

Comunicação

[Communication]

Proteinograma sérico de veados-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) criados em cativeiro obtido por eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida (SDS PAGE)

[Serum protein concentrations of captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) determined by means of agarosis and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel electrophoresis]

A.M. Santana¹, J.J. Fagliari^{2*}, C.M.S. Camargo¹, A.E. Santana²,
J.M.B. Duarte², P.R.L. Silva³

¹Aluno de pós-graduação - FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n

14884-900 – Jaboticabal, SP

³Aluno de graduação - FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

O veado-catingueiro é um cervídeo com peso em torno de 18kg, altura média de 0,50m, geralmente apresenta pelagem de coloração variável, de cinza-escuro a marrom-avermelhado (Duarte, 1996). Habita regiões de cerrado, do sul do Amazonas até o norte da Argentina (Ávila-Pires, 1959; Jungius, 1976; Jackson et al., 1980). É capaz de ocupar áreas degradadas, contanto que tenham pequenos capões de mata ou cerrado para se abrigarem durante o dia (Duarte, 1996). A população é relativamente grande, tanto em vida livre como em cativeiro, mas a literatura é escassa em trabalhos que relatam os valores de constituintes do soro sanguíneo de animais normais, especialmente do proteinograma.

A avaliação dos teores de proteína total e de suas frações propicia subsídios para adequada interpretação do estado de hidratação, bem como de inflamação, infecção, doenças imunomediadas e alteração na síntese protéica.

O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis meios de identificação de proteínas sanguíneas (Kaneko et al., 1997). As técnicas de eletroforese mais utilizadas em medicina veterinária têm como matrizes fitas de acetato de celulose (Fagliari et al., 1991) ou filmes de agarose (Keay e Doxey, 1982), as quais representam valor limitado porque permitem o fracionamento de cinco a sete

grupos de proteínas. Contudo, é a técnica mais facilmente disponível na rotina laboratorial. Gordon (1995) relatou que a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações séricas extremamente baixas e a identificação de 15 a 20 proteínas. O emprego dessa técnica em medicina veterinária pode ser útil na avaliação da imunidade passiva e da cinética das proteínas de fase aguda na resposta inflamatória, facilitando a definição do diagnóstico de diversas doenças animais (Fagliari et al., 2003; Fagliari et al., 2006).

O objetivo deste estudo foi estabelecer o proteinograma sérico de veados-catingueiro, com o uso das técnicas de eletroforese em gel de agarose e em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de modo a propiciar informações que contribuam na interpretação de resultados de exames de laboratório e, conseqüentemente, facilitem o diagnóstico de enfermidades nessa espécie animal.

Foram examinados 10 veados-catingueiro (quatro machos e seis fêmeas) adultos, mantidos em baias individuais e protegidos de barulho, localizados no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos da UNESP, campus de Jaboticabal. O experimento foi

Recebido em 5 de dezembro de 2007

Aceito em 30 de outubro de 2008

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: fagliari@fcav.unesp.br

Proteinograma sérico de veados...

realizado de julho de 2003 a junho de 2004. Segundo dados da estação agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas - UNESP, campus de Jaboticabal, a temperatura atmosférica média durante inverno, primavera, verão e outono em que foi realizado o experimento foi, respectivamente, de 20,6; 24,3; 23,7 e 19,9°C. Nesse mesmo período, os valores de insolação média foram, respectivamente, de 260,2; 224,8; 218,1 e 207,1h, sendo que, no verão e no outono, houve menor luminosidade (média de 10,7h) e, no inverno e na primavera mais luminosidade (média de 13,3h). Os animais receberam dieta à base de ração comercial para equínos¹ e de forrageira verde (soja perene, alfafa, amora), à vontade.

