



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Pedro Henrique Garcia Sobrinho

Identificação das proteínas que compõem a glândula prostática do
Gerbilo da Mongólia por espectrometria de massas pelo método
"Shotgun"

São José do Rio Preto
2014

Pedro Henrique Garcia Sobrinho

Identificação das proteínas que compõem a glândula prostática do
Gerbilo da Mongólia por espectrometria de massas pelo método
“Shotgun”

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto

Pedro Henrique Garcia Sobrinho

Garcia Sobrinho, Pedro Henrique.

Identificação das proteínas que compõem a glândula prostática do gerbilo da mongólia por espectrometria de massas pelo método "shotgun" / Pedro Henrique Garcia Sobrinho. -- São José do Rio Preto, 2014

86 f. : il., gráfs.

Orientador: Fátima Pereira de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Proteínas – Estrutura. 4. Proteômica. 5. Gerbilos. 6. Próstata. 7. Hormônios. 8. Espectrometria de massa. I. Souza, Fátima Pereira de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Identificação das proteínas que compõem a glândula prostática do
Gerbilo da Mongólia por espectrometria de massa pelo método
“Shotgun”

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon
UNESP – São José do Rio Preto

Dr. Fabio Rogerio Moraes
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
03 de outubro de 2014

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Márcia e Sergio e a minha irmã Bianca, pelo esforço, empenho e apoio dado durante todo o curso, sem vocês nada disso seria possível. Vocês são meus exemplos os quais sempre vou seguir. Meu alicerce consolidado.

Aos meus amigos, pelas nossas horas de discussões e conselhos dados e por compartilhar comigo alegrias e tristezas, vitórias e derrotas, vocês foram essenciais para minha formação tanto profissional quanto pessoal, em especial agradeço a Taisa Viegas, Driely Oliveira, Josimar Fernando da Silva, Lais Ozelin, Fernanda Benzatti, Antônio Bento, Guilherme Volpe, o apoio de vocês foi indispensável. Também quero agradecer a um grande amigo que sempre pude contar, Marcos Rechi Siqueira, obrigado por tudo irmão. Parceiros

Agradeço muito à Doutora Ana Paula da Silva Perez por colaborado, com total dedicação e paciência, pois você deu forte alicerce para mim e para este projeto, devo muito a você Ana. Gratidão. Também gostaria de agradecer a Isabella Otenio, por colaborar com parte dos tratamentos de bioinformática, sua ajuda também foi essencial, muito obrigado.

A toda a família do Laboratório de Microscopia e de Microanálise (UNESP/IBILCE), por toda a ajuda que cada um me deu para a execução deste trabalho, pude aprender muito com cada um. Também agradeço ao pessoal do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ), do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro-SP, e também a Doutora Nathalia Dias e ao meu Co-orientador Profa. Mario Sergio Palma, pois sempre que precisei de vocês estavam dispostas a me ajudar, vocês me ensinaram muito sobre a técnica utilizada. Aprendizado.

Agradeço à minha Orientadora Prof^a Dra. Fátima Pereira de Souza e ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, que colaborou com esse trabalho, por terem me dado à oportunidade de realizar em conjunto o projeto de iniciação científica, no qual resultou neste projeto, e consigo ver que esta pesquisa ainda nos trará melhores frutos. Obrigado, pois pude amadurecer profissionalmente e pessoalmente, pois tive a oportunidade de aprender com a experiência e maturidade de vocês na área acadêmica, são exemplos de profissionais a serem seguidos.

E a FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro

A Deus, meu porto seguro, que sempre estás comigo.

Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento;

Provérbios 3: 13

Resumo

A próstata é uma glândula encontrada no sistema reprodutor de humanos e roedores do sexo masculino e feminino. Em machos de gerbilo (*Meriones unguiculatus*), a glândula prostática é dividida principalmente em três lobos: o dorso lateral, dorsal e ventral, sendo que esses apresentam diferenças com relação aos aspectos de secreção, o pregueamento do epitélio e a organização estromal. O lobo ventral prostático de gerbilos machos apresenta similaridades morfológicas com a próstata feminina, pois esta glândula também apresenta células funcionalmente ativas. Estudos mostram que o desenvolvimento, crescimento e a diferenciação prostática são dependentes da ação de andrógenos, sendo que o principal andrógeno é a testosterona. Assim, a depleção e a suplementação pela testosterona afetam morfofisiologicamente tanto a próstata masculina quanto a feminina. Entretanto, poucos estudos relatam sobre os tipos de proteínas que compõem as próstatas masculinas, principalmente quando se trata de proteínas encontradas na próstata feminina. Desse modo, o objetivo desse estudo é fazer uma análise proteômica das próstatas masculinas e femininas de gerbilos adultos em condições normais e submetidas à depleção e a suplementação pela testosterona, utilizando espectrometria de massas. Para isso, gerbilos machos e fêmeas adultos (99 dias) foram divididos em dois subgrupos para cada grupo experimental: controle, castrado e o tratado, sendo que estes receberam cipionato de testosterona (1mg/Kg/dia) durante 21 dias. Os animais machos e fêmeas de todos os grupos experimentais foram sacrificados com 120 dias de idade e em seguida, as próstatas foram retiradas e a fração proteica extraída para análise por espectrometria de massas no contexto Shotgun. Os dados resultantes dessa técnica foram analisados com ferramentas de bioinformática. Esta investigação possibilitou identificar as proteínas que compõe essa glândula e poderá no futuro explicar disfunções prostáticas.

Palavras chaves: Proteômica, Próstata, Hormônio, Shotgun, Espectrometria de massas

2. Abstract

The prostate is a gland found in the reproductive system of humans and rodents of both the male and the female. In males of gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate gland is divided mainly into three lobes, the dorsum lateral, dorsal and ventral, and these differ in relation to aspects of secretion, the pleating of the epithelium and stromal organization. The ventral lobe of the prostate male gerbils presents morphological similarities with the female prostate of the same, even this gland also features functionally active cells. Many studies show that the development, growth and differentiation prostate are dependent on the action of androgens, being that the primary androgen is testosterone. Thus the depletion and supplementation of testosterone affect morfofisiologicamente both the male prostate gland as female. However, few studies have reported on the types of proteins that may be involved in these changes that affect the male prostates, especially when it comes to proteins found in the female prostate, presents a dysfunctional growth, especially when there are hormonal changes due to lack or excess of testosterone in the body. From this, the aim of this study is to make an analysis of proteomics of the prostates of male and female gerbils adults under normal conditions and subject to depletion and supplementation by testosterone. Therefore, adult male and female gerbils (99 days) were divided into two subgroups for each experimental group: control, neutered and treated, and these received testosterone cypionate for 21 days. The male and female animals of all experimental groups were sacrificed at 120 days of age and then their prostates were removed. Then, the total proteins of the male and female prostates were extracted to be subjected to the technique of mass spectrometry in Shotgun, and the output data of this technique were analyzed by bioinformatics tools thereby, proteomic profile of male and female prostates of gerbil will be essential to clarify some issues and propose possible solutions for problems and malfunctions involving these prostatic glands.

Key words: Proteomics, Prostate Hormone, Shotgun Mass Spectrometry

Lista de abreviaturas

Δt - variação de tempo

Δx - variação espaço percorrido pela partícula

ACN - Acetonitrila

AR - receptores de andrógenos

BL - bexiga

CEUA - Comitê de ética no uso de animais

CG - glândula coaguladora

DHT - 5 α -di-hidrotestosterona

DLL - lobo dorsolateral

DL - lobo dorsal

DTT - ditioneitol

ESI - eletrospray

FC - grupo das fêmeas controles

FT - grupo das fêmeas tratadas

HPLC - cromatografia líquida de alta performance

LCMS-IT-TOF - Cromatografia líquida Acoplada a espectrometria de massas-
Armadilha de íons-Tempo de voo

m - massa da partícula

MS - espectrometria de massa

PMSF - Fenilmetilsulfonil flúor

PSA - antígeno específico da próstata

q- carga da partícula, também se refere ao símbolo (z)

RF -Rádio frequência

SUG - seio urogenital

SV - vesícula seminal

TFA - Ácido trifluoroacético

TOF - time-of-flight -tempo de voo

U - Energia potencial da partícula

UFLC- Ultra Fast Liquid Chromatography- Cromatografia líquida ultra rápida

UR - uretra

v- velocidade da partícula

MC – Dorso Ventral do macho controle

Lista de figuras

Figura 1: Visão lateral e visão superior do complexo prostático do gerbilo, sendo bexiga (BL), glândula coaguladora (CG), lobo dorsolateral (DLL), lobo dorsal (DL), dorso ventral (VL), vesícula seminal (SV) e uretra (UR). (Retirado de Rochel et al., 2007).....(15)

Figura 2. Corte histológico dos lobos dorsal, ventral e dorso lateral da próstata masculina de gerbilo (*Meriones unguiculatus*), corada com Hematoxilina e Eosina. A,B, C. Dorsal: Grande quantidade de secreção (*) na região luminal (L). Epitélio (EP). Estroma muscular (EM). D, E, F. Ventral: Menos secreção na região luminal (*). G,H,I. Dorso lateral: Presença de “blebs” na região apical do epitélio (setas) (Imagens cedidas por Mariana Pulegio).....(16)

Figura 3. (a) Visão Geral da prostata feminina do gerbilo, mostrando o arranjo da glandula (g) e dutos (d) em volta da uretra (u). Observe que os dutos estão inseridos na musculatura que envolve a uretra. Corado com hematoxilina-eosina (HE). (b) Detalhe do epitélio prostático (ep) mostrando as células apócrinas (setas grossas), merócrinas (m) e a as células basais (setas finas). Células secretoras (c) também são visualizadas em HE, com 860 vezes de aumento. (retirado de Santos et. al. 2003).....(18)

Figura 4. Esquema de blocos mostrando as cinco principais partes que compõem um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray. (Figura cedida cordialmente pela equipe do Prof. Dr. Mario Sergio Palma).....(21)

Figura 5. Ionização do tipo Eletrospray, mostrando todas as etapas, do processo de ionização das moléculas.....(22)

Figura 6. Analisador de massas do tipo ion trap. Esquemas dos eletrodos usados para variar as RF e câmara da armadilha iônica com suas seções hiperbólicas. Modificado de www.shimadzu-biotech.net/aximaq_it.php.....(23)

Figura 7: Esquema do Analisador de massas Tempo de vôo Livre TOF, mostrando cada etapa do processo, fonte de íons, região de aceleração dos íons, região de separação, até o detector. Adaptado de Resende et al, 2013.....(24)

Figura 8: Esquema geral da análise proteômica por *shotgun*, mostrando as suas principais etapas. Retirado e adaptado de <http://tanlab.wordpress.com/2008/10/02/multidimensional-lc-separations-in-shotgun-proteomics/>.....(25)

Figura 9: Gráfico de setores das proteínas identificadas da amostra MC e classificadas de acordo com a sua função molecular.....(38)

Figura 10: Gráfico de setores das proteínas identificadas da amostra FC e classificadas de acordo com a sua função molecular.....(44)

Figura 11: Gráfico de setores das proteínas identificadas da amostra FT e classificadas de acordo com a sua função molecular.....(47)

Figura 12: Diagrama de Venn no qual mostra as proteínas totais identificadas em cada grupo e as proteínas que coexistem entre os grupos.....(48)

Figura 13: Gráfico de barras comparando a quantidade de proteínas identificadas de cada grupo experimental de acordo com sua função molecular.....(49)

Figura 14: Grafos de interação entre as proteínas dos os grupos FC e FT, obtidos pela ferramenta “String”.....(50)

Figura 15: Grafos de interação entre as proteínas dos grupos VC e FT, obtidos pela ferramenta “String”.....(50)

Figura 16: Grafos de interação entre as proteínas dos grupos VC e FC, obtidos pela ferramenta “String”.....(51)

Lista de Quadros

Quadro 1. Proteínas identificadas do lobo ventral da próstata masculina, organizadas com seus respectivos códigos de acesso aos bancos de dados, “íon score”, peso molecular, porcentagem de cobertura e o peptídeo que foi dado o “match”. As linhas mais escuras representam a proteína identificada pelo peptídeo, caso tenha encontrado mais de um peptídeo da mesma proteína, este está representado com a linha mais clara.....(31)

Quadro 2. Proteínas identificadas da próstata femina do grupo controle, organizadas com seus respectivos códigos de acesso aos bancos de dados, “íon score”, massa molecular, porcentagem de cobertura e o peptídeo que foi dado o “match”. As linhas mais escuras representam a proteína identificada pelo peptídeo e caso tenha encontrado mais de um peptídeo da mesma proteína, este está representado com a linha mais clara.....(38)

Quadro 3. Proteínas identificadas da próstata femina do grupo tratado, organizadas com seus respectivos códigos de acesso aos bancos de dados, “íon score”, peso molecular, porcentagem de cobertura e o peptídeo que foi dado o “match”. As linhas mais escuras representam a proteína identificada pelo peptídeo, caso tenha encontrado mais de um peptídeo da mesma proteína, este está representado com a linha mais clara.....(44)

Súmarío

1. Introdução	13
2. Objetivo	26
3. Materiais e Métodos	27
4. Resultados	31
5. Discussão	52
6. Conclusão.	54
7. Referências Bibliográficas.....	55
8. Apendice 1 . Lista de nomes das proteínas identificadas do grupo MC.....	55
9. Apendice 2. Lista de nomes das proteínas identificadas do grupo FC.....	59
10. Apendice 3. Lista de nomes das proteínas identificadas do grupo FT.....	62
11 Anexo 1. Manuscrito submetido à revista BioMed Research International ainda não publicado	64

1. Introdução

Glândula Prostática

A reprodução é uma característica muito importante para a continuação da espécie. Esse fato explica o grande interesse em relação ao tema nas mais diferentes áreas do conhecimento, sendo aplicado a vários conjuntos de estudos interdisciplinares dos quais resultam em várias frentes de pesquisa desde os princípios básicos, como organização dos órgãos do aparelho genital, o nível celular e molecular com ênfase, à regulação hormonal e o controle de doenças, dentre outros (GÓES, 2007)

A próstata é uma glândula acessória fundamental que faz parte do sistema reprodutor masculino, no qual é responsável pela produção de secreções essenciais para a sobrevivência, viabilidade e motilidade dos espermatozoides (PRICE, 1963). A glândula prostática desenvolve-se a partir do seio urogenital (SUG), sendo este de origem endodérmica (TIMMS, 1997). Em machos e fêmeas o SUG é morfologicamente indistinguível até o 17^o- 18^o dia de gestação em ratos e camundongos, e até a 10^a – 12^a semana em humanos. Depois desse período inicia-se a morfogênese prostática que é iniciada e dependente da ação de andrógenos (MARKER et al, 2003; CUNHA et al., 2004).

A morfogênese prostática é dependente de hormônios esteróides, os andrógenos são necessários para iniciar o desenvolvimento prostático, para continuar o seu crescimento embrionário e neonatal e, posteriormente, para iniciar a atividade secretória prostática na puberdade (ISAACS et al., 1994). Sob a influência de andrógenos, as células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que ditam o crescimento e diferenciação da glândula prostática (CUNHA et al., 2004). Assim, com a diferenciação das células epiteliais, os níveis de receptores androgênicos (AR) aumentam e a expressão de receptores estrogênicos epiteliais (ER β) e estromais (ER α) é induzida (CUNHA et al., 2004). No desenvolvimento normal, os ER α também atuam de maneira parácrina, estimulando a proliferação epitelial, enquanto os ER β medeiam os efeitos antiproliferativos, balanceando a ação proliferativa dos andrógenos sobre o epitélio prostático (ELLEM E RISBRINDGER, 2009).

A glândula prostática é encontrada na maioria dos mamíferos, porém com uma variedade morfológica entre as classes. Em roedores machos, como o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), por exemplo, a próstata apresenta quatro lobos que

circudam a uretra e a base da bexiga, nomeados como ventral, dorsal, dorso-lateral e a coaguladora (ROCHEL et al., 2007), como evidenciado na **figura 1**.

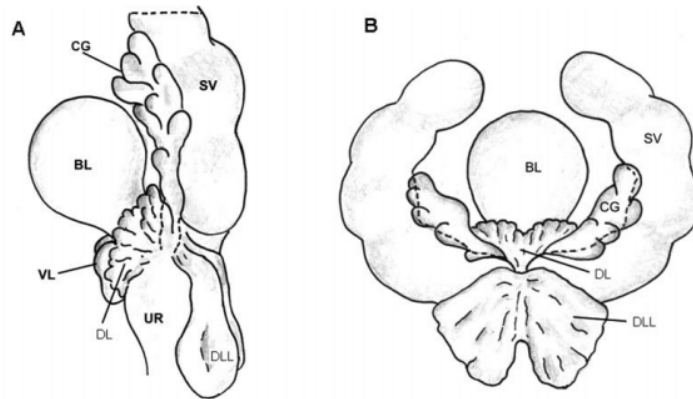


Figura 1: (A) Visão lateral e (B) visão superior do complexo prostático do gerbilo, sendo bexiga (BL), glândula coaguladora (CG), lobo dorsolateral (DLL), lobo dorsal (DL), dorso ventral (VL), vesícula seminal (SV) e uretra (UR). (Retirado de Rochel et al., 2007)

Os três lobos prostáticos mais estudados, o dorsal, dorso lateral e ventral, apresentam o padrão comum da organização histológica da próstata, como a presença de alvéolos com epitélio simples prismático e altamente secretório, imersos em um estroma com tecido conjuntivo vascularizado, com fibras colágenas e elásticas e células musculares lisas bem compactadas dispostas ao redor dos alvéolos, características muito semelhantes às encontradas na próstata masculina humana (CAMPOS et al., 2006; ROCHEL et al., 2007). Entretanto, segundo Rochel e colaboradores (2007), esses lobos prostáticos apresentam identidades distintas com relação a importantes características como os aspectos de secreção, pregueamento epitelial e a organização estromal, como observado na **figura 2**.

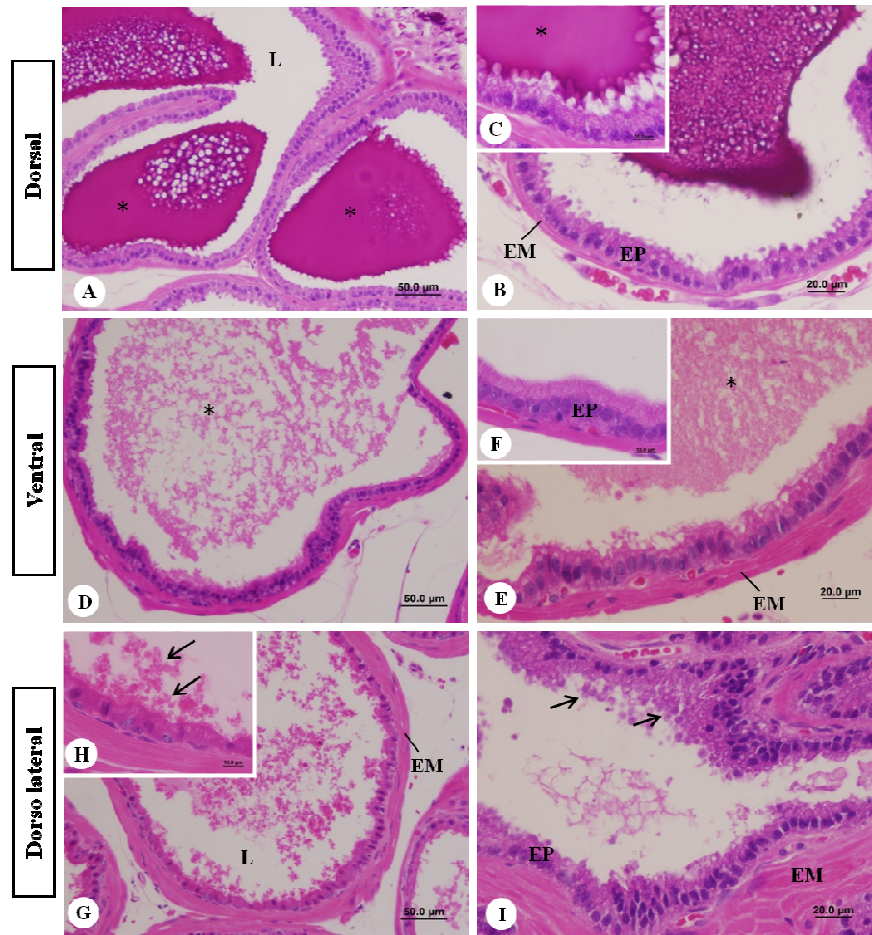


Figura 2. Corte histológico dos lobos dorsal, ventral e dorso lateral da próstata masculina de gerbilo (*Meriones unguiculatus*), corada com Hematoxilina e Eosina. A,B, C. Dorsal: Grande quantidade de secreção (*) na região luminal (L). Epitélio (EP). Estroma muscular (EM). D, E, F. Ventral: Menos secreção na região luminal (*). G,H,I. Dorso lateral: Presença de “blebs” na região apical do epitélio (setas) (Imagens cedidas por Mariana Pulegio).

