pool de plasma seminal por 30 minutos a 40°C, 50°C, 60°C e 70°C e essas amostras foram mantidas a 23°C após a estabilidade da temperatura, e foi retirado uma alíquota do plasma e adicionado EGFP. Estas amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

Para determinar a concentração de DNase no plasma seminal, este foi diluído 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20. Dessas diluições foi retirada uma alíquota de plasma e acrescentado o EGFP. Para o plasma concentrado, foram utilizadas as diluições 1:1, 5:1 e 10:1 (plasma:EGFP). As amostras foram incubadas a 33°C por 15 minutos.

A concentração de EDTA que inibe a atividade da DNase, foi avaliada utilizando EDTA nas concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 5; 25; 50; 75; 100; 250 e 500 mM. Uma alíquota de cada concentração de EDTA foi adicionada ao plasma seminal com EGFP. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (23°C) durante 50 minutos.

Todas as análises: tempo, temperaturas, concentração de DNase e concentração de EDTA foram avaliadas em gel de Agarose 1% com GelRed® (Biotium™) e em seguida visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta. Para as quantificações de DNA exógeno (EGFP) foi utilizado o fluorômetro Qubit® (Invitrogen®, USA) conforme as instruções do fabricante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das proteínas em gel SDS detectou a presença de proteínas e, à medida que o plasma seminal foi substituído por solução isotônica, essas proteínas foram retiradas gradativamente. No plasma seminal concentrado, a quantidade protéica variou de 1,7 a 4,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e nos respectivos lavados, a concentração foi diminuindo, até chegar à zero, na quinta lavagem.

A presença de DNase no plasma seminal foi confirmada com a degradação do DNA exógeno pela DNase. No plasma seminal concentrado houve maior degradação do DNA que nos lavados. A concentração de DNA foi decaindo, principalmente, a partir do segundo lavado.

Em relação ao tempo de ação da DNase no plasma seminal concentrado, foi observado que a enzima agiu rapidamente no tempo 0, e entre 5 e 30 minutos sua atividade foi diminuída, enquanto que, após os 30 minutos, sua ação foi quase nula.

Na análise da temperatura, percebeu-se que 43°C é a temperatura ideal de ação da DNase, pois, sua atividade diminuiu a medida que a temperatura aumentou ou diminuiu. Foi detectado que, entre 40 e 60°C praticamente não houve desnaturação dessa enzima, porque ela degradou quase todo o DNA exógeno (EGFP), mas a 70°C ocorreu a desnaturação, porque, a concentração de DNA foi mais alta.

Analisando a degradação do DNA no plasma seminal diluído em diferentes concentrações, observamos que quanto mais diluído o plasma, menor é a ação da DNase e maior a concentração de DNA exógeno.

Na análise da ação de diferentes concentrações de EDTA sobre a atividade da DNase, viu-se que o EDTA em altas concentrações (30 a 210 mM) inibe totalmente a atividade da DNase, e que se essa concentração for menor, a DNase poderá apresentar alguma atividade.

4. CONCLUSÕES

A presença de proteínas no plasma seminal de jundiá foi evidenciada. Verificou-se que a atividade da DNase ocorre de forma acentuada em condições específicas, que são nos primeiros 5 minutos de sua ação em temperatura de 43°C no plasma seminal concentrado ausente de EDTA.

Para estabelecer, então, um protocolo de SMGT será necessário lavar em solução isotônica o plasma seminal para inibir a ação da DNase sobre o DNA exógeno. Havendo necessidade de maiores estudos para avaliação do comportamento dos espermatozóides na presença de DNA exógeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSEROTO, B.; **Biologia do Jundiá**. In: BALDISSEROTO, B; RADÜNZ NETO, J.; EDS. Criação de Jundiá. Santa Maria: Editora UFSM, 2004, p. 67 – 72.
FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. O.; LUZ, R. K.; TATAJE, D. A. R.; ESQUIVEL, J. R.; RESTREPO, J. B. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen do Jundiá

Rhamdia quelen. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, 2001, v. 27, p. 57 – 60.

HORAN, R.; POWELL, R.; MCQUAID, S.; GANNON, F.; HOUGHTON, J. A. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. **Archives of Andrology**, 1991, v. 26, p. 83 – 92.

LANES, C. F. C.; SAMPAIO, L. A.; MARINS, L. F. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Theriogenology**, 2009, v. 71, p. 525 – 533.

LAVITRANO, M.; BUSNELLI, M.; CERRITO, M. G.; GIOVANNONI, R. MANZINI, S.; VARGIOLU, A. Sperm-mediated gene transfer. **Reproduction Fertility**, 2006, v. 18, p. 19 – 23.

SPADAFORA, C. The interaction of sperm cell with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. **Experimental Cell Research**, 1997, v. 233, p. 56 – 62.