Para realização do proteinograma, foram colhidas amostras de sangue, mensalmente, ao longo de doze meses, por venopunção jugular, em tubos adequados ao sistema de coleta a vácuo, sem anticoagulante, adequadamente armazenados em isopor com gelo. Após a retração do coágulo, as amostras de soro foram submetidas à centrifugação a 2.000 rotações por minuto, durante cinco minutos, e estocadas à temperatura de 18°C negativos, até o momento das análises laboratoriais. Para realização da coleta, os animais foram contidos fisicamente por não mais que dois minutos.

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto, utilizando-se conjunto de reagentes comercial² e leitura em espectrofotômetro (Labquest)². O proteinograma sérico foi obtido tanto em matriz de gel de agarose (Celmigel)³ quanto em SDS-PAGE. O fracionamento eletroforético das proteínas das amostras do soro sanguíneo em gel de agarose³ foi realizado utilizando-se técnica empregada por Fagliari et al. (1991). A leitura das frações protéicas foi realizada em densitômetro⁴, em comprimento de onda de 520nm. Para o fracionamento eletroforético das proteínas em SDS-PAGE, utilizou-se a técnica proposta por Weber e Osborn (1969). Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados mediante densitometria. Para a identificação das proteínas, foram utilizados marcadores com pesos

moleculares de 29kD, 45kD, 66kD, 94kD e 205kD. As proteínas purificadas foram haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, antitripsina e imunoglobulina G. Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas, foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão. Para as análises estatísticas, utilizou-se o pacote estatístico SAS (User's..., 1995). Quando houve diferenças significativas entre os proteinogramas, aplicou-se o teste Tukey (P<0,05) para a comparação das médias.

Os teores séricos de proteína total foram similares quando comparados entre as estações do ano e entre sexos, variaram de 7,9±0,9g/dl (outono) a 8,42±0,69g/dl (primavera) e de 8,18±0,81g/dl (fêmeas) a 8,22±0,8g/dl (machos), respectivamente.

O proteinograma em gel de agarose revelou a presença de quatro frações protéicas: albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina. As concentrações séricas de alfa, beta e gama globulina não foram influenciadas pela estação do ano. Já as concentrações séricas de albumina diferiram significativamente entre a primavera e o verão (Tab. 1), com valores mais elevados na primeira em relação à segunda estação. Essa diferença não foi observada quando se utilizou SDS-PAGE. Nesse caso, tais diferenças podem ter ocorrido devido a variações nas técnicas utilizadas. Apenas as concentrações séricas de albumina e alfa globulina foram influenciadas pelo sexo. As fêmeas apresentaram maiores teores de albumina, e os machos maiores concentrações de alfa globulina (Tab. 2).

O SDS-PAGE possibilitou a detecção de 34 proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 18kD a 165kD. A partir da metodologia utilizada, foi possível a identificação nominal de 10 dessas proteínas: imunoglobulina A (PM= 142kD), ceruloplasmina (PM= 115kD), hemopexina (PM= 83kD), transferrina (PM= 75kD), albumina (PM= 66kD), imunoglobulina G de cadeia pesada (PM= 60kD), haptoglobina (PM= 45kD), glicoproteína ácida (PM= 42kD), imunoglobulina G de cadeia leve (PM= 32kD) e hemoglobina (PM= 18kD). As demais proteínas foram identificadas apenas com base nos respectivos pesos moleculares. Em relação às estações do ano, verificou-se que os valores de 11 proteínas foram significativamente diferentes entre pelo menos duas estações (Tab. 3).

¹Passeio/Purina® - São Paulo, Brasil.

²Labteste Diagnóstica S.A. - Lagoa Santa, Brasil.

³Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos - Barueri, Brasil.

⁴Shimadzu CS-9301 - Shimadzu Corporation - Tóquio, Japão.