Apesar de a próstata ser mencionada somente como parte do sistema reprodutor masculino, essa glândula não é exclusiva apenas desse sistema, sendo também encontrada no sistema reprodutor feminino de roedores (DOS SANTOS et al., 2003; BIANCARDI et al.2010) e de humanos (ZAVIACIC, 1999).

Em humanos, do sexo feminino essa glândula foi designada primeiramente como glândula de Skene (SKENE, 1880), recebendo uma interpretação de uma estrutura resquicial. Porém, os trabalhos de Zaviacic (ZAVIACIC, 1999, ZAVIACIC et al., 2000a, 2000b) mostraram uma homologia maior com a próstata masculina, sendo essa

homologia caracterizada pelas características morfológicas e na secreção de produtos típicos, que esses ajudam na nutrição e mobilidade dos espermatozóides.

Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm relatado a ocorrência de uma glândula prostática bem desenvolvida em várias espécies de fêmeas de roedores, como *Praomys natalensis* (SMITH et al., 1978; GROSS E DIDIO, 1987), *Rattus norvegicus* (SHEHATA, 1980), *Lagostomus maximus maximus* (FLAMINI et al., 2002), *Meriones libycus* (SHEHATA, 1975) e *Meriones unguiculatus* (DOS SANTOS et al., 2003; Custódio et al., 2004). Estes trabalhos demonstraram a existência de grande semelhança entre a próstata feminina de roedores e humanos (ZAVIAČIČ, 1999). Além disso, as características morfológicas apresentadas por estas pesquisas indicam que a próstata feminina dessas espécies é equivalente à próstata ventral masculina, e que suas células epiteliais exibem um fenótipo de células funcionalmente ativas.

A próstata de fêmeas adultas de gerbilos apresenta uma grande similaridade morfofuncional com a próstata feminina humana, tendo uma localização para-uretral (DOS SANTOS et al, 2003; SANTOS E TABOGA, 2006). A glândula desse roedor apresenta cerca de 15% a 25% do tamanho da próstata ventral de gerbilos machos, sendo constituída por um pequeno conjunto de ductos e alvéolos circundados por um estroma bem desenvolvido (DOS SANTOS et al., 2003; SANTOS E TABOGA, 2006), como observado na **figura 3**. A porção alveolar é revestida por células secretoras, que produzem abundante secreção rica em fosfatase ácida (CUSTÓDIO et al., 2004) e que expressam o antígeno específico da próstata (PSA) (SANTOS et al., 2006). Além das células secretoras e basais encontradas no epitélio prostático feminino pode também observar as células claras e as ciliadas, que apresentam diferenças no censo populacional no epitélio prostático, de acordo com a fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra (FOCHI et al., 2008).

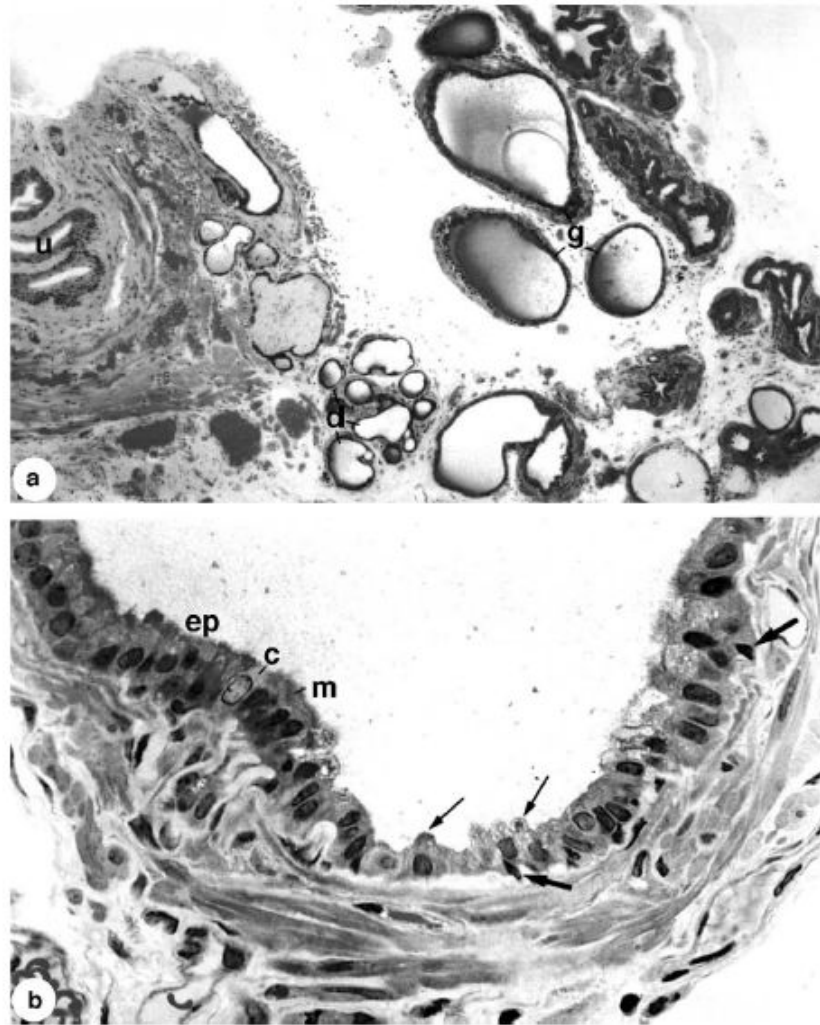


Figura 3. (a) Visão Geral da prostata feminina do gerbilo, mostrando o arranjo da glandula (g) e dutos (d) em volta da uretra (u). Observe que os dutos estão inseridos na musculatura que envolve a uretra. Corado com hematoxilina-eosina (HE). (b) Detalhe do epitelio prostático (ep) mostrando as celulas apocrinas (setas grossas), merocrinas (m) e a as celulas basais (setas finas). Celulas secretoras (c) também são vizualizadas em HE, com 860 vezes de aumento. (retirado de Santos et. al. 2003).

Regulação Hormonal

Os eventos de desenvolvimento, crescimento e de diferenciação da glândula prostática são dependentes da ação de andrógenos (MARKER et al., 2003; Cunha et al., 2004). O principal andrógeno é a testosterona, no qual, dentro da próstata, é convertida pela ação da enzima 5α -redutase tipo 2 à 5α -di-hidrotestosterona (DHT), a forma

androgênica mais ativa, tendo uma maior afinidade pelos receptores de andrógenos (AR) do que a testosterona (STREES, 2001).

De acordo com Pu e colaboradores (2007), a regulação androgênica sobre o desenvolvimento prostático é mediada por regulação positiva e negativa da ação de múltiplos genes relacionados com a morfogênese prostática. A diferença na regulação desses genes do desenvolvimento pela testosterona pode estar relacionada com a determinação da heterogeneidade dos lobos da glândula prostática de roedores.

A importância da ação dos andrógenos sobre a próstata masculina é confirmada quando estudos relatam que a depleção de andrógenos por meio da castração cirúrgica causa a atrofia da glândula, com notável redução do seu tamanho e peso, inicialmente caracterizados por uma acelerada liberação da secreção luminal, seguida pela diminuição do tamanho das células epiteliais por processos de morte e degeneração celular, resultando em lobos reduzidos e células epiteliais menores (AUMÜLLER; SEIZ, 1990). Além disso, esse bloqueio androgênico resulta em diminuição no grau de expressão de AR das glândulas prostáticas (CORDEIRO et al., 2008).

Os fatores que promovem a atividade da próstata feminina, principalmente do gerbilo têm sido muito estudados em diversas pesquisas atuais (CUSTÓDIO et al., 2004; SANTOS et al., 2006). Os resultados obtidos com estes estudos demonstram que a fisiologia da próstata feminina é regulada por andrógenos e estrógenos, e que desequilíbrios hormonais decorrentes do envelhecimento ou de manipulações hormonais pré-natais e/ou pós-natais podem levar à instalação de desordens prostáticas (SANTOS et al., 2006, CUSTÓDIO et al., 2010; PEREZ et al., 2011).

Apesar da falta de estudos que identificam os genes que regulados pela a ação dos andrógenos sobre a próstata feminina, estudos com gerbilos mostram que a suplementação com testosterona durante a fase adulta do animal promove efeitos de hiperandrogenismo na próstata feminina, como o aumento da diferenciação e proliferação das células epiteliais, aumento da atividade secretória e o surgimento de displasia prostática (SANTOS et al., 2006). Além disso, estudos com ratos mostram que os efeitos da ação androgênica sobre a próstata feminina aumentam a similaridade desta glândula com o lobo ventral da próstata masculina (BIANCARDI et al., 2010).

Como visto há muito estudo sobre a morfologia e histologia da próstata, porém a ausência de uma abordagem da caracterização proteômica desta glândula. A hipótese desse estudo é que o perfil protéico da próstata dos machos é diferente da

próstata da fêmea, podendo ser diferencialmente alterado diante de procedimentos experimentais variados.

Espectrometria de Massas

Para comparar as análises morfofisiológicas dessa glândula com as proteínas totais da glândula prostática, foi utilizada espectrometria de massas, pelo método shotgun, método responsável por determinar algumas estruturas complexas de carboidratos, determinar sequências de aminoácidos em proteínas e sequências de nucleotídeos em DNA (HARRIS, DC, 2005), fornecendo assim informações qualitativas e quantitativas sobre moléculas orgânicas.

Atualmente, a espectrometria de massas (MS – “Mass Spectrometry” BURLINGAME, A.L. et al 1996) é uma técnica microanalítica, utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. Esta técnica é uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis aos cientistas, já que é capaz de fornecer informação sobre: a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (SKOOG, D.A. 1998).

A espectrometria de massas, ao contrário do que possa imaginar, não é uma técnica recente, ela teve seu início em 1886 com a descoberta do íon positivo por Goldstein. O primeiro espectro de massas foi obtido por Thomson, em 1912, e o primeiro espectrômetro foi desenvolvido por Dempster em 1918. A partir desta data vários tipos de espectrômetro foram desenvolvidos (THOMSON, J.J 1913. WIEN, K. 1999). O grande avanço da espectrometria de massas no campo biológico se deu a partir da década de 80 e 90 com o desenvolvimento das técnicas de ionização MALDI e ESI por Hillenkamp e Fenn, respectivamente (E. HOFFMANN, 2007).

Um espectrômetro de massas é um instrumento analítico que converte componentes de uma amostra em íons gasosos, e mede suas massas, seus principais componentes estão mostrados na **figura 4**. Em um espectrômetro de massas, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z).

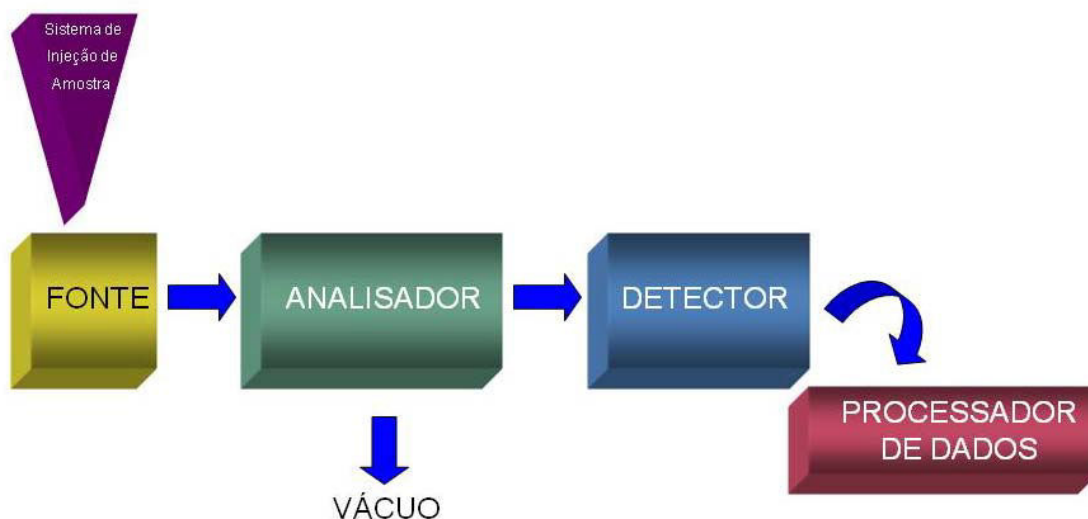


Figura 4. Esquema de blocos mostrando as cinco principais partes que compõem um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray. (Figura cedida cordialmente pela equipe do Prof. Dr. Mario Sergio Palma)

As amostras são introduzidas no espectrometro de massas, atingindo assim a fonte, convertendo a amostra em íons de acordo com o método de ionização eletrospray, resultando em uma nuvem de íons carregados positivamente ou negativamente. Uma vez que deixa a fonte são acelerados para dentro do analisador de massas, assim que separados ou resolvidos os íons vão direto para o detector (AL BURLINGAME, 1998 E. HOFFMANN, 2007). A seguir será descrito brevemente cada parte do espectrômetro de massas.

Fonte de íons

Depois de introduzidas no espectrômetro de massas a amostra precisa ser ionizada para posteriormente ser analisada. Há formas de ionizar a amostra, essas formas seguem uma relação importante entre a energia interna transferida e as propriedades físico-químicas da amostra, algumas técnicas de ionização são muito energéticas e causam uma fragmentação grande das moléculas contidas na amostra. Assim para seguir com uma análise correta, deve-se conhecer a técnica de ionização e se sua amostra suporta a energia transferida à ela.

Essa técnica tem como principio a formação de um “spray” eletrolítico, com um capilar e uma agulha de alta tensão transferindo energia para a amostra formando uma nuvem fina de gotículas carregadas de uma solução, geralmente um solvente orgânico,

contendo analito, em seguida o solvente começa a evaporar até os íons serem expelidos para a fase gasosa e irem para uma câmara para serem acelerados e resolvidos, esquema de eletrospray mostrado na **figura 5** (A. L. BURLINGAME,1998 E. HOFFMANN, 2007)

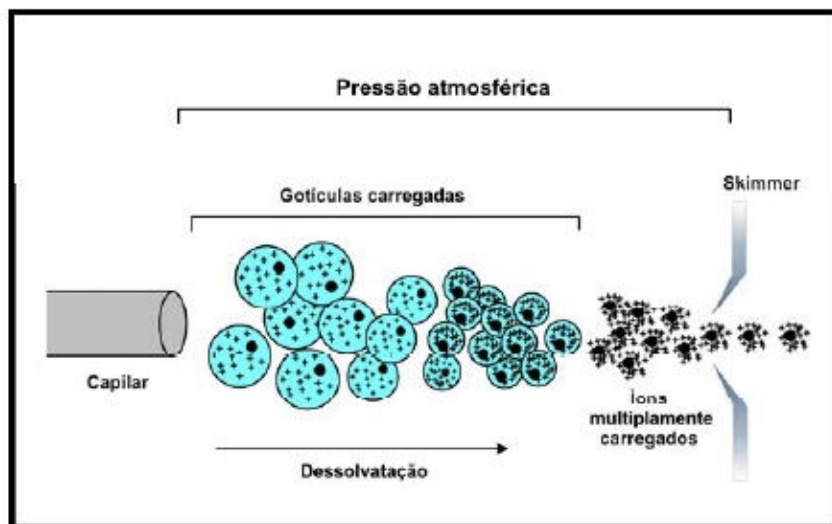


Figura 5. Ionização do tipo Eletrospray, mostrando todas as etapas, do processo de ionização das moléculas.

Analísadores de massas

O Analisador de massas tem como principal função separar ou resolver os íons previamente formados na fonte do espectrômetro de massas de acordo com a relação massa/carga de cada íon. Há vários tipos de analisadores de massas, sendo que os mais conhecidos e utilizados são: do tipo quadrupolo, armadilha iônica (*ion-trap*), tempo de voo (*time-of-flight* - TOF), setores magnéticos e elétricos (AL BURLINGAME,1998 E. HOFFMANN, 2007). Os analisadores utilizados nesse trabalho foram a armadilha iônica e o de tempo de voo de forma acoplada.

Armadilha iônica: Como observado na figura 6 são formadas por um conjunto de eletrodos de seção hiperbólica, dois centrais e dois terminais, constituindo uma câmara entre eles. Para se obter o espectro de massas aplica-se, voltagens de rádio frequência (RF) com amplitude variável e frequência fixa nos eletrodos centrais, deixando os terminais aterrados. Usando somente corrente alternada este equipamento funciona apenas como um quadrupolo tridimensional em RF. Assim para selecionar os íons na câmara e saber qual íon expulsar de maneira seqüencial, é analisado o m/z do íon e comparado com o valor determinado da amplitude RF. Em outras palavras, os íons

que apresentam a razão m/z acima de um determinado valor da amplitude da RF tem trajetória que vai mantê-lo na câmara, caso contrário será expulso (AL BURLINGAME,1998 E. HOFFMANN, 2007)

Esse equipamento tem a seqüência operacional começando com a injeção da amostra para o interior da armadilha na qual está configurada com amplitudes baixas de RF para aprisionar todos os íons formados. Em seguida a amplitude é aumentada e os íons de massa crescente são expulsos seqüencialmente da armadilha

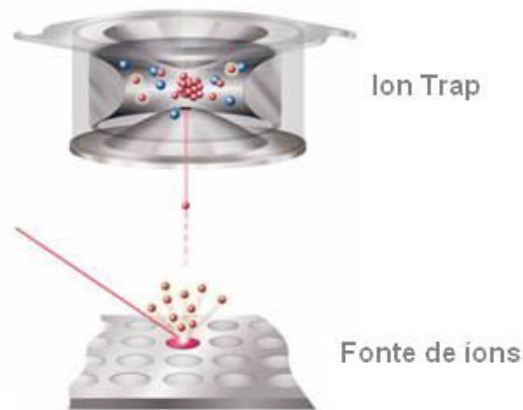


Figura 6. Analisador de massas do tipo ion trap. Esquemas dos eletrodos usados para variar as RF e câmara da armadilha iônica com suas seções hiperbólicas. Modificado de www.shimadzu-biotech.net/aximaq_it.php.

Tempo de voo: Tem seu princípio na medida de tempo que o íon formado na fonte demora para atingir o detector. Todos os íons recebem a mesma quantidade de energia durante a sua formação durante uma rápida aceleração, porém por terem diferentes valores da razão m/z , são assim separados em grupos de acordo com sua velocidade, ou seja, pela sua relação m/z . Na **figura 7** está esquematizado esse analisador. Como demonstrado nas equações abaixo, usando a lei da conservação da energia para encontrar a velocidade e o tempo de voo temos (A. L. BURLINGAME,1998 E. HOFFMANN, 2007):

$$qU = \frac{1}{2}mv^2 \quad (1)$$

$$\frac{2qU}{m} = v^2 \quad (2)$$

$$\sqrt{\frac{2qU}{m}} = v \quad (3)$$

Pela definição de velocidade tem que: $v = \frac{\Delta x}{\Delta t}$ (4)

Substituindo a equação 4 na 3 obtêm: $\frac{\Delta x}{\Delta t} = \sqrt{\frac{2qU}{m}}$ (5)

$$\frac{\Delta t}{\Delta x} = \sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad (6)$$

$$\Delta t = \sqrt{\frac{m}{2qU}} \cdot \Delta x \quad (7)$$

Assim, pode-se verificar que o poder de resolução do TOF está em função do comprimento do tubo de vôo (Δx), da voltagem de aceleração e do parâmetro m/z representado na equação como, m/q .

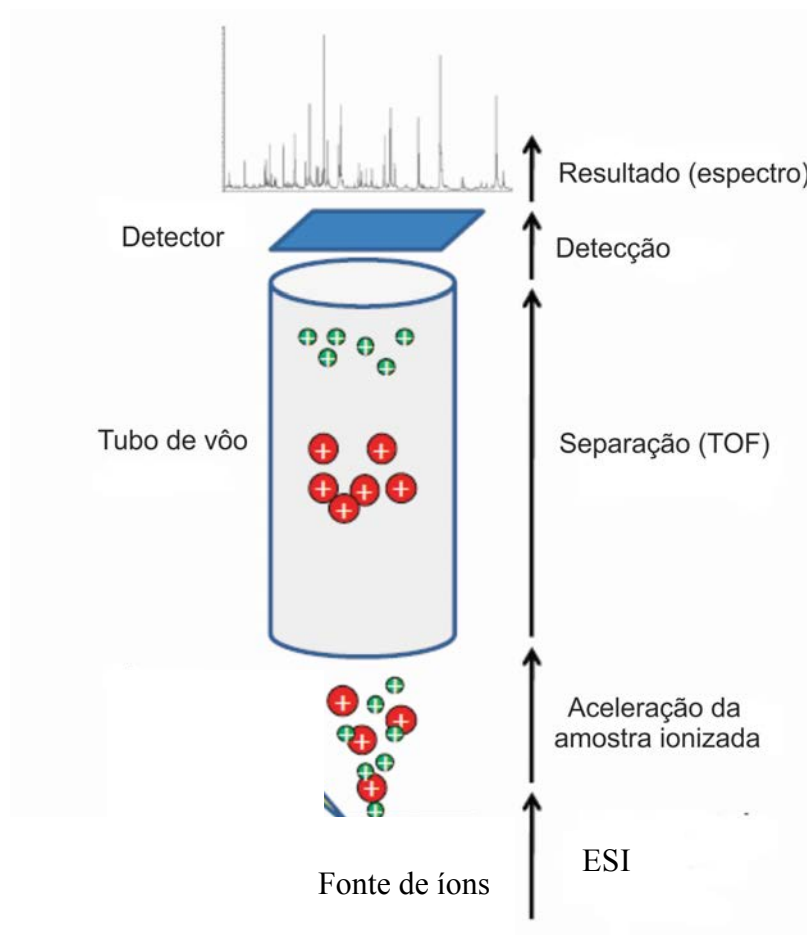


Figura 7: Esquema do Analisador de massas Tempo de vôo Livre TOF, mostrando cada etapa do processo, fonte de íons, região de aceleração dos íons, região de separação, até o detector. Adaptado de Resende et al, 2013.

Detectors

Tem como princípio converter íons em arquivos de dados compatíveis ao servidor utilizado. Localiza no final dos analisadores fazendo a conexão com as ferramentas de bioinformática para tratamento dos dados adquiridos.

Análises proteômica por Shotgun

Devido às dificuldades encontradas para identificar proteínas em uma mistura complexa, desenvolveu-se a técnica de *Shotgun*, na qual procura dar uma abordagem para essa dificuldade acoplado a um espectrômetro de massas a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Nessa abordagem, as proteínas de uma mistura complexa são digeridas por uma protease resultando em peptídeos, sendo esses separados pelo HPLC. Logo em seguida com o HPLC acoplado ao espectrômetro de massa, os peptídeos são injetados na fonte de íons e analisados via seqüenciamento por MS/MS e posteriormente com o auxílio de ferramentas de bioinformática identificar as seqüência dos peptídeos quando submetidos a busca nos bancos de dados de proteínas. Em suma

na **figura 8**.

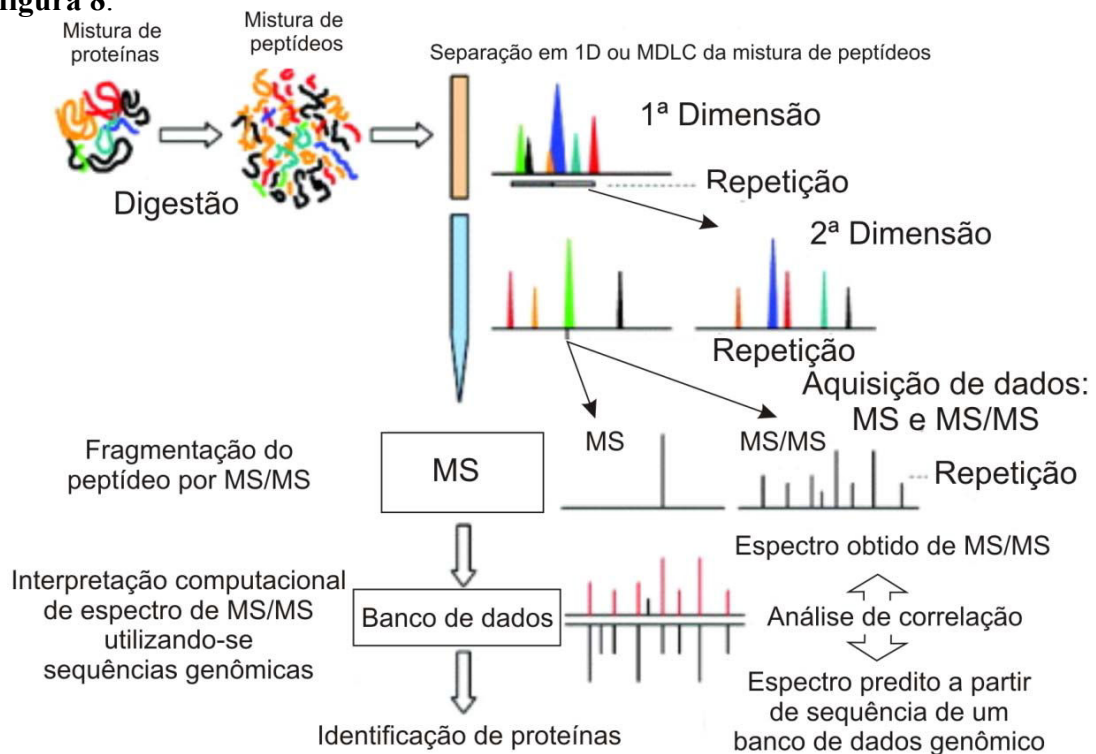


Figura 8: Esquema geral da análise proteômica por *shotgun*, mostrando as suas principais etapas. Retirado e adaptado de <http://tanlab.wordpress.com/2008/10/02/multidimensional-1c-separations-in-shotgun-proteomics/>

Bioinformática

Com *shotgun*, será necessário utilizar ferramentas computacionais de bioinformática, para as análises dos peptídeos nas proteínas em experimento de espectroscopia em *shotgun*, essas análises consistem em algumas etapas (NESVIZHSHKII & AEBERSOLD 2005).

A primeira etapa é a obtenção dos espectros de massas e confrontá-los com um banco de dados usando algoritmos como o MASCOT, SEQUEST e BLAST, esses algoritmos são capazes de fazer buscas de acordo com informações dadas pelo usuário filtrar sequências falsas durante a identificação das proteínas (NESVIZHSHKII & AEBERSOLD 2005). Logo em seguida na segunda etapa esses peptídeos são analisados e de acordo com um banco de dados são comparados com as sequências de proteínas já armazenadas nesses bancos. (NESVIZHSHKII & AEBERSOLD 2005).

Posteriormente nos próximos passos os peptídeos identificados são distribuídos entre todas as proteínas correspondentes, criando assim, uma lista destas proteínas possíveis e a partir de uma análise probabilística dos peptídeos identificados, associa-se estes peptídeos a suas proteínas. Isso permite fazer um cálculo de confiança estatística entre os peptídeos identificados e suas possíveis proteínas, estimando assim as falsas identificações, como um filtro de dados. Esses cálculos são todos feitos pelos próprios algoritmos de buscas utilizados (NESVIZHSHKII & AEBERSOLD 2005), assim, essas ferramentas computacionais são de extrema importância para a análise das proteínas que compõem a amostra.

2. Objetivo

O presente estudo teve como objetivo a caracterização protômica, das proteínas totais do lobo ventral das próstatas masculinas e da próstata femininas de gerbilos adultos que foram submetidos à castração, suplementação pela testosterona, por meio da técnica de *Shotgun*.

5. Materiais e Métodos

Animais

Os gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) machos e fêmeas utilizados foram mantidos no biotério do laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociência Letras e Ciências Exatas/UNESP. Os animais foram instalados em caixas de polietileno com substrato de maravalha, em condições adequadas de temperaturas e com iluminação ciclo de 12:12 claro e escuro, recebendo água filtrada e ração *ad libitum*, de acordo com as normas e aprovação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da instituição, sob o protocolo 047/2011.

Delineamento Experimental

Os animais machos e fêmeas foram divididos em dois subgrupos para cada grupo experimental, nos quais foram formados o grupo controle, o grupo castrado e o grupo tratado com hormônio (testosterona). No grupo castrado, os animais com 99 dias de vida pós-natal foram submetidos à orquiectomia bilateral por uma incisão cirúrgica, após a anestesia por meio de uma injeção intra muscular de Cetamina e Xilazina (50mg/Kg). No grupo tratado, os animais machos e fêmeas, com 99 dias de vida pós-natal, receberam doses subcutâneas de 1mg/Kg/dia de cipionato de testosterona (T-Deposteron – EMS), diluído em 100 µl de óleo mineral Nujol® (CAS 8020-83-5; *Sigma-Aldrich, St Louis, MO*), durante 21 dias. No grupo controle animais com 120 dias tiveram sua data de morte sem ter nenhum tipo de tratamento.

A próstata feminina do gerbilo é muito pequena e com massa em média de $0,0045g \pm 0,002g$ (dado obtido por ensaio feito em laboratório) por fêmea, então foi necessário uma quantidade significativa para uma análise bioquímica da próstata feminina, assim foram necessários 20 fêmeas para cada grupo experimental. Entretanto, para o macho que apresenta o tamanho prostático maior com relação a próstata feminina foram necessários uma menor quantidade de animais para o estudo, sendo 9 machos para cada grupo controle e tratado e 15 machos para o grupo castrado.

Ao fim de cada tratamento, os animais machos e fêmeas de todos os grupos experimentais, ao completarem 120 dias de vida pós-natal foram anestesiados por inalação de CO₂, pesados e, em seguida, decaptados para a coleta da próstata e do sangue total. Após a dissecação, as próstatas dos machos e fêmeas foram pesadas. As fêmeas com 120 dias de vida de todos os grupos experimentais foram cicladas antes do sacrifício para que todas estivessem na fase proestro do ciclo estral (NISHINO E TOTSUKAWA, 1996). E em seguida foi feita a extração das proteínas totais e seguiu-se com a técnica de *shotgun*.

Extração de Proteínas Totais

Depois da dissecação e retirada das próstatas, extraiu-se cada glândula de cada grupo e nesse processo foi usado um tampão contendo inibidor de protease (20% de Fenilmetilsulfonil flúor (PMSF) em isopropanol), em seguida diluiu-se na proporção 1:1000 em água, afim de não usar sal e detergente foi realizado o processo de maceração e corte das glândulas, importantes no processo de extração, realizado em baixa temperatura, somente com o inibidor de protease. A concentração das proteínas totais nas amostras foi determinada utilizando o método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

Digestão “em-solução” para estratégia shot-gun.

As proteínas foram solubilizadas em 50 µL de bicarbonato de amônio 50mM, pH 7.9 contendo 7.5 M de ureia, durante 60 min à 37°C e então reduzidas com ditionitrotol (DTT) 10mM, à 37°C, durante 60 min. Após este tratamento, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida 40mM, à 25°C, durante 60 min, ao abrigo de luz.

As amostras foram diluídas cinco vezes com bicarbonato de amônio 100 mM, pH 7,8, e cloreto de cálcio na concentração de 1 mM. Em seguida foi adicionada tripsina (Promega) à solução de proteína desnaturada (1:50 w/w de tripsina: proteína) durante 18 hs, a 37 ° C. A reação foi interrompida com a adição de 5 µL de ácido fórmico.

As amostras digeridas foram dessalinizadas utilizando em uma coluna Sep-pak tc 18 1cc Vac cartridge (Waters). Os peptídeos foram solubilizados em ACN a 50% (Água) e submetidos à análise em um sistema LC-IT-TOF/MS e MSn.

Experimentos de LCMS-IT-TOF

No experimento de LCMS, as amostras foram analisadas utilizando o sistema UFLC (SHIMADZU), acoplado diretamente (*on line*) ao espectrômetro de massas, contendo duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20AHT e forno para coluna CTO-20A. A análise foi realizada sob gradiente de acetonitrila de 5 a 90% (v/v), contendo 0.05% de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v), por 90 min., utilizando-se uma coluna C-18 Shim-pack XR-ODS (3x100 mm), com poros de 120 Å, com partículas de 2,2 µm (SHIMADZU). A eluição dos componentes foi monitorada por absorvância ultravioleta a 214 nm através do sistema UFLC (SHIMADZU), com fluxo de 0,2 mL/min, durante 90 minutos. Os eluentes foram analisados no modo positivo (ESI+) contínuo, durante todo o experimento.

A obtenção dos espectros de massas, foi realizada em um Espectrômetro de Massas com fonte ESI, do tipo “Ion Trap-Time of fly” (IT-ToF SHIMADZU) armadilha de íons tempo de vôo. O software LCMS solution (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do forno e da interface foi mantida a 200°C, a voltagem na agulha a 4.5 kV e a voltagem no cone a 3.5V. O fluxo de gás secante (nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 1.5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 200 a 4000, com uma resolução de aproximadamente 15000; além disso o sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo.

Os experimentos de espectrometria de massas seqüenciais, ou seja, de fragmentação peptídica (MS2 e MS3) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS. Foi utilizado Argônio como gás de colisão a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos provenientes dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 mili segundos, na armadilha de íons, utilizando-se uma energia de colisão de 50% e frequência de 30 kHz.

Os espectros de massas obtidos foram analisados primeiramente com as ferramentas do software LCMS solution (SHIMADZU), utilizado para controle de aquisição e análise de dados.

Bioinformática para a identificação das proteínas.

Todos os dados gerados no espectômetro de massas MS e MS/MS foram convertidos para o formato .MGF no qual era usual para a ferramenta de busca “MASCOT protein engine search” (<http://www.mastrixscience.com>), e foi utilizado como banco de dados para as buscas o *Swissprot* e NCBI, com buscas feitas para a entrada de taxonomia *Matazoa (Animals), dos rodentia (rodentes)*. Para essas buscas é necessário configurar alguns parâmetros no MASCOT, então utilizou-se os seguintes parâmetros: tolerância de massas do peptídeo de 0,5 Da e a tolerância da massas dos fragmentos peptídicos de 0,5 Da, número de clivagem perdida de no máximo 2, para as modificações fixas e variáveis da amostra considerou-se a carbamidometilação e a oxidação da metionina, respectivamente, e os valores de “ion score” considerados significantes foram os valores pré-estabelecidos pelo MASCOT.

A função de cada proteína foi identificada utilizando o banco de dados UNIPROT, na qual entrava-se com o código de acesso da proteína e assim verificava sua função e se há interações entre as proteínas que são diferentes em cada grupo utilizando a ferramenta de bioinformática “*String*”, buscando assim alguma associação funcional (V.M. CHRISTIAN et al 2002)

Toda a infra-estrutura para a realização da espectrometria de massas foi fornecida pelo Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (LBEZ), do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro-SP, sob a co-orientação do Prof^o Dr. Mario Sergio Palma e auxílio da doutoranda Nathalia Dias

6. Resultados

Foram identificadas proteínas dos grupos do lobo ventral (MC) da próstata do macho controle e as proteínas de animais tratados (FT) e controle (FC) da fêmea, que estão apresentados separadamente.

Proteínas da próstata do lobo ventral (MC)

Os resultados apresentados no **quadro 1**, descrevem as proteínas identificadas e estão agrupadas com o código de acesso no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dados de *ion score* do peptídeo, que foi identificado na proteína (acertos), além da massa molecular, as porcentagens de coberturas das seqüências de aminoácidos encontradas nas amostras comparadas e identificadas com as seqüências das proteínas depositadas nos bancos de dados utilizados. Este quadro contém também as seqüência de aminoácidos dos fragmentos gerados das proteínas que tiveram acertos com a proteína depositada no banco de dados. No **Apêndice 1**, é possível verificar o código de acesso com o nome da proteína.

Quadro 1. Proteínas identificadas do lobo ventral da próstata masculina, organizadas com seus respectivos códigos de acesso aos bancos de dados, “ion score”, peso molecular, porcentagem de cobertura e o peptídeo que foi dado o “match”. As linhas mais escuras representam a proteína identificada pelo peptídeo, caso tenha encontrado mais de um peptídeo da mesma proteína, este está representado com a linha mais clara.

	Código de Acesso	“ion Score”	MW (Da)	Cobertura (%)	Peptídeo encontrado
1	Q3UZY0	27	145596	1	R.HCAELWK.K
2	P35486	23	43888	2	R.AILAELTGR.R
3	P08699	23	27241	6	K.VAVNDVHLLQYNHRMK.N
4	P35601	20	126705	1	K.KAASKSK.E
5	Q04888	19	50089	2	K.SAHLDR.H
6	Q8VCE1;	19	45073	2	R.MHAGQDK.A
7	Q8BSP1	19	60130	1	K.TGHIAVK.Q
8	A6H8H2	19	213776	1	K.TNGDVQSVK.M
9	P62737	19	42381	4	R.AVFPSIVGRPR.H
		32			K.ILTER.G
		17			R.LDLAGR.D
		17			K.CDIDIR.K
		18			K.IIAPPER.K
		7			K.IIAPPERK.Y
		29			K.AGFAGDDAPR.A
		28			R.DLTDYLMK.I
		37			R.DLTDYLMK.I
		33			K.EITALAPSTMK.I

		22			K.EITALAPSTMK.I
		15			R.HQGVMVGMGQK.D
		31			K.DSYVGDEAQS.K.R
		29			R.AVFPSIVGRPR.H
		26			R.AVFPSIVGRPR.H
		15			K.DSYVGDEAQS.K.R.G
		66			K.SYELPDGQVITIGNER.F
		10			R.VAPEEHPTLLTEAPLNPK.A
10	P02600	25	20781	45	K.IDLSAIK.I
		8			R.HMCATLGEK.M
		57			K.ITLSQVGMCR.A
		6			R.ALGTNPTNAEVK.K
		39			K.MCGNPSNEEMNAK.K
		19			K.DQGGYEDFVEGLR.V
		43			K.KPAAAAPAPAPAPAPAKPK.E
11	P58771	19	32718	20	R.AEFAER.S
		10			R.AELSEGK.C
		7			R.LATALQK.L
		19			K.SLEAQAEK.Y
		45			R.KYEEVAR.K
		13			K.MEIQEIQLK.E
		14			K.ATDAEADVASLNR.R
12	P58774	19	32931	20	R.AEFAER.S
		7			R.LATALQK.L
		9			K.IVTNNLK.S
		5			K.SLEAQADK.Y
		45			R.KYEEVAR.K
		9			K.LVILEGELER.S
		14			K.ATDAEADVASLNR.R
13	P21107	19	33031	12	R.AEFAER.S
		7			R.LATALQK.L
		19			K.SLEAQAEK.Y
		45			R.KYEEVAR.K
		13			K.MELQEIQLK.E
14	P09495	5	28549	18	K.LAQAK.E
		19			R.AEFAER.T
		7			R.LATALQK.L
		45			R.KYEEVAR.K
		9			K.LVILEGELER.A
		4			-.MAGLNSLEAVKR.K
15	Q8R429	16	110723	5	R.DAGIR.V
		3			R.ILSIK.S
		16			R.VPLTGPVK.E
		43			K.GAPEGVIDR.C
		13			R.EFDDLPLAEQR.E
		18			R.CLALATRDTPPK.R
16	O55143;	43	116437	2	K.GAPEGVIDR.C
17	Q6AY26	32	27281	5	K.ENSLPSCILGPR.T
18	Q9WTM3	26	100787	1	R.EVSVEDARLGRVQFSR.V
		25	29785		R.QQDEMMPKPTDK.E
19	Q70FJ1	21	439138	1	K.IKGLVK.A
		14			R.EYTCLLKIR.D
		9			K.IKLEMLEK.E
20	Q7TMK6	32	83885	1	R.LLTER.D
21	Q80U19	20	129087	2	R.GQVAELVAR.H
23	Q8R399	24	200492	1	R.LSSDLTR.E
		12			R.KSGAQPK.E
23	Q8C0M9	32	34385	7	K.LITER.T
24	Q923Q2	21	126179	1	K.RMDTLR.V