Tabela 1. Média e desvio-padrão das concentrações séricas de albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina, de 10 veados-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) criados em cativeiro, identificadas no proteinograma obtido em gel de agarose, nas diferentes estações do ano

Proteína (g/dl)	Inverno	P primavera	Verão	Outono
Proteína total	8,22±0,68a	8,42±0,69a	8,21±0,85a	7,90±0,90a
Albumina	3,96±0,49ab	4,15±0,35a	3,64±0,62b	3,93±0,32ab
Alfa globulina	0,42±0,16a	0,42±0,10a	0,54±0,23a	0,46±0,17a
Beta globulina	1,82±0,18a	1,73±0,21a	1,88±0,25a	1,87±0,66a
Gama globulina	1,91±0,35a	1,95±0,27a	2,12±0,98a	1,99±0,76a

Médias de uma mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Média e desvio-padrão (DP) das concentrações séricas de albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina, de 10 veados-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), machos e fêmeas, criados em cativeiro, identificadas no proteinograma obtido em gel de agarose

Proteína	Fêmea (n= 6)	Macho (n= 4)
Proteína total	8,18±0,81a	8,22±0,80a
Albumina	4,05±0,50a	3,75±0,43b
Alfa globulina	0,39±0,20a	0,53±0,11b
Beta globulina	1,88±0,50a	1,77±0,23a
Gama globulina	1,90±0,62a	2,11±0,75a

Médias de uma mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

Tabela 3. Proteína total sérica (g/dl), pesos moleculares (PM; Kilodáton, kD) e média e desvio-padrão dos teores séricos (mg/dl) de proteínas de veados-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) criados em cativeiro, obtidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), nas diferentes estações do ano

Proteína	PM	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Proteína total		8,22±0,68a	8,42±0,69a	8,21±0,85a	7,90±0,90a
NI		0,6±0a	1,29±2,4a	1±0a	-
NI	165	9,75±9,9a	8,57±7,09a	9,74±5,38a	7,92±8,11a
NI		-	1±0	-	-
NI	158	44,7±33,6a	24,02±31,6b	18,22±10,41b	18,48±10,46b
NI		4±0a	5,89±0a	4,49±5,17a	8±9,11a
NI		-	5,8±1,41a	6,18±9,09a	5,18±4,71a
NI	150	70,91±16,68a	59,66±36,25ab	40,59±13,85b	33,96±37,08b
NI		-	11,83±7,55a	9,25±7,95ab	5,63±4,43b
IgA	142	78,56±35,25a	69,89±30,2a	47,27±44,4a	53,33±42,89a
NI	122	55,4±18,05a	33,15±16,44b	22,56±25,71b	17,33±14,24b
Ceruloplasmina	115	10±0b	9,06±8,73b	48,16±25,94ab	68,52±30,94a
NI	110	20,4±121,97a	90,57±8,58a	48,16±13,44a	68,52±5,53a
NI		-	4,5±0a	7,47±16,63a	3,12±1,27a
NI	101	54,44±16,02a	42,20±20,53a	42,69±138,12a	38,78±11,97a
Hemopexina	83	291±133a	221±138a	244±109a	261±142a
Transferrina	75	19,5±345,42a	17,93±14,71b	26,45±12,98b	18,02±7,74b
Albumina	66	6433±2540ab	5841±669a	5209±482ab	5001±297b
NI		4,33±0	-	-	-
NI		107,5±46,03a	68,08±25,45a	53,0±0a	80,0±0a
IgG cadeia pesada	60	558±214b	1211±598a	1635±833a	1493±602a
NI		39,50±4,47a	4,08±0b	3,25±1,15b	-
NI	53	9±31,62a	27,79±29,71a	9,02±10,57a	20,58±5,77a
Haptoglobulina	45	51,33±0a	42,18±258,2ab	27,65±1046b	49,81±0a
Glicoproteína ácida	42	30,5±5,66a	59±29,28a	22,32±29,83a	32,25±28,12a
NI	40	78,2±0a	60,27±1,07a	28,63±0b	19,31±0,56b
NI	38	29,6±27,37a	46,42±7,21a	36,42±7,08a	51,68±5,02a
NI	35	9±0a	12,67±0a	-	24±0a
NI	34	19,29±0a	18,25±12,43a	15,17±8,21a	21,64±11,65a
IgG cadeia leve	32	357±54a	446±7a	489±4a	470±8a
NI		-	21,0±2,59	-	-
NI	30	242±48a	220±25a	187±32a	188±23a
NI		14,33±48,01a	6,5±3,05a	9±3,73a	41±1,87a
Hemoglobina	18	39,22±437,87a	71,19±48,87a	66,11±31,35a	125±99a
NI		-	17,0±32,73	-	-

Médias de uma mesma linha seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

NI= não identificada nominalmente.