		24	3933362		K.DATDLTR.S
		9			R.IVEPLK.D
		13			R.LKIPIK.G
		10			R.EEDQPADR.W
25	Q63374	31	187162	1	R.ESADTLR.L
26	Q9R117	19	134942	1	R.AILEDK.A
		11			R.NPAGSNGPR.G
27	O70585				
		21	75207	1	M.IEEGKNK.R
28	Q9JLC8	19	525942	1	R.LCKALR.E
		11			K.DINFLALAMTLK.S
29	Q5XHZ2	22	38419	6	K.EEKLIK.A
30	Q9DAS4	28	28413	2	R.QILRDLR.W
31	O35385	27	87560	1	R.WYRRYMAR.L
32	Q76178	21	160069	1	R.TERLIK.T
33	Q8K394	26	127118	1	R.SSIKDGTKQK.R
34	P97457	47	19057	18	K.EASGPINFVFLTMFGEK.L
		28			K.QFLEELLTTQCDR.F
35	P13412	27	21515	9	K.SVMLQIAATELEKEESR.R
36	Q8QZY3	23	17830	8	R.TLLSMCKDPIAK.M
37	Q8CI33	21	60897	2	K.FDMCFNRVRTIQK.K
38	P15464	32	29663	3	R.SWADDFNSRK.E
39	Q91W27	27	11072	7	K.LLLLDAP.
40	Q9CWU6	28	34676	2	K.IKIAALR.M
41	Q0QEP2	26	39359	4	R.DQEGQDMCLFIDNIFR.F
					R.EKEGLLPISPATPPGSDEKTEESSE
42	P09022	24	36356	7	K.S
43	Q568Z0	23	58456	2	R.MCDLMRMDMTNFVIR.N
44	Q8CH77	23	203041	1	K.KLEYDSGSLKMEPGTSK.W
45	A2RT67	22	145678	1	K.HKINPSAGETAPQAIEMCLYTPGR.L
46	Q60544	22	213160	1	R.RRTDPMVTLSSILESIIINDMR.D
47	Q3UY23	21	71329	1	R.FLEASSCHPIR.T
48	Q6YND2	21	68501	2	R.SGWSDAKLAAYLISLER.G
49	Q8CGV9	21	119464	1	R.SLLEMEGKEDAQK.V
50	P97479	23	257001	1	R.GWILVSLCVGCFAPSEK.F
51	Q7TPQ3	20	194048	1	R.LDFMSDAGSRMK.K
52	Q9JMH4	20	145004	1	R.RSIAIKP.-
53	Q62865	20	125762	1	K.DKLAIPK.R
54	Q8R0W0	27	726989	1	R.GHMVPVWDILTSNYVSR.D
55	P49722				
		20	26024	2	R.DYLAAIA.-
56	O55102	19	14329	6	K.GQLQSAPS.-
57	P70392	19	136950	1	R.GKLSKVR.L
58	Q8C0V1	19	88704	1	R.NGQTLVR.E
59	O35348	19	48566	1	R.GFPGPPGR.C
60	P13439	19	52773	1	R.GIVSRPR.L
61	P70498	30	106712	1	R.FAAAHSPAR.E
62	Q9QWR8	22	47717	3	K.VNYTEVSRVCNLWR.N
63	Q7TSP2	21	160582	1	R.TWLLQTQLDDMKR.Q
64	Q5SS80	21	41175	5	R.TVVVTGANSIGKMTALELAR.R
65	P22858	19	20088	4	R.FGSDDEGR.Y
66	Q9CZ13	19	53446	1	-.MAASAVCR.A
67	Q0VGT4	19	208573	1	K.GETMRSGK.N
68	D3Z750	19	192112	1	K.KMDLVGLR.N
69	Q8BG32	19	47692	1	K.VVDSLYSK.A
70	Q5XHX9	19	51918	1	K.FSGPPRLR.K
71	Q99N92	19	15992	6	-.MAAAAALTLR.T
72	Q8K2M0	19	45287	1	-.MAAPWWR.A
73	Q9DB30	19	46942	3	R.CVHRATGDEFVAVK.I
74	Q8QZR7	27	38867	3	K.SMNGRMKQLIK.E

75	Q91VE0	25	73128	2	-.MLLGASLVGALLFSK.L
76	Q8CAA7	22	71147	2	R.DITTYDSSQPNK.K
77	Q8VC19	20	71827	1	R.SDPSVPK.I
78	O70343	20	91843	1	R.DSVSPPK.S
79	Q9WVH3	20	53901	1	R.GRSKGPK.K
80	Q8C4A5	19	246257	1	R.LNKPSMANRIMPSPPEVKQQK.R
81	Q9Z2G9	19	27081	4	K.SAELAKAGGCK.H
82	Q61716	19	21989	4	K.AQAIPMCR.D
83	Q6LDI9	19	142970	1	K.GANGEPGK.A
84	Q9D4K7	19	57781	1	K.LNRPLVR.M
85	Q8K4L3	19	244551	1	K.VIKSTTLK.I
86	Q7TNC4	19	46954	1	M.SAQAMR.A
87	P33534	19	43308	5	R.NTVQDPASMRDVGGMNPKV.-
88	Q8CB62	25	99515	2	R.VHGLPSTNLQSGSLSTGSPEK.D
89	Q62137	19	124672	1	R.LPVGLSMK.E
90	Q8BP74	19	41535	1	K.ADETLRR.T
91	O70372	19	129892	1	R.AFMCRVR.A
92	Q8BVP1	19	54722	1	K.ANMKKLR.E
93	Q3V1V3	19	98216	1	R.ADEITRR.L
94	Q149C3	19	64946	1	R.AVFCAHR.R
95	Q69ZH9	19	163044	1	R.AFPEPGSR.V
96	Q5ND34	19	213751	1	R.AMDACHR.Q
97	Q9WUB9	19	49990	1	K.GEHGTKGDK.G
98	P21550	58	47337	14	K.VNQIGSVTESIQACK.L
		15			R.EILDSR.G
		11			K.YDLDFK.S
		30			K.YNQLMR.I
		41			R.IEEALGDK.A
		37			K.TAIQAAGYPDK.V
		19			R.GNPTVEVDLHTAK.G
99	P05064	54	39787	22	R.ALANSLACQGK.Y
		13			K.AWGGK.K
		17			R.IVAPGK.G
		20			K.DGADFAK.W
		20			K.DGADFAK.W
		18			K.MCAAVYK.A
		7			R.ALQASALK.A
		34			R.QLLLTADDR.V
		45			K.GILAADESTGSIK.R
		18			R.LQSIGTENTEENRR.F
100	P17182	58	47453	5	K.VNQIGSVTESLQACK.L
		11			K.YDLDFK.S
101	O35090	51	70892	12	K.KAPQVSTPTLVEAAR.S
		12			K.LDALK.E
		16			K.LATDLTK.V
		12			K.CCSGSLVER.R
		15			K.EACFSTEGPK.L
		20			R.EVTDFASNCAK.D
		16			K.YTAMCTECCAADDK.G
102	P16125	39	36834	5	R.LNLVQR.N
		39			R.VIGSGCNLDSAR.F
103	P06151	39	36817	11	R.LNLVQR.N
		16			K.ISGFPK.N
		16			R.NVNIFK.F
		14			R.VHPISTMIK.G
		39			R.VIGSGCNLDSAR.F
104	P07310	40	43246	17	K.FEEILTR.L
		12			R.GGVHVK.L
		12			R.DWPDAR.G
		26			K.IEEIFK.K

		17			R.FCVGLQK.I
		11			K.LMVEMEK.K
		19			K.LMVE <u>ME</u> K.K
		15			K.IEEIFKK.A
		13			K.GYTLP <u>PH</u> CSR.G
		14			K.DLFD <u>PI</u> QDR.H
105	E9Q557	40	335158	1	R.YI <u>ELL</u> TR.S
106	Q7TPS5	39	113133	1	K.VKIVAGR.H
107	Q6Y4S4	35	14279	5	R.GAMCVQR.E
108	P50309	34	63190	1	R.AMCHVALR.N
		11			R.AMCHVALR.N
109	Q8VHP8	34	31442	2	K.LPLPVALR.S
110	E9Q414	19	510481	1	K.VDKYK.T
		9			R.LSNDLMG <u>SYAEM</u> K.L
111	O54898	20	253554	1	R.AIGVR.A
112	Q9WUB3	28	97681	2	R.TIMIGGK.A
		19			R.NNVVNTMR.L
		16			R.EIWGVEPSR.Q
113	P17244	25	35953	13	K.IVSNASCTT <u>NCLAP</u> LAK.V
		17			R.GAAQNIIPASTGAAK.A
		12			K.LVINGK.A
114	P16015	23	29633	11	R.GGPLSGPYR.L
		18			R.VVFD <u>DTYDR</u> .S
		11			K.GDNQSPIELHTK.D
		22			K.LEEMTR.R
		15			K.GEGFGAEQVAEVR.A
		8			R.LQTLLK.H
115	Q8BYH8	22	325826	2	R.VQLINR.R
		13			K.LLEGLK.L
116	B7ZNG4	25	72827	1	R.HHLG <u>LAQR</u> .I
		17			R.TLALR.Q
117	Q8CB77	35	87450	2	K.EKLPSSVVK.K
118	Q5FMC7	19	90207	1	K.EPVITK.E
		14			R.AQYNKAR.R
119	Q8BHB0	19	109382	2	-.MEEHGHHEM <u>EGT</u> PLGCHSHIK.L
		13			R.RMFPER.T
120	Q8CIH5	24	148696	1	K.MCGAR.H
		9			K.KLMFDQQK.S
121	Q62688	19	124404	1	R.VM <u>VQQM</u> K.K
		13			K.IAVHPLR.E
122	Q922B6	40	68212	1	K.MNLEAHLK.E
123	O88480	33	245169	1	K.SRLLPNMPK.L
124	Q91V92	25	120564	1	K.LIMGIGHR.V
125	O70250	24	28980	4	R.ALPFWNEE <u>IAP</u> K.I
126	B3EWE3	23	15121	21	K.FLASVSTMCTSK.Y
		11			R.MFVAYPTTK.T
127	Q9QXJ1	19	78077	2	R.SLGWVEMTE <u>EELAPGR</u> .S
128	P09812	27	97725	8	R.IGEEYISDLDQLR.K
		16			R.LKQEYFVVAATLQDIIR.R
		13			R.ILVDLER.L
		10			R.WPVHLMETLLPR.H
129	Q91YI8	23	58378	6	R.GDLGIEIPA <u>EK</u> .V
		18			R.GIFPMCK.D
130	Q6AYU0	23	47462	5	K.TEKIYPEPRR.N
		16			K.TPEEIEEKRAIK.E
131	Q811B3	26	182615	1	K.WCMAGKCITV <u>GK</u> .K
		9			R.QAAHCVKK.G
132	Q80U59	27	157247	2	R.SSVASVPM <u>HEKAQSR</u> .S
		6			K.DLYVDSRNNKEYK.E
133	Q99M15	25	39380	5	-.MTGSLFK.G

		8			K.VREDWQSEHIK.A
134	P55200	20	434172		R.VINIDGQKHIVIFAMRK.I
		10			K.CQNLQWMPKASLQK.Q
		8			K.SFFIRQMER.V
135	P53657	23	62612	3	R.GDLGIEIPAЕК.V
		6			K.GSFPVEAVK.M
136	D4ACE5	29	106102	1	R.AVFQQLTK.V
137	Q3V1H1	29	74440	2	K.TISECLNLINEGCPK.E
138	P04248	22	17045	14	M.GLSDGEWQLMCNVWGK.V
		6			K.SEDEMK.G
139	Q640L5	26	170890	1	K.CNLYKSELEILK.E
140	Q6P4T2	20	246045	1	K.ETGKTARAIR.D
141	Q62312	20	68561	3	K.LGSSLAR.G
142	Q6PDK2	19	606541	1	K.TCRLCR.A
143	Q8CDG3	20	135673	1	K.NTELVK.V
144	Q99JT1	20	62593	3	R.ADPALIK.K
145	B0BN56	19	44220	5	R.NYFNEKRDILK.E
		10			R.RVSFTQIISNMK.I
146					-
					.METRALWLMMLVMCVAGSSGIAADY
	Q62395	25	9201	49	VGLSPSQCMVPANVR.V
147	Q5F2E7;	23	75668	1	K.AQPKPLK.H
148	Q8JZR6	21	123710	1	R.KLLSSPGK.S
149	Q8R016	19	53104	1	K.KMVAASIK.D
150	Q63068	19	43311	1	K.KMKEAIK.S
151	P79457	19	138589	1	K.MKTLLNK.A
152	Q9JLY0	19	59610	1	-.MKKISLK.T
153	Q14B48	19	117584	1	R.KMSQLLK.R
154	Q9CQ29	19	28184	2	R.KMVEVNK.L
155	P47952	19	19619	3	R.LLASHLK.S
156	Q9CWV4	19	41152	4	K.VDFLVNYMLYKYQVK.E
157	Q8K2B3	19	73623	1	-.MAGVGAVSR.L
158	P29995	19	310055	1	R.DSSLHLK.E
		12			K.GQLTEASSATSK.A
159	Q62009	28	93769	1	K.VIQGSLQPIIK.T
160	Q63625	22	185926	1	R.DGSPHSSLRDR.R
161	Q8CGZ0	20	106501		R.SKSYSPGR.R
162	Q8K319	20	58128	3	-.MSTASSSSSQTPHSAPQRM.R
163	A2AG06	20	109845	1	R.IQSVNHMEGLTK.T
167	Q9CWI3	19	36262	2	K.TFMEAGK.S
168	P25911	19	59231	1	-.MGCISK.R
169	Q68FD5	19	193202	1	K.VIALKAGK.T
170	Q5XI63	19	76721	1	-.MRGRGSR.D
171	Q8C0Q2	19	105190	1	K.NPEGLSLHNAK.C
172	D3Z750	19	192112	1	K.KMDLVGLR.N
173	Q0VET5	19	74821	1	R.RKKPGPGVR.Q
174	P32233	19	40772	2	R.GRQVIAVAR.T
175	Q80WQ8;	19	114968	1	K.SSLKVNGHK.K
176	Q8BJM3	19	85568	1	R.LLLELSGNVKNR.K
177	P55200	21	434172	1	K.VTPLK.M
		14			K.MEGENQSKNTQK.E
178	Q9Z129	24	73407	1	K.LIYVTPEKIAK.S
179	Q9WU50	21	838425	1	K.TLQEGYNLLFSESLK.Q
180	Q03238	19	28777	3	R.DKPAEGSR.C
181	Q8CG65	19	565916	1	R.SCSSPPPK.N
182	Q8R1Q8	19	56864	1	K.IPPEEMK.E
183	P32261	19	52484	1	K.ENPEQSR.V
184	Q9EQQ0;	19	55432	1	R.SRPSAGER.R
185	P97686	19	134683	1	K.GEGPASADR.G
186	Q69Z23	20	514983	1	K.IPETFNMAEIMAKAAEK.T

187	Q811D2	27	181790	1	R.DAVYSYKRLIELK.R
188	Q6S9C4	20	10563	13	R.YDDGRGPPGNPPR.R
189	Q8R0X7	19	64263	1	R.LSNMMSAK.G
190	Q61382	19	55179	1	K.CGARMMR.R
191	O08742	19	63941	1	R.SVAPGAFDR.L
192	Q8C0I4	19	91758	1	R.GGRVIMDR.I
193	Q9QYE5;	19	142182	1	R.LTLRFNR.D
194	Q9QUJ0	19	8279	10	R.VYINMPGR.G
195	Q99NF2	19	60712	1	K.LLDFDDMC.-
196	Q9D9G0	19	114022	1	R.RTSGSKTGR.E
197	P00676	19	14714	6	K.SRNMTQGR.C

A análise dos resultados mostrados no **quadro 1** possibilitou identificar um total de 197 proteínas do grupo (MC). A partir deste resultado foi verificada a função que cada proteína desempenha na célula prostática, e assim, as proteínas foram agrupadas de acordo com suas respectivas funções. Por ter proteínas que pode ter mais de uma função molecular simultaneamente, durante a classificação foi respeitada essa característica, e classificada em mais de um grupo utilizando *data base* (Uniprot). Os resultados mostram que essas proteínas estavam agrupadas entre funções: estrutural, atividade catalítica, reguladora, sinalizadora, transportadora, receptora entre outras, como mostrado na **figura 9**, sendo as mais predominantes as proteínas que desempenham atividade catalítica, regulatória e estrutural.

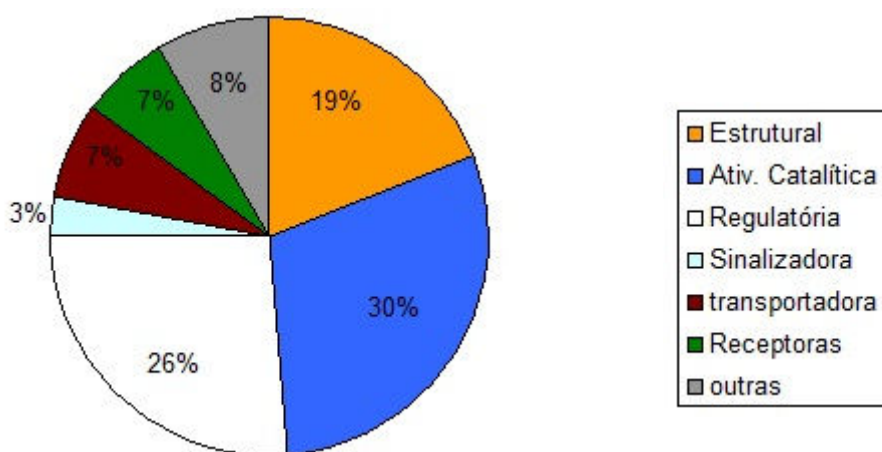


Figura 9: Gráfico de setores das proteínas identificadas da amostra MC e classificadas de acordo com a sua função molecular.

De acordo com essa classificação, pode se verificar que a glândula prostática tem um papel molecular importante na sua atividade catalítica, 30% das proteínas encontradas, tem função enzimática. É uma glândula com sua estrutura bem desenvolvida, sendo que 19% de suas proteínas totais são estruturais e por possuir

bastante proteínas regulatórias, cerca de 26%, pode se perceber o quanto essa glândula está suscetível a eventos moleculares de estresse bioquímico que necessita ter suas funções regulatórias bem estabelecidas. Desta forma, os percentuais de proteínas regulatórias estão de acordo com a função regulatória neste tecido. Esta é uma glândula que recebe estímulos externos por ter proteínas sinalizadoras e receptoras e também é capaz de transportar suas secreções com de suas proteínas transportadoras.

Proteínas da próstata das Femea Controle (FC)

Os resultados apresentados no **quadro 2**, descrevem as proteínas identificadas e estão agrupadas com o código de acesso no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dados de *ion score* do peptídeo que foi identificado na proteína (acertos), além da massa molecular, as porcentagens de coberturas das seqüências de aminoácidos encontradas nas amostras comparadas e identificadas com as seqüências das proteínas depositadas nos bancos de dados utilizados. Esta tabela contém também as seqüência de aminoácidos dos fragmentos gerados das proteínas que tiveram acertos com a proteína depositada no banco de dados. No **apêndice 2**, é possível verificar o código de acesso com o nome da proteína.

Quadro 2. Proteínas identificadas da próstata femina do grupo controle, organizadas com seus respectivos códigos de acesso aos bancos de dados, “ion score”, massa molecular, porcentagem de cobertura e o peptídeo que foi dado o “match”. As linhas mais escuras representam a proteína identificada pelo peptídeo e caso tenha encontrado mais de um peptídeo da mesma proteína, este está representado com a linha mais clara.

	Código de Acesso	íon Score	MW (Da)	Cobertura (%)	Peptídeo encontrado
1	P02541	17	53463	24	K.TVMIK.T
		32			R.IDLER.R
		14			R.LEEEIR.H
		28			K.GTNDSLMR.Q
		22			K.LLEGEESR.I
		10			R.AQYETIAAK.N
		59			R.ADVDAATLAR.I
		38			K.LQEEIQLR.E
		54			R.TSGGAGGLGSLR.A
		13			K.VSDLTQAANK.N
		24			R.KLLEGEESR.I
		50			K.VELQELNDR.F
		18			R.EEAENNLAAFR.A
		54			R.FASEASGYQDNIAR.L
2	P62737	16	42381	20	K.ILTER.G
		37			R.LDLAGR.D

		24			K.IIAPPER.K
		36			K.RGILTLK.Y
		37			K.AGFAGDDAPR.A
		45			R.GYSFVTTAER.E
		16			K.EITALAPSTMK.I
		18			R.HQGVMVGMGQK.D
		13			K.EITALAPSTMK.I
		7			K.DSYVGDEAQS.K.R
3	P48670	32	51874	7	R.LDLER.K
		22			K.LLEGEESR.I
		24			R.KLLEGEESR.I
		50			K.VELQELNDR.F
		12			R.TLLIKTVETR.D
4	O08638	18	227743	7	K.MQLAK.K
		22			K.LLEER.V
		3			K.LNVSTK.L
		30			R.KLLEER.V
		15			R.DEIFATSK.E
		16			R.LDEEIAQK.N
		9			R.EQVMTMCK.K
		2			K.QGFEAASIK.E
		25			K.LQEVEGAVK.A
		30			R.ALEEALAK.E
		11			K.ENADLAGELR.V
		7			K.AEMEDLVSSK.D
		14			K.KEEELQAALAR.L
		21			R.ELDEATESNEAMGR.E
		31			R.EDQSILCTGESGAGK.T
		6			R.VSDLTTNLAEEEEK.A
5	P61161	37	45017	3	R.LDIAGR.D
		17			K.IRIEDPPR.R
6	Q9DAM2	34	26337	3	K.DREARER.E
7	Q68FH0	34	132268	1	R.VVSSVATALR.N
8	P58771	33	32718	11	K.ATDAEADVASLNR.R
		18			K.CAELEEELK.T
		13			R.AEFAER.S
		21			K.MQMLK.L
9	Q91ZU6	30	838425	1	R.KQVKER.E
		18			K.IGVIR.L
		18			K.AGSRASSR.R
		6			R.QRGEEMAR.S
		22			R.QPPSISAEVEKIK.E
10	A2A870	30	130400	1	R.KLELER.A
		17			R.QMAMAEQER.D
11	Q8R4H2	30	173439	1	K.KQKVER.S
		9			R.EAHSDDNPSEGDGAVK.K
12	Q8CG46	30	129930	1	K.KELLER.K
		6			K.EGQIPMTR.R
13	Q00552	30	169022	1	R.AGKINER.L
14	Q9JL61	30	70148	1	K.KPGGSGER.N
15	Q920F6	30	145678	1	K.KNVAAER.K
16	Q0VGK4	27	36187	9	K.RAFDLGATGVMTDYPTK.L
		5			R.EQFFEIPMPSIILK.L
17	P63154	23	83649	1	R.IPKVAKVK.N
18	Q8R4X7	22	124546	1	R.ILEER.H
		7			R.GPLWNDPEAGHPK.K
19	Q6ZQD7	20	248621	1	K.LDMIKPALTSAVVPK.S
20	A2ASS6	4	3933362	1	K.AQLAR.Q
		14			K.SHMAK.H
		9			K.MSEVK.S

		5			R. ESTRK.A
		11			K.KIKPSR.F
		13			K.SEPIVAK.H
		19			K.VPVPKPK.E
		13			R.VHTNATIR.N
		2			K.KVPAPTPKK.V
		14			K.GDQELSSTAR.L
		8			K.EAPPAKVPEK.K
		13			R.DEVEPPRISM ^U DPK.Y
		4			K.TTGLDEGLE ^U YFR.V
		12			K.WYHNDVELKSN ^U GK.Y
21	P02301	18	15363	16	R.VT ^U IMPK.D
		19			R.VT ^U IMPK.D
		25			R.KLPFQR.L
		18			K.RVTIMPK.D
		18			-.MALT ^U KQTAR.K
22	Q8BZX4	32	56930		K.IDEIR.R
		25			R.LCSTADAV.-
23	Q9QXZ0	20	836893		K.IQALR.F
		16			R.LLDDR.K
		18			R.AGSRASSR.R
		13			R.LCLEHDEK.L
24	P30427	23	535152	1	K.GLMCR.D
		13			R.ERLQR.L
		14			R.IEEEEIR.V
		6			R.MAEMSRAQAR.A
		19			K.KAFHR.L
		19			R.AMDRLR.R
		12			K.AFHRLMK.K
25	A2A690	32	221608	1	K.LDLER.S
		14			K.MNDFGMAEEFATK.A
26	Q8VHE6	23	531156	1	K.IDIQR.N
		6			K.RDMFKK.N
		18			R.IFAENTAR.D
27	Q8BLB8	25	58478	2	R.KVSSLK.R
		17			K.TALIHACIRR.A
28	P28481	24	138974		R.GFSGLDGAK.G
		10			K.TVIEYK.T
		8			K.GETGEQGDRGIK.G
29	Q569Z6	32	108171	1	R.LDIER.R
		12			R.EPGYKAEGKYK.D
30	Q8BFW3	19	78690	4	R.LPFLR.R
		13			R.QNPGNSALPER.R
		9			R.CQSSAGGGQFVGFR.T
31	Q8BLN6	22	367209	1	K.DSGMLK.Y
		10			R.LNAMCK.F
		11			K.MKRQTSQVETVPAAR.E
32	P70270	26	85724	4	K.RAGVRR.A
		16			R.SLAPSQLARR.K
33	Q7TP36	24	159602	1	K.QELIDSISR.K
		16			R.QEVETPHR.A
34	Q8C3S2	20	120368	2	K.LKALR.D
		12			K.DKHTPETR.M
		6			R.DRTEFGAVVQDVVR.L
35	Q05A36	20	69215		K.IKALR.A
		18			R.EEIEMHAMR.T
36	Q5I0E6	19	68705	3	R.ASSTHR.V
		18			K.FFEAQIPKTPVWVR.E
37	Q99JP6	20	39727	3	R.LAGALR.E

		17			R.AEAELLR.Q
38	Q9R0G7	42	138012	1	K.CIGLISVNGRMR.N
39	Q5T006	36	11360	7	K.VFLENVIR.D
40	P41438	24	58911	4	K.LVIAGVIAIQASLVFCMFQIR.D
41	P04443	23	16431	6	R.LLIVYPWTQR.F
42	Q8BZE1	20	16431	6	R.LLIVYPWTQR.F
43	Q6V3W6	19	92684	3	R.ESEERPMCRLAGSSGQCSGR.V
44	P48754	20	104343	1	R.FSRNPEKPADEDVAER.L
		11	201750	2	K.SPLAGSR.G
45	P10719	22			R.NRVRR.L
		15	56318	3	-MLSLVGR.V
46	Q9ES34	19			R.TAPAGVHPAR.D
		16	124109	1	R.NMVIKEK.E
47	Q3TL54	20			R.QLSQHAMKGVIR.V
		11	53118	7	R.SKLAAKLDMPQGMIPR.L
48	Q8BKE6	22			R.LHAHSIPGLTARLNSFR.V
		12	52458	5	K.RLRLAVDR.Q
49	Q6ZQ18	29			K.QYQEALMQLESTLKK.I
50	Q9R0N5	19	93374	1	R.LTQIMLLK.S
		10	43388	4	K.NEAIGR.V
51	Q8CGE9	23			R.MCVMAVYDFDR.F
52	E9Q6X9	26	151254	2	K.KSSKLGR.G
		19	74799	1	K.LNDSNGR.R
		10			R.SRSPR.K
53	Q91YR5	22			R.MCNLWQKNNVFK.S
54	O88853	25	79391	2	R.MLAEVGR.V
55	Q99M80	25	41078	5	R.TLCFLWAAVGPAGAAAAEAR.R
56	Q8C8N3	25	164677	1	R.LRLLLSNPEGR.M
57	Q9D5U0	25	37013	3	K.REHASRDSPGR.V
58	Q7TMM9	25	58800	1	R.QLFSLFDR.N
59	O08672	25	50274	4	K.GHYTEGAELVDSMCDVVR.K
60	Q80VJ2	24	86488	1	R.LRLGVGVTDSEKR.V
					R.SLMVDHVTEVSQWMVGVKRLIAEK
61	P70106	24	25769	10	.K
62	Q8CEF9	24	124124	1	R.IGVHSGPCAAGVVGIKIPR.Y
					R.MCVGREVGMTTIQMCSPLSDSILA
63	Q91ZH7	22	122100	2	EK.T
64	O54762	22	46772	3	K.HRHMFEQIDMDQVMK.A
65	Q9WTR2	24	46167	1	K.SPLFVGR.V
66	O88879	23	144675	1	R.GRSSPAVTGR.G
67	Q9Z277	19	143251	1	K.AETGEKLLDIK.A
			172197	1	K.EKMLKVK.I
68	Q8CIS0	25			
69	Q6AYU0	25	135325	1	R.NLTLIPYSLVR.A
70	O88940	22	47462	2	K.TEKIYPEPRR.N
71	Q9D0R4	22	21696	5	R.GLQRVYPAPASK.R
72	P08911	22	61573	2	K.KATGPVMEQAVR.G
73	Q8K5B8	21	61010	1	R.STSTTGK.T
74	Q04888	19	30611	4	R.EPCAEGGGGGLKR.E
75	Q812E4	19	50089	1	K.SAHLDR.H
76	Q9DCT1	19	84392	1	R.SVTSISSR.E
77	O08850	19	34781	1	K.LAINLGYR.H
78	Q8K4F8	19	21243	4	K.SPIKMAEK.A
79	Q00285	28	88616	1	R.RLVPRYK.L
80	Q99P31	21	26030	4	K.MKMYSEFLGK.R
81	Q62028	21	39883	2	R.GQREEVEQMK.N
82	Q06180	21	173596	1	K.VFHSEKCMK.R
83	Q3ZT31	21	47786	2	K.ATTAQKVQQMK.Q

84	Q5F289	19	97826	1	K.TDLLRARNMK.R
85	Q3U308	19	35496	2	K.ETSTSLGK.L
86	Q9NQR8	19	57209	1	K.FRAMLGK.N
87	Q8C6D4	19	20146	4	-.MGARMTR.A
88	Q2PFD7	21	48596	1	K.YILDNGK.V
89	Q35090	63	115335	1	K.LEWAVDDEEK.K
		23	70892	26	K.LDALK.E
		18			K.SEIAHR.Y
		7			K.LATDLTK.V
		32			K.LVAESQK.A
		5			R.YKDLGEK.Y
		8			R.VCLLHEK.T
		18			K.KYEATLEK.C
		7			K.TPVSEQVTK.C
		10			K.SLHTLFGDK.L
		19			K.SNCELYEK.L
		4			K.CCSGSLVER.R
		12			K.EACFSTEGPK.L
		9			R.EVTDFAFNCAK.D
		8			K.DDNPQLPPFKR.A
		51			K.YMCENQASISSK.L
		28			K.KAPQVSTPTLVEAAR.S
		13			K.YTAMCTECCAADDK.G
90	P00347	23			K.QEDKEACFSTEGPK.L
91	Q922S8	23	98557	1	K.TGDAMGMNMISK.G
		9	81890	1	R.LSSDLTR.E
92	Q8VHE6	20			R.EVIKALR.L
		13	531156	1	K.IDIQR.N
93	Q60649	23			K.LAVDGTIIMSENLR.D
		7	76355	2	R.GVVTGDR.G
94	Q63374	28			K.SPSLQSR.G
95	P26039	23	187162	1	R.ESADTLR.L
96	Q9QZS8	23	271820	1	R.DVAGGLR.S
97	P97686	19	94891	1	K.LSSTDLR.S
98	Q99MU0	21	134683	1	K.TMPKKKPLSAGR.A
99	Q9ESN6	19	76829	2	K.VFYLDLPSVTISEK.L
100	O89084	19	82420	2	K.IGSGKLMGPKGVSVDNR.N
101	Q9DBY4	19	94126	1	R.KMVIDMCMCATDMSK.H
102	P98078	21	89724	1	R.DHCAGLVTLP EAGGR.G
103	Q8BSP1	19	82432	2	M.SNEVETSTTNGQPQQAAPK.A
104	Q3UP38	26	60130	1	K.TGHIIAVK.Q
105	Q80Z60	25	36045	3	K.GFIARTDMQR.L
106	Q80YD1	22	100442	1	R.IEKLGA KPLRDLIDK.I
107	Q9WU50	21	87620	1	M.SLPRCALLWAR.L
108	Q9DAI6	25	838425	1	K.TLQEGYNLLFSESLK.Q
109	Q8QZX2	20	156796	1	-.MSEVQGTVEFSVELHK.F
110	P14668	19	66837	2	K.EYAQLLNMPVVK.G
111	Q01405	19	35779	3	R.DLVNDMK.S
112	Q9JLN5	19	87019	1	K.DDPNSFR.F
113	P54843	19	64213	1	K.LILSEDR.R
114	P49290	19	38583	1	K.EPVETDR.I
115	P97440	19	82241	1	R.RARDGDR.F
116	Q8BFS9	19	31868	2	R.RADGRDR.K
117	Q80Z60	19	70450	1	R.NLGRDDR.V
118	O09159	19	100442	1	K.ILES LDR.G
119	Q6IE24	19	115146	1	R.LLVDDDR.G
120	Q7TSG1	19	178212	1	K.ARS LQDR.M
121	B0V2N1	19	113250	1	R.IISE LDR.Q
122	Q9JLC8	19	212968	1	R.FAAPAHK.G
123	Q921L3	19	525942	1	K.SVISAHK.N

124	P0C6C0	19	35300	1	K.THVGVVHR.I
125	Q921L3	19	186844	1	R.MPSMKTER.S

Neste grupo experimental foram encontradas 125 proteínas, que podem ser verificadas na **figura 10**, no qual é indicado o percentual de cada função detectada das proteínas encontradas.

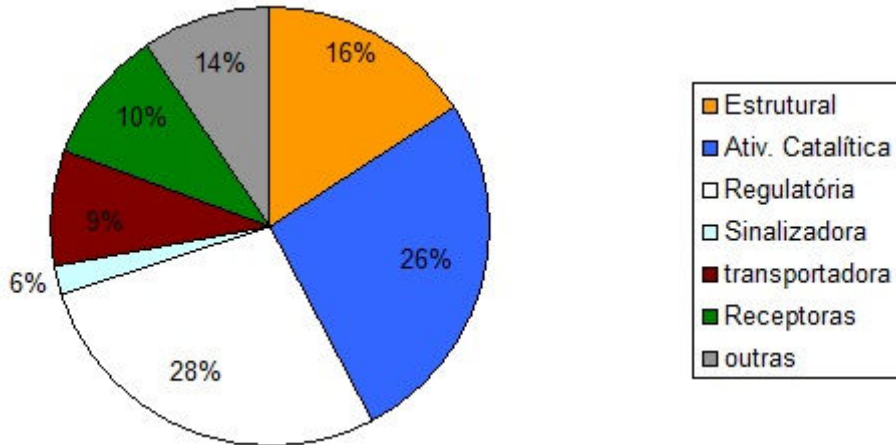


Figura 10: Gráfico de setores das proteínas identificadas da amostra FC e classificadas de acordo com a sua função molecular.

De acordo com os resultados encontrados, verificou-se que MC e FC tem um perfil muito similar, a distribuição das proteínas entre suas funções seguiu padrão parecido.

Assim como na MC, na próstata da fêmea controle pode se verificar que esta glândula também tem como função importante na sua atividade catalítica com presença de muitas enzimas é bem estrutura bem desenvolvida.

Proteínas da próstata ds Femea Tratada (FT)

Da mesma maneira seguiu-se a identificação das proteínas do grupo FT, as proteínas identificadas estão na tabela abaixo. No anexo 4 também é possível ver a relação de nomes de cada proteína com seu respectivo código de acesso.

Quadro 3. Proteínas identificadas da próstata femina do grupo tratado, organizadas com seus respectivos códigos de acesso aos bancos de dados, “íon score”, peso molecular, porcentagem de cobertura e o peptídeo que foi dado o “match”. As linhas mais escuras representam a proteína identificada pelo peptídeo, caso tenha encontrado mais de um peptídeo da mesma proteína, este está representado com a linha mais clara.

	Código de Acesso	íon Score	MW (Da)	Cobertura (%)	Peptídeo encontrado
1	O08638	19	227743	9	R.WILSR.V
		8			K.FLFVDK.N
		12			K.FVADLWK.D
		11			R.IVGLDQMAK.M
		22			K.ALELDPNLYR.I
		39			R.TGMCAHLEEEER.D
		17			K.VDYNASAWLTK.N
		16			K.EQADFAIEALAK.A
		36			K.LDAFLMCEQLR.C
		6			K.LDAFLMCEQLR.C
		20			K.VVSSMCQLGNIVFK.K
		48			K.IAQLEEQVEQEAR.E
		31			K.VCHLVGINVDFTR.A
		36			K.QLLQANPILEAFGNAK.T
		9			K.KQELEEILHEMEAR.L
		36			K.SLEADLMQLQEDLAAAER.A
		25			K.SLEADLMQLQEDLAAAER.A
		20			K.SLEADLMQLQEDLAAAER.A
		17			R.KQADLEKEELAEELASSLSGR.N
2	P62737	11	42381	16	R.DLTDYLMK.I
		11			K.EITALAPSTMK.I
		14			R.AVFPSIVGRPR.H
		56			K.SYELPDGQVITIGNER.F
		31			R.VAPEEHPTLLTEAPLNPK.A
3	P31001	39	53522	16	R.DNLIDDLQR.L
		17			R.EYQDLLNVK.M
		16			R.IESLNEEIAFLK.K
		15			R.RIESLNEEIAFLK.K
		38			R.TFGGAPGFSLGSPLSSPVFPR.A
		13			R.APSYGAGELLDFSLADAVNQEFATR.T
4	P02301	45	15363	5	K.STELLIR.K
5	Q5T006	40	11360	17	K.VFLENVIR.D
		25			R.ISGLIYEETR.G
6	Q80ZD8	32	56106	2	K.LMLLDLSSNKLKK.L
7	Q8C854	32	63482	5	R.NLPFDLTWQKLE
		7			R.GAMTSSMERDFGRGDIGLSR.G
8	Q3T1J2	32	59704	2	K.NTEENAPSWAKK.F
9	Q8VDC1	29	164060	1	K.SGELMIK.L
10	P58771	26	32718	7	R.IQLVEEELDR.A
		21			R.KLVIIESDLER.A
11	Q8JZV7	24	43930	2	K.RGAHPEAYLR.S
12	B3EWE0	24	15916	15	R.LLLVYPWTQR.F
		14			K.GTFASLSELHCDK.L
13	P10719	29	56318	5	-.MLSLVGR.V
		18			R.TAPAGVHPAR.D
		17			R.VALTGLTVAEYFR.D
14	Q9CQ19	18	19898	34	K.GNFNYVEFTR.I
		27			R.FTDEEVDEMYR.E

15	Q3TIX9	15	65505	6	K.NGRVDSSEDRR.S
		17			K.RPPGDIMFLLVQR.F
		21			R.EKEPEAASSRGSPVR.V
16	Q8VDR9	31	235173	1	K.LEKLR.L
		13			R.KLRFPGR.F
		11			R.SSGASGIFSLR.N
17	Q62835	31	62221	3	R.LEQIR.Q
		9			K.QMQMCLAQVQNSEQLLR.T
18	Q8BWG4	23	130318	1	K.CLSSDLR.E
		16			K.SQETRPR.T
19	Q6MG64	31	96613	2	R.LEGALR.E
20	Q4V8A1	31	59039	3	R.QLFSLFDR.N
21	Q64475	19	13944	19	R.LLLPGELAK.H
		17			K.AMGIMNSFVNDIFER.I
22	D3Z3C6	23	84586	6	K.QVTFLVYR.E
23	Q8C0X0	19	83132	2	R.HDMGK.H
		20			R.GKGNIAHKEK.S
24	Q08091	31	33506	3	R.EWIEGVTGR.R
25	Q3UR50	30	135440	1	R.GLFLLLR.H
26	Q91YR5	29	79391	1	R.MLAEVGR.V
27	Q8BL80	26	78308	4	R.EDAERR.N
28	P16086	21	285261	1	R.DALLSR.R
		12			K.LLEATELKGVK.L
29	Q7TNG5	20	71602	2	R.TVAEGR.G
		17			R.DGTLVSGGGRDR.R
30	O35936	20	76752	2	R.TGLWR.S
		12			K.AHSAYTELK.V
31	Q91VE0	25	73128	2	-.MLLGASLVGALLFSK.L
32	Q9D071	24	114670	2	R.FFTDNVPALVQGFHAAPQDVKPNYLK.G
33	Q9JKS6	25	554201	1	K.SHSSPGSSKSSSEGLR.S
34	A2ASS6	14	3933362	1	K.KEKHAVR.W
		19			K.VPVPPIPKK.E
		5			K.LLAGITVKAGTK.I
35	Q9D4K7	23	57781	1	K.LNRPLVR.M
36	P97393	21	173544	1	R.STNLQPYIK.R
37	Q61716	19	21989	4	K.AQAIPMCR.D
38	Q9CQN1	19	80501	1	R.APALAGVRR.G
39	Q04888	30	50089	1	K.SAHLDR.H
40	Q91XW8	26	37671	2	R.ALLLLHR.R
41	Q3UX43	26	60739	2	K.HFNKLREFVQMK.L
42	Q11136	25	55962	3	K.EYEMESLFQHYCYSR.G
43	Q80MC3	23	72020	1	R.ENLGRATVR.I
44	Q8VE38	22	35161	2	R.HSADLHR.D
45	Q9WU50	21	838425	1	K.TLQEGYNLLFSESLK.Q
46	O70145	21	59904	1	R.LQLSPGHKQK.E
47	O35437	19	19840	3	R.LCGTTAS.-
48	Q60644	19	50372	1	K.MLGHELCR.V
49	Q922Q1	19	38797	2	K.EDGHMVTAR.Q
50	Q3U095	26	64496	2	K.NLSIVVSLCNNKTNK.K
51	F8VQB6	20	238999	2	R.KHCYR.L
		7			K.AAIVFQK.Q
52	Q91ZV3	22	84520	1	R.AALPSAGCCPLPPGR.N
53	Q8CBH5	19	86876	1	R.KTGMLAK.D
54	Q9ERU9	19	344727	1	K.HVVFQVFK.D
55	P12269	24	56311	4	R.TSSAQVEGGVHLSHSYEKRLF.-
56	Q4U4S6	20	431301	1	R.LAILK.S
57	P11531	21	427676	1	R.VMVGLEDINEMIIKQK.A
58	Q61625	20	113922	1	R.KLGCWNPVTGLNGLSLTDKK.L
59	Q80TH2	20	158063	1	K.ATSDDSRQLDHINMNINK.L
60	O08638	19	227743	1	R.DLGEELEALKTELEDTLSTATQQLR.A

61	Q9Z1Q9	21	141439	1	R.CGEMAQAASAAVTR.G
62	Q3UHU5	20	215328	1	R.TWSDEKNLLQQELRSLK.Q

Os resultados da análise do grupo FT, mostraram 62 proteínas identificadas e como mostrado na **figura 11**, segue proporção similar entre as proteínas identificadas e suas respectivas funções moleculares, a distribuição das funções proteicas seguiu um padrão similar de distribuição.