Proteinograma sérico de veados...

Concluindo, em razão de os 10 animais serem mantidos no mesmo espaço físico e submetidos ao mesmo sistema de manejo, inclusive nutricional, considera-se que tais diferenças sejam decorrentes de variações próprias da espécie, ao longo do ano. Assim, é possível que os resultados apresentados sejam úteis na avaliação das concentrações das proteínas do

soro sanguíneo de veados-catingueiro e, conseqüentemente, no diagnóstico e prognóstico de doenças inflamatórias, nutricionais e imunomediadas.

Palavras-chave: veado-catingueiro, proteinograma, eletroforese, SDS-PAGE

ABSTRACT

The serum protein concentrations of brown brocket deer (Mazama gouazoubira) obtained by agarosis gel and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel were determined from blood samples of ten adult healthy animals (six females and four males), monthly collected in the morning, during 12 months. The animals, maintained in individual stable and protected from noise, received ad libitum a diet of commercial ration and green roughage. Serum protein concentrations in agarosis gel revealed the presence of four protein fractions: albumin, alphaglobulin, betaglobulin, and gammaglobulin. Only serum concentrations of albumin were influenced by season, being values in spring higher than values in summer (4.15 x 3.64g/dl). Serum concentrations of albumin (4.05 x 3.75g/dl) were higher for female and alphaglobulin (0.39 x 0.53g/dl) were higher for males. Results showed 34 proteins with molecular weights ranging from 18kD to 165kD. Significant differences between at least two seasons were found on values of 11 proteins. In conclusion, on account of the 10 animals been maintained in the same physical space and submitted to the same handling system, physiological variations, which are characteristic of this species, can be appointed as the reason of these differences.

Keywords: brown brocket deer, serum protein concentrations, electrophoresis, SDS-PAGE

AGRADECIMENTO

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁVILA-PIRES, F.D. As formas sulamericanas do veado-virá. *An. Acad. Bras. Cien.*, v.31, p.547-556, 1959.

DUARTE, J.M.B. *Guia de identificação dos cervídeos brasileiros*. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 8p.

FAGLIARI, J.J.; OKUBA, H.T.; PASSIPIERI, M. et al. Proteinograma sérico de bovinos da raça Guzerá de diferentes idades. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.34, p.39-60, 1991.

FAGLIARI, J.J.; WEISS, D.J.; McCLENAHAN, D. et al. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.383-387, 2003.

FAGLIARI, J.J.; RIZOLLI, F.W.; SILVA, S.L. et al. Proteinograma sérico de bezerras recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.450-453, 2006.

GORDON, J.N. *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*. New York: Elsevier, 1955. 213p.

JACKSON, J.; LANDA, P.; LANGGUTH, A. Pampas deer in Uruguai. *Oryx*, v.15, p.267-272, 1980.

JUNGIUS, H. Status and distribution of threatened deer species in South America. In: JACKSON, J. (Ed). *World Wildlife Yearbook 1975-76*. New York: World Wildlife Fund, 1976. p.203-221.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ed. New York: Academic, 1997. 932p.

KEAY, G.; DOXEY, D.L. Species characteristics of serum proteins demonstrated after agarose gel electrophoresis. *Vet. Res. Commun.*, n.5, p.263-270, 1982.

USER'S guide: statistical analysis system. version 6.2. Cary: SAS Institute, 1995.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, v.214, p.4406-4412, 1969.