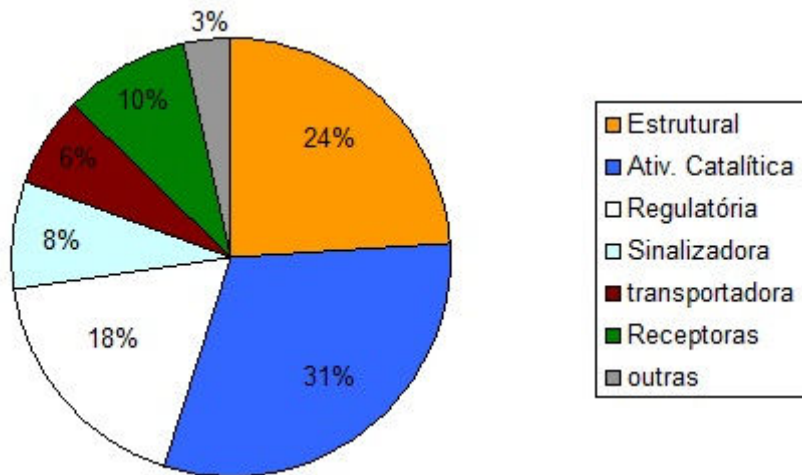


Figura 11: Gráfico de setores das proteínas identificadas da amostra FT e classificadas de acordo com a sua função molecular.

Uma análise das proteínas identificadas em todos os grupos foi realizada utilizando o diagrama de Venn, figura 12. Os resultados mostram através desse diagrama que entre os grupos MC e FC existem 44 proteínas que coexistem em ambos os grupos ($MC \cap FC$), entre os grupos MC e FT, há 37 proteínas ($MC \cap FT$), entre as próstatas da fêmea FC e FT temos 28 proteínas em comum ($FC \cap FT$). Já as proteínas que coexistem em todos os grupos são no total de 27 ($MC \cap FC \cap FT$). As proteínas que coexistem entre os grupos, são proteínas que tem em sua maioria função estruturais, atividade catalítica e regulatórias.

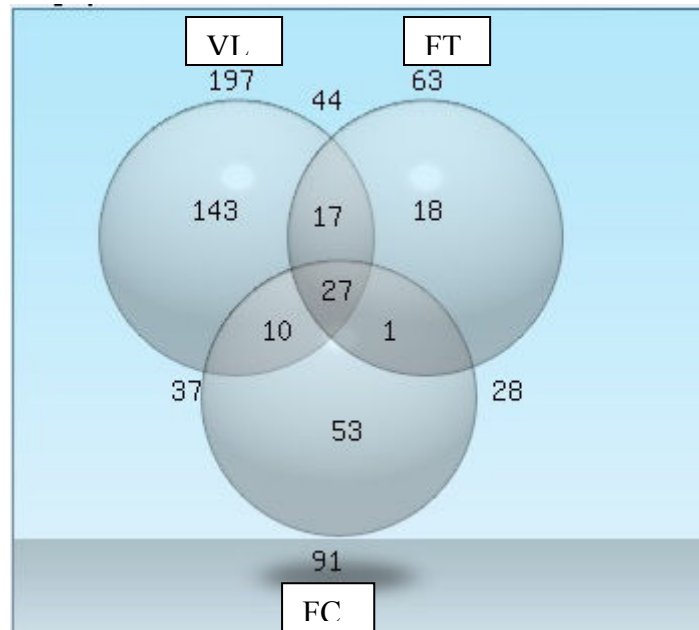


Figura 12. Diagrama de Venn no qual mostra as proteínas totais identificadas em cada grupo e as proteínas que coexistem entre os grupos.

Os resultados da **figura 13** mostram que todas as proteínas em suas respectivas funções seguem uma mesma proporção em sua relação proteína por função, uma expressão maior de proteínas na próstata do macho, e destacando as proteínas que exercem atividade catalítica regulatória e estrutural, já que estas aparecem com maior frequência entre as proteínas identificadas. E também visto no **quadro 3**, e na **figura 13** no grupo FT houve uma redução de quase um terço das proteínas identificadas. Análise comparativa entre os grupos mostra uma diferença de 3% entre MC e FT e de 5% de MC e FC e entre os FC e FT houve uma diferença de 8% da variação entre as proteínas estruturais, já entre as proteínas de atividade catalítica, os resultados mostraram uma diferença de 4% entre MC e FT, 1% entre MC e FC e houve uma diferença de 5% entre FC e FT. Das proteínas regulatórias essas diferenças ocorreram entre os grupos foram de 2% entre MC e FT, 8% entre MC e FC, e entre FC e FT houve 10% de diferença. As proteínas sinalisadoras, receptoras e transportadoras não houve variações significativas de suas porcentagens. Proteínas com outras funções tiveram diferenças de 6% entre MC e FT e de 5% entre MC e FC e entre FC e FT 11%.

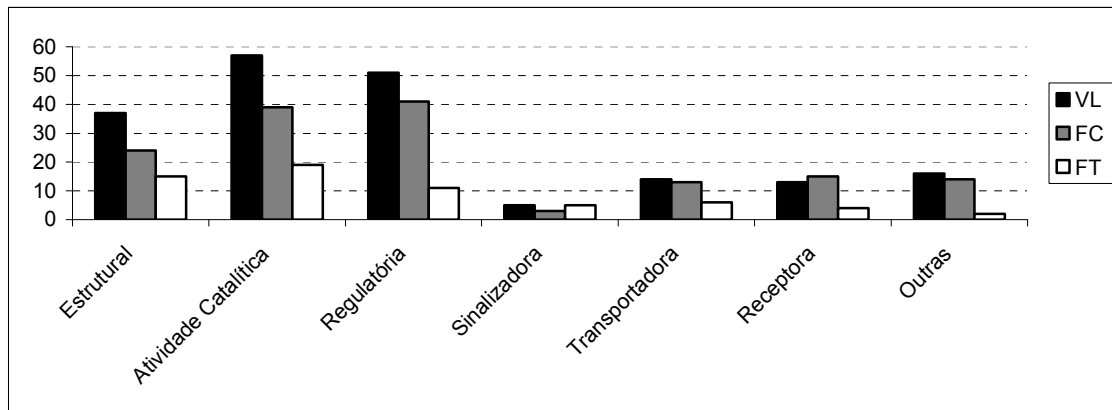


Figura 13: Gráfico de barras comparando a quantidade de proteínas identificadas de cada grupo experimental de acordo com sua função molecular

Pelo código de acesso de cada proteína diferente entre os grupos, buscou-se as interações entre as proteínas diferentes pela ferramenta de bioinformática *String*. Das proteínas diferentes entre os grupos FT e FC observou-se na **figura 14** três núcleos de proteínas que interagem são eles: primeiro núcleo formado pelas proteínas, interferon alfa, tirosina quinase, Janus quinase, transdutor e ativador de transcrição de sinal, essas Proteínas estão envolvidas nas atividades antivirais, e na ativação da Proteína interferon. O segundo núcleo de interação observa-se as proteínas, citocromo b-245, alfa polipeptídeo; citocromo b-245, polipeptídeo beta; fator citosólico neutrófilos, neutrófilo fator citosólico 2; fator citosólico neutrófilos, formando um complexo oxidativo, feito pela membrana fazendo trocas de elétrons por oxigênio, mediados por prótons.

Terceiro complexo formado entre as proteínas, subfamília nuclear receptor 0, grupo B, membro 2; subfamília nuclear receptor 1, grupo H, membro 2; cassete ligação a, sub-família A (ABC1), membro 1 esse núcleo está envolvido com a manutenção da membrana como por exemplo o transporte de colesterol para a manutenção da mesma.

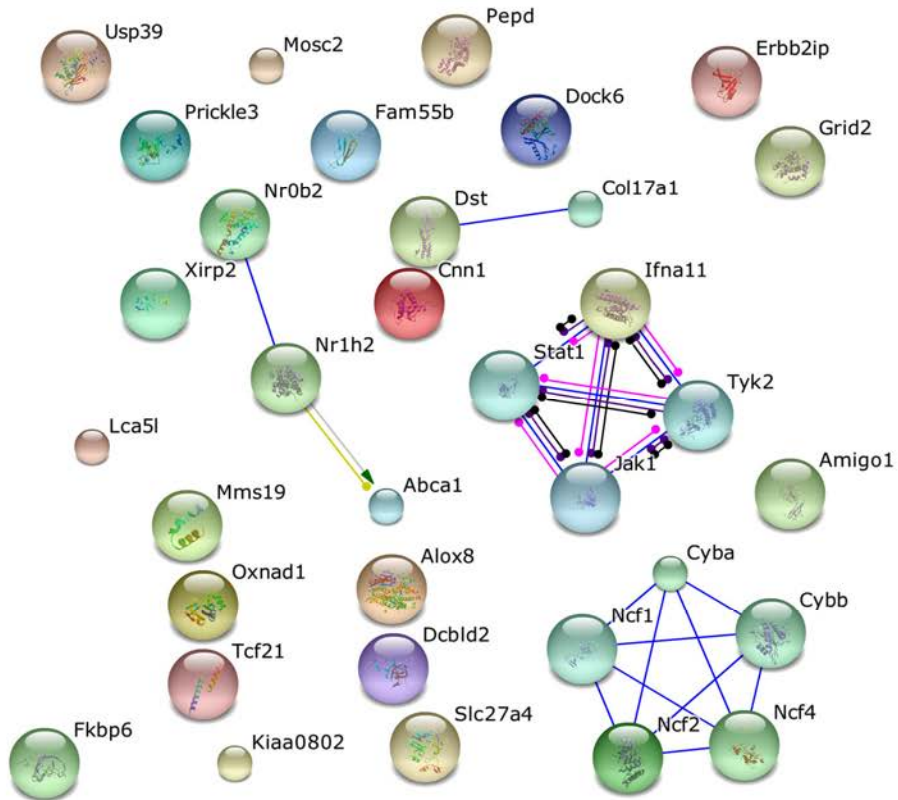


Figura 14: Grafos de interação entre as proteínas dos os grupos FC e FT, obtidos pela ferramenta “String”

Para o grupo de interação FT e VC observaram-se um padrão parecido do descrito anteriormente, com os mesmos núcleos de interações como mostrado na **figura 15**.

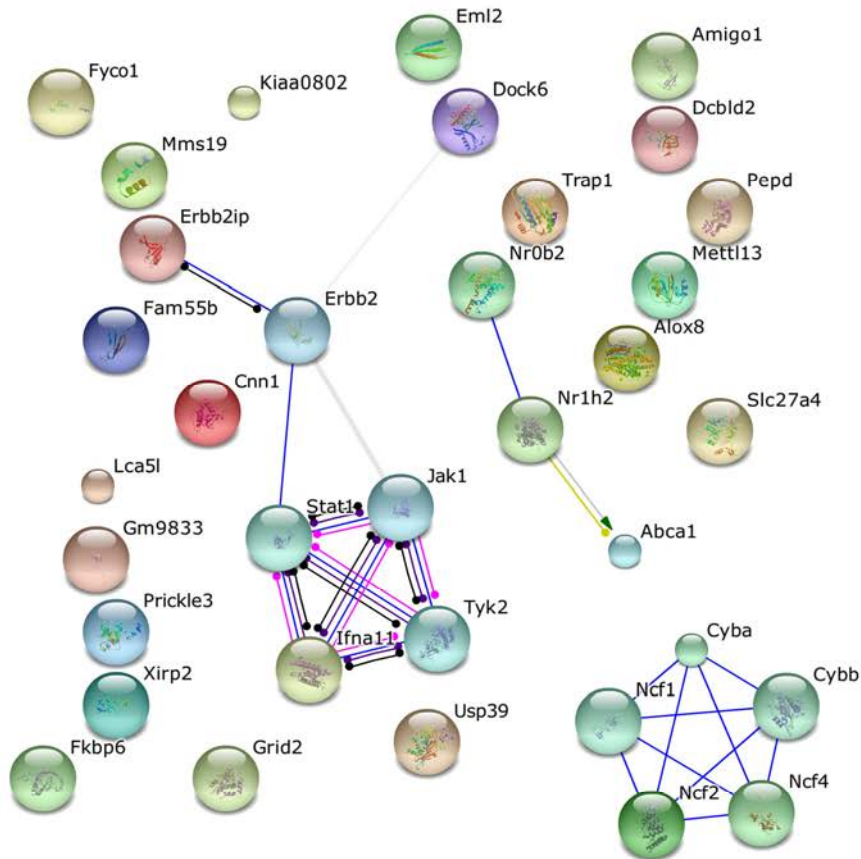


Figura 15: Grafos de interação entre as proteínas dos grupos MC e FT, obtidos pela ferramenta “String”

Já para as interações entre as proteínas FC e MC observaram-se 1 núcleo grande de interação que ocorre entre as proteínas: RAD51 homólogo; Rad54 como (*S. cerevisiae*); manutenção estrutural dos cromossomos 5; ataxia telangiectasia mutado homólogo; caspase 3; caspase 7; transformação relacionada proteína 53 Gene; câncer de mama 2 Gene; câncer de mama 1 Gene; manutenção de cromossomas estrutural 1B; apoptótica factor de ativação de peptidase 1; Leucemia de células B / linfoma 10;

mucosa do tecido linfóide associado ao gene de translocação linfoma; família domínio recrutamento caspase. Essas proteínas estão envolvidas desde a apoptoses das células com algum tipo de disfunção se tornando supressoras tumorais até a manutenção estrutural de cromossomos, pode se verificar que essas associações protéicas estão envolvidas na manutenção e regulação gênica da glândula prostática, como mostrado na **figura 16**.

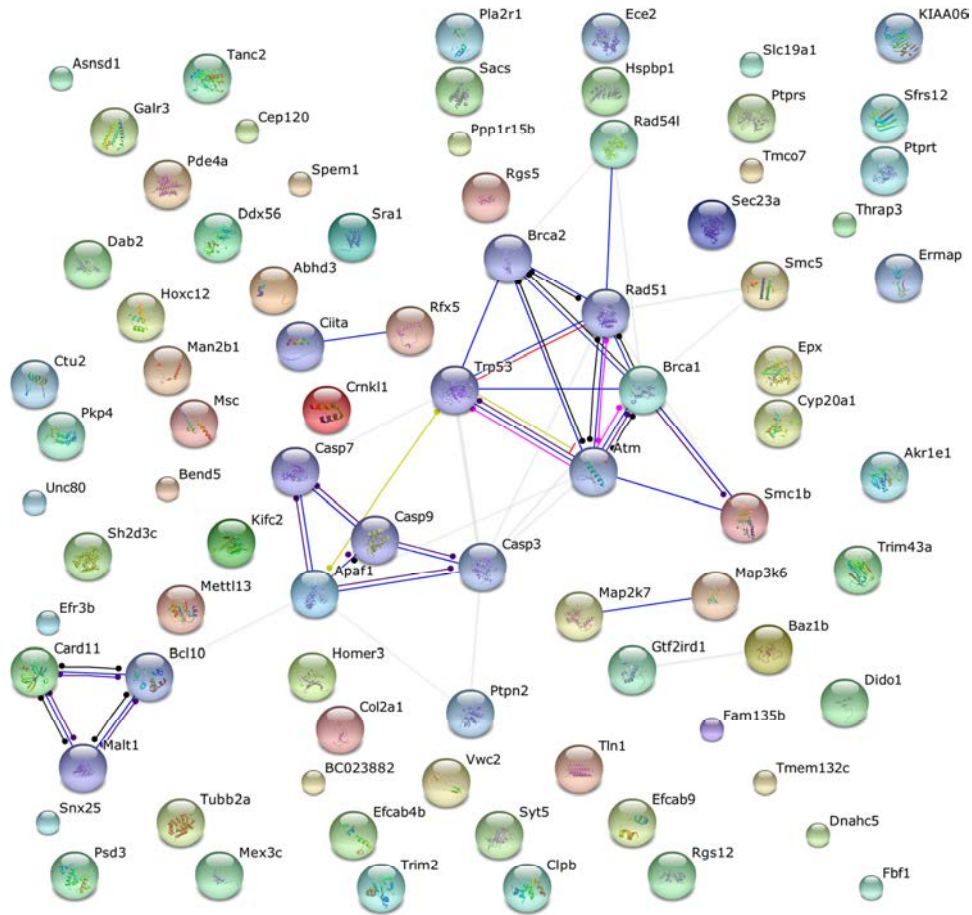


Figura 16: Grafos de interação entre as proteínas dos grupos VC e FC, obtidos pela ferramenta “String”

7. Discussão

A organização histológica da próstata apresenta alvéolos com epitélio simples prismático e altamente secretório imersos, em um estroma com tecido conjuntivo vascularizado, fibras colágenas e elásticas e células musculares lisas bem compactadas dispostas ao redor dos alvéolos, características muito semelhantes às encontradas na próstata masculina humana (CAMPOS ET AL., 2006; ROCHEL ET AL., 2007). Nosso estudo mostra que as proteínas estruturais são bem presentes nas amostras cerca de 19,5%, evidenciando que a próstata, é uma glândula que tem sua estrutura bem organizada, e de acordo com JA TUXHORN et al, 2001, a próstata também apresenta um estroma bem desenvolvido e fibroblastos e células muscular lisa, os quais estão associados a fatores de crescimento e desenvolvimento, moléculas regulatórias e enzimas criando assim um microambiente no estroma prostático.

Os aspectos morfológicos e o funcionamento da glândula prostática dependem da ação de andrógenos, sendo o principal a testosterona (CUNHA ET AL., 2004 E PU ET AL., 2007). A ação desse hormônio ocorre via interação com os receptores de andrógenos, fato que pode ser confirmado pela presença das proteínas sinalizadoras e receptoras principalmente de andrógenos totalizando em média 5,5% sinalizadoras e 9% das proteínas receptoras, de todas as proteínas identificadas.

A análise do perfil das proteínas totais das próstatas masculinas e femininas do gerbilo da Mongólia reforçou também os estudos morfológicos que mostram a similaridade entre o lobo ventral da próstata masculina e a próstata feminina (CUSTÓDIO, et al., 2004; CAMPOS et al., 2006; SANTOS e TABOGA, 2006). Essa similaridade foi determinada pelo padrão de bandas de proteínas semelhantes entre as massas moleculares de 70 KDa e 40KDa, (GARCIA et al, submetido, manuscrito em anexo) sendo essas características marcantes nesses dois grupos experimentais em estudo, pois comparado ao lobos dorsais e dorso lateral esse caráter protéico não foi similar. Neste estudo observou-se que todas as proteínas classificadas de acordo com sua função molecular, proporcionalmente segue o mesmo padrão evidenciando assim mais uma vez essa similaridade. A análise protéica juntamente com os estudos morfológicos da próstata feminina são fatores cruciais para compreender a fisiologia e a função dessa glândula (SANTOS et al 2006).

A próstata é uma glândula que sofre muita diferenciação tecidual durante o desenvolvimento do individuo, devido sua dependência hormonal, e isso pode gerar um

estresse bioquímico no qual a glândula sofre. De acordo com JA TUXHORN et al, 2001 um microambiente é gerado no estroma, no qual muitas proteínas regulatórias, metaloproteases e proteases são encontradas e produzidas nesse microambiente, e estas estão envolvidas em algumas patologias na próstata, assim essas proteínas tem um papel muito importante na fisiologia e na abordagem de alguma patologia na próstata, incluindo a tumorigenese. Segundo JA TUXHORN et al, 2001, está bem estabelecido que além da atividade catalítica dessas enzimas estarem correlacionada com a coagulação e a liquefação do semê, para a mobilidade e nutrição dos espermatozoides, um aumento elevado da atividade catalítica está fortemente correlacionado com o avanço de algumas patologias, como por exemplo o câncer. O desequilíbrio entre essas proteases e seus inibidores específicos, podem acarretar alguma disfunção na glândula. Como mostrado nas figuras 9,10,11 e 13, em média as amostras contem 29% de proteínas com atividade enzimática, tornando essa função muito importante para essa glândula.

Como visto no grupo FT, houve uma redução de praticamente um terço das proteínas totais identificadas, isso pode estar correlacionado com o retorno negativo com o eixo hipotálamo-hipófese-gonadal, na qual atua na célula alvo controlando a produção de andrógenos como a testosterona, como no grupo tratado já estava sendo ministrada a testosterona este eixo detectou esse aumento e pode ter dado o retorno negativo nas células prostática, impedindo assim sua produção, logo proteínas que talvez possam ter sua expressão intermediada por esse hormônio, não foram sintetizada, causando assim o efeito negativo (HILL RW et al, 2012).

Pela figura 14 observou-se os três núcleos de interação entre os grupos FT e FC sendo que o primeiro está envolvido com as atividades antivirais e antimicrobianas, pois há a ativação do interferons, já no seu segundo núcleo foi evidenciado um complexo oxidativo, que através das membranas fazem trocas de elétrons por oxigênio, com intermédio de prótons. O último núcleo de interação está envolvido na manutenção da membrana celular. Observando a figura 15 na qual mostra as proteínas que interagem entre os grupos FT e VC, verificou-se que há os núcleos de interação são os mesmos. Observou-se na figura 16 que mostra as interações entre os grupos FC e VC, um nucleo grande no qual as proteínas que tem interações estão envolvidas desde a apoptoses se tornando supressoras tumorais até a manutenção estrutural de cromossomos, pode se verificar que essas associações protéicas estão envolvidas na manutenção e regulação gênica da glândula prostática com atividades antitumorais.

8. Conclusões Parciais.

Nesse trabalho pode-se concluir que as proteínas encontradas na próstata masculina e feminina de gerbilos tem suas funções entre estruturais, de atividade catalítica e regulatória, mais predominantes entre as funções identificadas. Observou-se também proteínas identificadas com funções entre, sinalizadoras, receptoras e transportadoras. Pelos resultados, pode-se verificar que a variação entre essas funções moleculares identificadas são muito baixa e que sua distribuição entre proteínas e funções segue um mesmo padrão entre a próstata masculina e feminina, como já visto na histologia.

Perspectivas

Os próximos estudos realizados serão as análises de mais três grupos, parte ventral da próstata de gerbilos castrado e tratado e a próstata da fêmeas castradas, todos os experimentos para a identificação das proteínas estão sendo realizados da mesma maneira e esses dados serão muito importante para concluir a discussão final sobre o estudo, e assim assim, procurar entender as disfunções que ocorrem na próstata, considerando que a proteômica é uma ferramenta importante para o entendimento do conteúdo proteico discriminatório, pois com as análises desta adquirem-se informações em nível molecular da variabilidade genética que é efetivamente expressa do genoma.

13. Referencias Bibliograficas

AEBERSOLD R, GOODLETT DR, Mass Spectrometry in Proteomimcs. *Chem. Rev.* 2001, 101, 269-295.

BURLINGAME AL, BOYD RK. GASKELL SJ, **Mass Spectrometry Review Analytical Chemistry**, Vol. 70, No. 16, August 15, 1998

AUMÜLLER G AND SEIZ MM. 1990. **Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands.** *Int Rev Cytol* 121: 127-231.

BIANCARDI MF, SANTOS FC, MADI-RAVAZZI L, GÓES RM, VILAMAIOR PS, FELISBINO SL, TABOGA SR. 2010. **Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype.** *Anat Rec* 293(12): 2163-75.

BURLINGAME, A.L.; BOYD, R.K.; GASKELL, S.J. **Mass spectrometry.** *Anal. Chem.* V. 68: 599R-651R, 1996.

CAMPOS SGP, ZANETONI C, GÓES R, TABOGA SR. 2006. **Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development.** *Anat Rec* 288: 723-733

CAMPOS SGP, ZANETONI C, SCARANO WR, PATRÍCIA SIMONE LEITE VILAMAIOR PSL, TABOGA SR. 2008. **Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders.** *Int. J. Exp. Path.* 89: 13–24

CORDEIRO RS, SCARANO WR , CAMPOS SGP, SANTOS FCA, . VILAMAIOR PSL, GÓES R M, TABOGA SR. 2008. **Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage.** *Micron* 39:1312–1324

COX MM, NELSO DL. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Terceira edição, pagina 103. 2002

CUNHA GR, RICKE W, THOMSON A, MARKER PC, RISBRIDGER G, HAYWARD SW, WANG YZ, DONJACOUR AA, KURITA T. 2004. **Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development**. J Steroid Biochem Mol Biol 92: 221–236

CUSTÓDIO AMG, GÓES RM, TABOGA SR. 2004. **Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development**. Cell Biol Int. 28:335-344

CUSTÓDIO AMG, SANTOS FCA, CAMPOS SGP, VILAMAIOR PSL, GÓES, RM AND TABOGA, SR 2008. **Aging Effects on the Mongolian Gerbil Female Prostate (Skene's Paraurethral Glands): Structural, Ultrastructural, Quantitative, and Hormonal Evaluations**. Anat Rec 291:463–474

CUSTÓDIO AMG, SANTOS FCA, CAMPOS SGP, VILAMAIOR PSL, OLIVEIRA SM, GÓES, RM AND TABOGA, SR. 2010. **Disorders related with ageing in the gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands)**. Int. J. Exp. Path. 91: 132-143.

DOS SANTOS FCA, CARVALHO HF, GÓES RM, TABOGA SR. 2003. **Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate**. Tissue Cell 35:447-457

ELLEM SJ AND RISBRINDGER GP. 2009. **The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate**. J Steroid Biochem Mol Biol. 118: 246-251.

FLAMINI MA, BARBEITO CG, GIMENO EJ, PORTIANSKY EL. 2002. **Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus***. Ann Anat. 184:341-345

FOCHI RA, PEREZ APS, BIANCHI CV, ROCHEL SS, GÓES RM, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, SANTOS FCA. 2008. **Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene paraurethral glands).** Biol Reprod. 79(6):1084-91.

GALBRAITH SM, DUCHESNE GM. 1997. **Androgens and prostate cancer: Biology, pathology, and hormonal therapy.** European Journal of Cancer, 33(4): 545-554.

GÓES, RM. 2007. **Biologia da Reprodução do gerbilo da Mongólia e de outros roedores. contribuição dos estudos morfofisiológicos em próstata e testículo.** Livro docência

GROSS SA E DIDIO LJA. 1987. **Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy.** J. Submicrosc Cytol. 19 (1): 77-84

GOULART VAM, RESENDE RR. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do cancer. Nanocell News Vol. 1, N. 3, 21 de novembro de 2013

HARRIS DC. 2005 **Análise Química Quantitativa** LTC editora, sexta edição, pag. 508-510

HILL RW. **Fisiologia animal**, Porto Alegre: Artmed. 2012

ISAACS JT, FURUYA Y, BERGES R. 1994. **The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue.** Semi Cancer Biol. 5:391-400.

MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. 2003. **Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development.** Dev Biol. 253:165-174.

MOTOYAMA, A.; YATES III, J.R. 2008. **Multidimensional LC separations in shotgun proteomics.** *Analytical Chemistry*, v.80, n.19, p.7187-7193,

MATTICK JS. **Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms.** ARC Special Research Centre for Functional and Applied Genomics, Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, St. Lucia QLD 4072, Australia 2003.

MOXON JV, ET AL. **Proteomic analysis of intra-arterial thrombus secretions reveals a negative association of clusterin and thrombospondin-1 with abdominal aortic aneurysm.** *Atherosclerosis* (2011), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.08.013

NISHINO N AND TOTSUKAWA K. 1996. **Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*).** *Exp. Anim.* 45:283-288.

OHKMAE K. PARK. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 37, No. 1, January 2004, pp. 133-138

PALAPATTU GS, SUTCLIFFE S, BASTIAN PJ, PLATZ EA, DE MARZO AM, ISAACS WB, NELSON WG. 2005. **Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights** *Carcinogenesis*. 26: 1170-1181.

PARTHA P. BANERJEE, SUBHADRA BANERJEE, RENEE DORSEY, BARRY R. ZIRKIN, AND TERRY R. BROWN, 1994, **Age- and Lobe-Specific Responses of the Brown Norway Rat Prostate to Androgen, biology of reproduction** 51, 675-684 (1994)

PENNINGTON, SR; DUNN. MJ. **Proteomics: from protein sequence to function.** New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Plubishers, 2001. 1v.

PEREZ AP; BIANCARDI MF; DOS SANTOS FCA; GÓES RM; TABOGA SR. 2011. **Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils.** Inter J Exp Path. 92(2):121-30.

PEREZ APS, BIANCARDI MF, VILAMAIOR PSL, GÓES RM, SANTOS FCA, TABOGA SR. 2012. **Microscopic Comparative Study of the Exposure Effects of Testosterone Cypionate and Ethinylestradiol During Prenatal Life on the Prostatic Tissue of Adult Gerbils.** Microsc Res Tech. 75(8):1084-92.

PETERSON, G.L. **A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.** Anal Biochem. v.83, p.346-356, 1977.

PRICE D. 1963. **Comparative aspects of development and structure in the prostate.** Natl Cancer Inst Monogr. 12:1-27.

PU Y, HUANG L, BIRCH L, PRINS GS. 2007. **Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: *Fgf10*-dependent and –independent pathways.** **Endocrinology** 148(4):1697–1706

ROCHEL SS, BRUNI-CARDOSO A, TABOGA SR, VILAMAIOR PSL, GÓES RM. 2007. **Lobe Identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: A new rodent model for prostate study.** Anat Rec 290:1233–1247.

SANTOS FCA, LEITE RP, CUSTÓDIO AMG, CARVALHO KP, MONTEIRO-LEAL LH, SANTOS AB, GÓES RM, CARVALHO HF, TABOGA SR. 2006. **Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*).** Biol Reprod. 75:370-379.

SANTOS FCA, AND TABOGA SR. 2006. **Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents.** Anim Reprod, 3:3-18

SCARANO WR, VILAMAIOR PS, TABOGA SR. 2006. **Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil**

(Meriones unguiculatus) prostate. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 288(11): 1190-200.

SILVA RS, SOUZA CRB, 2009. **Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de Piper tuberculatum.** Acta Amazonica.

SHEHATA R. 1975. **Female prostate in Arvicantihis niloticus and Meriones lybicus.** Acta Anat, 92:513-523

SHEHATA R. 1980. **Female prostate and urethral glands in the home rat, Rattus norvegicus.** Acta Anat, 107:286-288

SKENE AJC 1880. **The anatomy and pathology of too important glands of the female urethral.** Am J Obstetr Dis Women Child. 13: 265-270.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**, 5 ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998, 349p.

SMITH AF, LANDON GV, GHANADIAN R, CHISHOLM GD. 1978. **The ultrastructure of the male and female prostate of Praomys (Mastomys) natalensis.** Cell Tissue Res, 190:539-552

STREES W. 2001. **5- α reductase activity in the prostate.** Urology. 58:17-24

TIMMS BG. 1997. **Anatomical perspectives of prostate development. In Prostate: basis and clinical aspects.** CRC Press. Boca Raton NY ed.

TUXHORN JA, AYALA GE, ROWLEY DR. **Reactive stroma in prostate cancer progression.** J Urol. 2001;166:2472–2483

MENDES VA, RESENDE RR. **MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do cancer.** NanoCell News Vol. 1, N. 3, 21 de novembro de 2013.

WASHBURN, M.P. et al. **2001 Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology.** Nature Biotechnology, v.19, p.242-247.

WIGLE DT, TURNER MC, GOMES J, PARENT ME. 2008. **Role of hormonal and other factors in human prostate cancer.** Journal of Toxicology and Environmental Health. 11:242–259

ZAVIAČIČ M. 1999. **The Female Prostate: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate.** 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press. 171p

ZAVIAČIČ M, ZAJÍČKOVÁ M, BLAZEKOVÁ J, DONÁROVÁ L, SVETOSLAV S, MIROSLAV M, ZAVIAČIČ T, HOLOMÁN K, BREZA J. 2000A. **Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview.** J Histotechnol. 23(1): 61-69.

ZAVIAČIČ M, JAKUBOVSKÁ V, BELOŠOVIČ J, BREZA J. 2000B. **Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland).** Anat Embriol (*Berl*), 201(1):51-61

WIGLE DT, TURNER MC, GOMES J, PARENT ME. 2008. **Role of hormonal and other factors in human prostate cancer.** Journal of Toxicology and Environmental Health. 11:242–259

WIEN, K. **100 Years of ion beams: Willy Wien's Canal Rays.** Braz. J. of Phys. V. 29: 401-414, 1999.

YATES JR, 2012. **The Revolution and Evolution of Shotgun proteomics for large-scale Proteome analysis.** Journal of the American Chemical Society.

ZAVIAČIČ M. 1999. **The Female Prostate: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate.** 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovak Academic Press. 171p

ZAVIAČIČ M, ZAJÍČKOVÁ M, BLAZEKOVÁ J, DONÁROVÁ L, SVETOSLAV S, MIROSLAV M, ZAVIAČIČ T, HOLOMÁN K, BREZA J. 2000a. **Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview.** J Histotechnol. 23(1): 61-69.

ZAVIAČIČ M, JAKUBOVSKÁ V, BELOŠOVIČ J, BREZA J. 2000b. **Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland).** Anat Embriol (*Berl*), 201(1):51-61

ZHOMSON, J.J. **Rays of positive electricity and their application to chemical analyses.** London: Longmans, Green and Co., 1913.

9. Apêndice

1 Lista de nomes das proteínas identificadas do grupo MC

1	Q3UZY0	Protein SFI1 homolog
2	P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial
3	P08699	Galectin-3
4	P35601	Replication factor C subunit 1
5	Q04888	Transcription factor SOX-10
6	Q8VCE1	DnaJ homolog subfamily C member 28
7	Q8BSP1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7
8	A6H8H2	DENN domain-containing protein 4C
9	P62737	Actin, aortic smooth muscle
10	P02600	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform
11	P58771	Tropomyosin alpha-1 chain
12	P58774	Tropomyosin beta chain
13	P21107	Tropomyosin alpha-3
14	P09495	Tropomyosin alpha-4 chain
15	Q8R429	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1
16	O55143	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
17	Q6AY26	RAD9, HUS1, RAD1-interacting nuclear orphan protein 1
18	Q9WTM3	Semaphorin-6C
19	Q70FJ1	A-kinase anchor protein 9
20	Q7TMK6	Protein Hook homolog 2
21	Q80U19	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2
22	Q8R399	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6
23	Q8C0M9	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase
24	Q923Q2	StAR-related lipid transfer protein 13
25	Q63374	Neurexin-2
26	Q9R117	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2
27	O70585	Dystrobrevin beta
28	Q9JLC8	Sacsin
29	Q5XH22	Synaptonemal complex central element protein 1
30	Q9DAS4	Prolactin-8A8
31	O35385	Serine/threonine-protein phosphatase with EF-hands 2
32	Q76I78	Protein phosphatase Slingshot homolog 2
33	Q8K394	Inactive phospholipase C-like protein 2
34	P97457	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform
35	P13412	Troponin I, fast skeletal muscle
36	Q8QZY3	Developmental pluripotency-associated protein 3
37	Q8CI33	CWF19-like protein 1
38	P15464	SMH class II histocompatibility antigen, beta-1 chain
39	Q91W27	Tuberoinfundibular peptide of 39 residues
40	Q9CWU6	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1
41	Q0QEP2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (Fragment)
42	P09022	Homeobox protein Hox-A1
43	Q568Z0	T-complex protein 11-like protein
44	Q8CH77	Neuron navigator 1
45	A2RT67	DENN domain-containing protein 3
46	Q60544	Transcription initiation factor TFIID subunit 1

47	Q3UY23	Ferredoxin-fold anticodon-binding domain-containing protein 1 homolog
48	Q6YND2	Zinc finger protein 653
49	Q8CGV9	Teashirt homolog 3
50	P97479	Unconventional myosin-VIIa
51	Q7TPQ3	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH
52	Q9JMH4	Collagen alpha-1(XVII) chain
53	Q62865	cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase A
54	Q8ROW0	Epiplakin
55	P49722	Proteasome subunit alpha type-2
56	O55102	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1
57	P70392	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 2
58	Q8C0V1	Coiled-coil domain-containing protein 79
59	O35348	Acetylcholinesterase collagenic tail peptide
60	P13439	Uridine 5'-monophosphate synthase
61	P70498	Phospholipase D2
62	Q9QWR8	Alpha-N-acetylgalactosaminidase
63	Q7TSP2	Kinesin-like protein KIF15
64	Q5SS80	Dehydrogenase/reductase SDR family member 13
65	P22858	Parathyroid hormone-related protein
66	Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial
67	Q0VGT4	Uncharacterized protein C4orf21 homolog
68	D3Z750	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2A
69	Q8BG32	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1
70	Q5XHX9	Tesmin
71	Q99N92	39S ribosomal protein L27, mitochondrial
72	Q8K2M0	39S ribosomal protein L38, mitochondrial
73	Q9DB30	Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, liver/testis isoform
74	Q8QZR7	Serine/threonine-protein kinase PDIK1L
75	Q91VE0	Long-chain fatty acid transport protein 4
76	Q8CAA7	Glucose 1,6-bisphosphate synthase
77	Q8VC19	5-aminolevulinic acid synthase, nonspecific, mitochondrial
78	O70343	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
79	Q9WVH3	Forkhead box protein O4
80	Q8C4A5	Putative Polycomb group protein ASXL3
81	Q9Z2G9	Oxidoreductase HTATIP2
82	Q61716	Interferon alpha-11
83	Q6LDI9	Collagen alpha-1(II) chain
84	Q9D4K7	Coiled-coil domain-containing protein 105
85	Q8K4L3	Supervillin
86	Q7TNC4	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2
87	P33534	Kappa-type opioid receptor
88	Q8CB62	Centromere protein B
89	Q62137	Tyrosine-protein kinase JAK3
90	Q8BP74	L-seryl-tRNA(Sec) kinase
91	O70372	Telomerase reverse transcriptase
92	Q8BVP1	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIML1
93	Q3V1V3	ESF1 homolog
94	Q149C3	Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain containing-NOGO receptor-interacting protein 4
95	Q69ZH9	Rho GTPase-activating protein 23
96	Q5ND34	WD repeat-containing protein 81
97	Q9WUB9	Macrophage receptor MARCO

98	P21550	Beta-enolase
99	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A
100	P17182	Alpha-enolase
101	O35090	Serum albumin
102	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain
103	P06151	L-lactate dehydrogenase A chain
104	P07310	Creatine kinase M-type
105	E9Q557	Desmoplakin
106	Q7TPS5	C2 domain-containing protein 5
107	Q6Y4S4	Metastasis-suppressor KiSS-1
108	P50309	Glucose-6-phosphate isomerase
109	Q8VHP8	Ras-related protein Rab-40B
110	E9Q414	Apolipoprotein B-100
111	O54898	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G
112	Q9WUB3	Glycogen phosphorylase, muscle form
113	P17244	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
114	P16015	Carbonic anhydrase 3
115	Q8BYH8	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9
116	B7ZNG4	Tastin
117	Q8CB77	Transcription elongation factor B polypeptide 3
118	Q5FMC7	Protein kintoun
119	Q8BHB0	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
120	Q8CIH5	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
121	Q62688	Inactive phospholipase C-like protein 1
122	Q922B6	E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7
123	O88480	Calcineurin-binding protein cabin-1
124	Q91V92	ATP-citrate synthase
125	O70250	Phosphoglycerate mutase 2
126	B3EWE3	Hemoglobin subunit alpha
127	Q9QXJ1	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1
128	P09812	Glycogen phosphorylase, muscle form
129	Q91Y18	Pyruvate kinase PKM
130	Q6AYU0	Uncharacterized protein C12orf50 homolog
131	Q811B3	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12
132	Q80U59	Uncharacterized protein KIAA0232
133	Q99M15	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2
134	P55200	Histone-lysine N-methyltransferase 2A
135	P53657	Pyruvate kinase PKLR
136	D4ACE5	Protein intuned
137	Q3V1H1	Cytoskeleton-associated protein 2
138	P04248	Myoglobin
139	Q640L5	Coiled-coil domain-containing protein 18
140	Q6P4T2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase
141	Q62312	TGF-beta receptor type-2
142	Q6PDK2	Histone-lysine N-methyltransferase 2D
143	Q8CDG3	Deubiquitinating protein VCIP135
144	Q99JT1	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondrial
145	B0BN56	28S ribosomal protein S31, mitochondrial
146	Q62395	Trefoil factor 3
147	Q5F2E7	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2
148	Q8JZR6	Electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1
149	Q8R016	Bleomycin hydrolase

150	Q63068	Phosphorylated adapter RNA export protein
151	P79457	Histone demethylase UTY
152	Q9JLY0	Suppressor of cytokine signaling 6
153	Q14B48	Coiled-coil domain-containing protein 129
154	Q9CQ29	RING finger protein 151
155	P47952	Adenine phosphoribosyltransferase
156	Q9CWV4	Melanoma-associated antigen B16
157	Q8K2B3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
158	P29995	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2
159	Q62009	Periostin
160	Q63625	PHD and RING finger domain-containing protein 1
161	Q8CGZ0	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein
162	Q8K3I9	Glucocorticoid-induced transcript 1 protein
163	A2AG06	Uncharacterized protein C17orf104 homolog
164	Q9CW13	BRCA2 and CDKN1A-interacting protein
165	P25911	Tyrosine-protein kinase Lyn
166	Q68FD5	Clathrin heavy chain 1
167	Q5XI63	Kinesin-like protein KIFC1
168	Q8C0Q2	Zinc fingers and homeoboxes protein 3
169	D3Z750	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2A
170	Q0VET5	Uncharacterized protein C11orf35 homolog
171	P32233	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1
172	Q80WQ8	Mis18-binding protein 1
173	Q8BJM3	Coiled-coil domain-containing protein R3HCC1L
174	P55200	Histone-lysine N-methyltransferase 2A
175	Q9Z129	ATP-dependent DNA helicase Q1
176	Q9WU50	Dystonin
177	Q03238	Granzyme M (Fragment)
178	Q8CG65	SCO-spondin
179	Q8R1Q8	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
180	P32261	Antithrombin-III
181	Q9EQQ0	Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H2
182	P97686	Neuronal cell adhesion molecule
183	Q69Z23	Dynein heavy chain 17, axonema
184	Q811D2	Ankyrin repeat domain-containing protein 26
185	Q6S9C4	Selenoprotein K
186	Q8R0X7	Sphingosine-1-phosphate lyase 1
187	Q61382	TNF receptor-associated factor 4
188	O08742	Platelet glycoprotein V
189	Q8C0I4	Enhancer of polycomb homolog 2
190	Q9QYE5	Protein jagged-2
191	Q9QUJ0	Hematopoietic cell signal transducer
192	Q99NF2	NMDA receptor synaptonuclear signaling and neuronal migration factor
193	Q9D9G0	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1
194	P00676	Ribonuclease pancreatic

10. Apêndice 2. Lista de nomes das proteínas identificadas do grupo FC

1	P02541	Desmin
2	P62737	Actin, aortic smooth muscle
3	P48670	Vimentin (Fragment)
4	O08638	Myosin-11
5	P61161	Actin-related protein 2
6	Q9DAM2	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9
7	Q68FH0	Plakophilin-4
8	P58771	Tropomyosin alpha-1 chain
9	Q91ZU6	Dystonin
10	A2A870	Fas-binding factor
11	Q8R4H2	Rho guanine nucleotide exchange factor 12
12	Q8CG46	Structural maintenance of chromosomes protein 5
13	Q00552	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
14	Q9JL61	DNA-binding protein Rfx5
15	Q920F6	Structural maintenance of chromosomes protein 1B
16	Q0VGK4	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 1
17	P63154	Crooked neck-like protein 1
18	Q8R4X7	General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 1
19	Q6ZQD7	Death-inducer obliterator 1
20	A2ASS6	Titin
21	P02301	Histone H3.3C
22	Q8BZX4	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1
23	Q9QXZ0	Microtubule-actin cross-linking factor 1
24	P30427	Plectin
25	A2A690	Protein TANC2
26	Q8VHE6	Dynein heavy chain 5, axonemal
27	Q8BLB8	Ankyrin repeat domain-containing protein 34C
28	P28481	Collagen alpha-1(I) chain
29	Q569Z6	Thyroid hormone receptor-associated protein 3
30	Q8BFW3	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B
31	Q8BLN6	Protein unc-80 homolog
32	P70270	DNA repair and recombination protein RAD54-like
33	Q7TP36	Protein Shroom2
34	Q8C3S2	Transport and Golgi organization protein 6
35	Q05A36	RNA-binding E3 ubiquitin-protein ligase MEX3C
36	Q5I0E6	RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase Rpap2
37	Q99JP6	Homer protein homolog 3
38	Q9R0G7	Zinc finger E-box-binding homeobox 2
39	Q5T006	Histone H4
40	P41438	Folate transporter 1
41	P04443	Hemoglobin subunit beta-H0
42	Q8BZE1	Putative DMBT1-like protein

43	Q6V3W6	Coiled-coil domain-containing protein lobo homolog
44	P48754	Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog
45	P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
46	Q9ES34	Ubiquitin-protein ligase E3B
47	Q3TL54	Tripartite motif-containing protein 43A
48	Q8BKE6	Cytochrome P450 20A1
49	Q6ZQ18	Protein EFR3 homolog B
50	Q9R0N5	Synaptotagmin-5
51	Q8CGE9	Regulator of G-protein signaling 12
52	E9Q6X9	Rho GTPase-activating protein 40
53	Q91YR5	Methyltransferase-like protein 13
54	O88853	Galanin receptor type 3
55	Q99M80	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T
56	Q8C8N3	Brorin
57	Q9D5U0	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2B
58	Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain
59	O08672	Kinesin-like protein KIFC2
60	Q80VJ2	Tetratricopeptide repeat protein 28
61	P70106	Heat-stable enterotoxin receptor
62	Q8CEF9	Transmembrane protein 132C
63	Q91ZH7	Abhydrolase domain-containing protein 3
64	O54762	Alpha-1-antitrypsin-like protein GS55-LT
65	Q9WTR2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
66	O88879	Apoptotic protease-activating factor 1
67	Q9Z277	Tyrosine-protein kinase BAZ1B
68	Q8CIS0	Caspase recruitment domain-containing protein 11
69	Q6AYU0	Uncharacterized protein C12orf50 homolog
70	O88940	Musculin
71	Q9D0R4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56
72	P08911	Muscarinic acetylcholine receptor M5
73	Q8K5B8	Homeobox protein Hox-C12
74	Q04888	Transcription factor SOX-10
75	Q812E4	Synaptotagmin-like protein 5
76	Q9DCT1	1,5-anhydro-D-fructose reductase
77	O08850	Regulator of G-protein signaling 5
78	Q8K4F8	Cyclin-F
79	Q00285	Glutathione S-transferase Y1
80	Q99P31	Tyrosine-protein kinase Srms
81	Q62028	Secretory phospholipase A2 receptor
82	Q06180	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2
83	Q3ZT31	Sorting nexin-25
84	Q5F289	Spermatid maturation protein 1
85	Q3U308	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 2
86	Q9NQR8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 4

87	Q8C6D4	BEN domain-containing protein 5
88	Q2PFD7	PH and SEC7 domain-containing protein 3
89	O35090	Serum albumin
90	P00347	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
91	Q922S8	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6
92	Q8VHE6	Dynein heavy chain 5, axonemal
93	Q60649	Caseinolytic peptidase B protein homolog
94	Q63374	Neurexin-2
95	P26039	Talin-1
96	Q9QZS8	SH2 domain-containing protein 3C
97	P97686	Neuronal cell adhesion molecule
98	Q99MU0	Protein DBF4 homolog A
99	Q9ESN6	Tripartite motif-containing protein 2
100	O89084	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4A
101	Q9DBY4	TLR4 interactor with leucine rich repeats
102	P98078	Disabled homolog 2
103	Q8BSP1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7
104	Q3UP38	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 4B
105	Q80Z60	Endothelin-converting enzyme 2
106	Q80YD1	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial
107	Q9WU50	Dystonin
108	Q9DAI6	Protein FAM135B
109	Q8QZX2	HAUS augmin-like complex subunit 3
110	P14668	Annexin A5
111	Q01405	Protein transport protein Sec23A
112	Q9JLN5	Erythroid membrane-associated protein
113	P54843	Transcription factor Maf
114	P49290	Eosinophil peroxidase
115	P97440	Histone RNA hairpin-binding protein
116	Q8BFS9	Asparagine synthetase domain-containing protein 1
117	Q80Z60	Endothelin-converting enzyme 2
118	O09159	Lysosomal alpha-mannosidase
119	Q6IE24	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 54
120	Q7TSG1	Centrosomal protein of 120 kDa
121	B0V2N1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S
122	Q9JLC8	Sacsin
123	Q921L3	Coiled-coil domain-containing protein 92
124	P0C6C0	A-kinase anchor protein SPHKAP
125	Q921L3	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1
126	P59764	Dedicator of cytokinesis protein 4
127	Q64392	Potassium-transporting ATPase alpha chain 2

11. Apêndice 3. Lista de nomes das proteínas identificadas do grupo FT

1	O08638	Myosin-11
2	P62737	Actin, aortic smooth muscle
3	P31001	Desmin
4	P02301	Histone H3.3C
5	Q5T006	Histone H4
6	Q80ZD8	Amphoterin-induced protein 1
7	Q8C854	Myelin expression factor 2
8	Q3T1J2	Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 2
9	Q8VDC1	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1
10	P58771	Tropomyosin alpha-1 chain
11	Q8JZV7	Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
12	B3EWE0	Hemoglobin subunit beta
13	P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
14	Q9CQ19	Regulator of G-protein signaling 12
15	Q3TIX9	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2
16	Q8VDR9	Dedicator of cytokinesis protein 6
17	Q62835	Rab GTPase-binding effector protein 2
18	Q8BWG4	Uncharacterized protein KIAA1755 homolog
19	Q6MG64	von Willebrand factor A domain-containing protein 7
20	Q4V8A1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2B
21	Q64475	Histone H2B type 1-B
22	D3Z3C6	AN1-type zinc finger protein 4
23	Q8C0X0	Lebercilin-like protein
24	Q08091	Calponin-1
25	Q3UR50	von Willebrand factor A domain-containing protein 5B2
26	Q91YR5	Methyltransferase-like protein 13
27	Q8BL80	Rho GTPase-activating protein 22
28	P16086	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
29	Q7TNG5	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2
30	O35936	Arachidonate 8S-lipoxygenase
31	Q91VE0	Long-chain fatty acid transport protein 4
32	Q9D071	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog
33	Q9JKS6	Protein piccolo
34	A2ASS6	Titin
35	Q9D4K7	Coiled-coil domain-containing protein 105
36	P97393	Rho GTPase-activating protein 5
37	Q61716	Interferon alpha-11
38	Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial
39	Q04888	Transcription factor SOX-10
40	Q91XW8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP6
41	Q3UX43	Ankyrin repeat domain-containing protein 13C
42	Q11136	Xaa-Pro dipeptidase

43	Q80MC3	Prickle-like protein 3
44	Q8VE38	Oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein 1
45	Q9WU50	Dystonin
46	O70145	Neutrophil cytosol factor 2
47	O35437	Transcription factor 21
48	Q60644	Oxysterols receptor LXR-beta
49	Q922Q1	MOSC domain-containing protein 2, mitochondrial
50	Q3U095	NXPE family member 2
51	F8VQB6	Unconventional myosin-X
52	Q91ZV3	Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2
53	Q8CBH5	Major facilitator superfamily domain-containing protein 6
54	Q9ERU9	E3 SUMO-protein ligase RanBP2
55	P12269	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
56	Q4U4S6	Xin actin-binding repeat-containing protein 2
57	P11531	Dystrophin
58	Q61625	Glutamate receptor ionotropic, delta-2
59	Q80TH2	Protein LAP2
60	O08638	Myosin-11
61	Q9Z1Q9	Valine--tRNA ligase
62	Q3UHU5	Protein SOGA2

12. Anexo 4 . Artigo submetido à revista BioMed Research International ainda não publicado

Gross protein profiles of male and female prostates of adult gerbils subjected to supplementation and depletion of testosterone

Pedro H. S. Garcia^{*}, Ana P. S. Perez[‡], Fátima P. Souza^{*}, Rejane M. Góes[†], Sebastião R. Taboga^{†1}

^{}Multiuser center of Biomolecular innovation, Department of Physics, IBILCE, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000, email:pedrogarcia@sjrp.unesp.br, Brazil; [‡]Department of Cell Biology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, São Paulo, CP 6109, 13084-864, Brazil; [†]Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology, IBILCE, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000, Brazil, email: taboga@ibilce.unesp.br*

¹To whom correspondence should be addressed:

Dr. Sebastião Roberto Taboga (e-mail: taboga@ibilce.unesp.br)

Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP - Rua Cristóvão Colombo, 2265,
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil, Zipcode: 15054-000 Tel: +55
17 32212386; Fax: +55 17 32212390.

Abstract

The prostate is found in the reproductive system of humans and rodents in both males and females. Few studies have reported the types of proteins that may be involved in these changes that affect the male prostate, especially in comparison to the proteins of the female prostate. The aim of this study was to perform an initial exploratory comparative analysis of the proteomic profiles of the prostates of male and female adult gerbils under normal conditions and subject to depletion and supplementation by testosterone. Male and female adult gerbils (99 days) were divided in two subgroups for each experimental group: control, castrated and treated, and these received testosterone cypionate for 21 days. When the animals of all experimental groups completed 120 days, the prostate glands were removed. Total proteins were extracted from prostates and subjected to one-dimensional electrophoresis for biochemical analysis. Pool of proteins was observed in virtually all molecular weights, however, some characteristic peaks correlated with the dorsolateral lobe of the dorsal male prostate. Moreover, the female prostate presented proteics similar to the ventral lobe of the male prostate. These data are consistent with those of previous morphophysiological studies of proteins from the prostates from male and female gerbils.

Key words: Electrophoresis; protein; male prostate; female prostate; gerbil

Introduction

The prostate is an important accessory gland that is part of the male reproductive system, which is responsible for the production of secretions that are essential to the survival, viability and mobility of sperm [1]. The prostate gland develops from the urogenital sinus (SUG), and endodermal level source [2]. In males and females, the SUG is morphologically indistinguishable until the 17th–18th day of gestation in rats and mice, and even the 10th–12th week in humans. After that period, the prostatic morphogenesis that is initiated is dependent on the action of androgens [3,4]. The prostate gland is found in most mammals, however, with a morphological variety between the classes. In rodents, males, as the gerbil (*Meriones unguiculatus*) Mongolia's, for example, the prostate gland has four lobes that surround the urethra and the bladder base, known as ventral, dorsal, dorsolateral and the coaguladora [5,6].

The three most studied prostatic lobes are the dorsal, lateral dorsal and ventral. They have a common pattern of histological organization, such as the presence of alveoli with simple prismatic epithelium to cubic and highly secretory, immersed in a stroma with vascularized connective tissue, few elastic and collagen fibers and smooth muscle cells and compacted arranged around the alveoli, features very similar to those found in human male prostates [5,6]. However, according to Rochel et al. (2007) these lobes have distinct prostatic identities regarding important characteristics, such as aspects of secretion, epithelial and stromal pleating. However, according to Rochel et al. (2007) these prostatic lobes have distinct identities for important characteristics such as aspects of secretion, pleating and epithelial stromal organization.

The morphogenesis of the prostate is dependent on steroid hormones, androgens that are required to start prostate development, to continue their embryonic and neonatal growth and, later, to start the prostate secretory activity at puberty [7]. However, androgen action is not exerted directly on epithelial cells. Under the influence of androgens, mesenchymal cells produce and secrete specific selection factors that dictate the growth and differentiation of the prostate gland [4]. So, with the differentiation of epithelial cells, the levels of androgenic receptors (RA) increase and the expression of estrogenic receptors (ER β) epithelial and stromal (ER α) is induced [4]. In normal development, the ER α also acts in a paracrine manner, stimulating epithelial

proliferation, while mediating the antiproliferative effects of the ER β , thus, balancing the proliferative action of androgens on the prostatic epithelium [8].

Although the prostate is often mentioned as part of the male reproductive system, this gland is not exclusive to this system, and is also found in the female reproductive system of rodents [9,10,11] and humans [12].

In humans, this gland was assigned first as Skene's gland by Skene in 1880 who provided an interpretation of a vestigial structure. However, the work of Zaviacic [13,14] showed a greater homology with the male prostate gland due to a homology characterized by morphology and secretion of typical products such as fructose, zinc, PSA (prostate-specific antigen), among others.

Determining the profile of proteins composing the prostate is of great importance to understand the cascades of reactions involved in the production of seminal secretion, which is responsible for the survival and mobility of sperm. Caron et al. analyzed the proteins using crude male prostates and subcellular fractions and showed that the secretion of flocculent material consists of substances containing numerous specific proteins; these included acid phosphatase, binding protein and prostate spermine as well as many other enzyme systems leading to the formation of citrate, which is the designation of salts of citric acid and is the main nutrient produced by the prostate and serves as food for the spermatozoa [15]. Therefore, proteomic analyses will help us to elucidate the issues that so far are little studied primarily in relation to the prostate gland of male and female gerbils. In addition, addressing these issues will improve or identify novel methods of treatment of certain diseases involving the cascade of protein reactions in the prostate.

The present study aims to characterize the comparative proteomics, through total protein electrophoresis of male and female prostates of adult gerbils that underwent castration, supplementation by testosterone and under normal conditions, in order to evaluate the possible dependencies of the protein expression patterns on androgens.

Materials and Methods

Animals

The gerbil (*Meriones unguiculatus*) Mongolia's males and females used in this experiment were maintained in the São Paulo State University (UNESP) (São José do Rio Preto). The animals were placed in polyethylene boxes with a substrate of shavings, under appropriate conditions of temperature and lighting with a 12:12 light/dark cycle, provided with filtered water and food *ad libitum*.

Experimental design

The male and female animals were divided into three experimental groups, including the control, neutered and treated groups. Castrated animals with 99 days of postnatal life were submitted to bilateral orchiectomy for a surgical incision, after anesthesia via an intramuscular injection of Ketamine and Xylazine (50 mg/Kg). In the treated group, male and female animals with 99 days of postnatal life received 1 mg/Kg/day subcutaneous doses on day 21 of testosterone cypionate (T-Deposteron-EMS) diluted in 100 µl of Nujol® mineral oil (CAS 83-5-8020; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). After the completion of these procedures, the prostates of those groups were removed and stored in a biofreezer to -80 °C. At the end of each treatment, males and females of all experimental groups after completing 120 days of postnatal life were anesthetized by CO₂ inhalation, weighed and then beheaded for the prostate and blood collection. After dissection, the prostates of males and females were weighed. Control group females and castrated with respectively 120 and 99 days of life were cycled so that all were in the proestrus stage of the estrous cycle (Nishino and Totsukawa, 1996). However, females treated were not cycled group, because of the fact that testosterone disrupts the estrous cycle of the gerbil (Santos et al., 2006). In addition, the dorsal lobes, lateral and ventral prostate back of males were separated for biochemical analysis. Five male gerbils were used for each experimental group and 12 females for every experimental group.

Statistical analysis

For the biometrics, the software GraphPad InStat 3.02 (Copyright © 1992–1998, GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) was used. The quantitative results, expressed as mean \pm standard deviation, were supported by means of parametric statistical of variance (ANOVA) with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$).

Biochemical analysis

Total protein extraction

The prostate gland of males and females were frozen in liquid nitrogen and then placed in the Lysis buffer containing 5 ml of 1 M Tris-HCl maintained at -20°C (pH 7.4), 0.5 ml of 5 M NaCl, Triton X-100, 10 mL of glycerol and the volume was completed with distilled water, resulting in a total volume of 100 mL. Protease inhibitors (Sigma ® cocktail) were subsequently added including 100 μL of TpCl; 1:1000 of phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1:100 of sodium Ortovanato ($\text{Na}_3\text{O}_4\text{V}$). After chemical analysis of mechanical Lysis was held because the prostate is a very rigid gland in order to homogenize the prostate tissue. For this, we used a mixer (WIGGENHAUSER ® 8000-30000rmin) and the sample was exposed to three 10-second pulses. Then a sonicator was used with two pulses of average power for 10 seconds in order to obtain a greater homogenization. The extract was incubated at 4°C and subsequently centrifuged at 12,000 rpm, after which the supernatant was removed and separated into aliquots and kept in a biofreezer at -80°C .

Polyacrylamide gels (SDS-PAGE)

After extraction of total protein and quantification of proteins by the Bradford method, one-dimensional electrophoresis was performed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (SDS-PAGE) composed of distilled water, Acris-Bis (29:1), 1 M Tris-HCl (pH 8.7), SDS with ammonium persulphate, 12 (NH_4) $2\text{S}_2\text{O}_8$, TEMED (BPW supplemented with Cefotaxime). The volumes of compounds varied according to the resolution of the gel. Then the racing cap was done with glycine, Trisma Base, SDS and Water Mill 10-Q. Two methods were used to stain the gels as described below.

Fixing and staining the gels with Coomassie blue

For fixing the polyacrylamide gels the following reagents were required: Milli-Q water, acetic acid, methanol, and bluish with Coomassie blue water was Milli-Q, acetic acid, methanol, 100 more Coomassie blue 0.1, then was used to bleach Milli-Q water and methanol 100. After electrophoresis, the gel was fixed on average by 4 to 6:0 and then started staining with Coomassie blue by 4 the 6:0 and discoloration occurred overnight.

Fixation and gel staining with silver nitrate

A ratio of 3:2:1 water, ethanol and acetic acid, respectively, was used for fixation leaving the gel to set for 30 minutes. Next a booster solution was used consisting of glutaraldehyde, 4 M sodium acetate, ethanol and sodium tiosulfeto, completing this solution with distilled water, remaining on the action by reducing 30 minutes after these procedures, the gel was stained with silver nitrate. After staining, the material was revealed with the use of a revealing solution (formaldehyde (37), sodium carbonate and water) until the appearance of the bands, and the process process of coloring was interrupted by the addition of acetic acid. Staining with silver nitrate will show proteins that are at low concentrations.

The results of the different electrophoretic analyses, as well as the pattern of bands and the intensity of staining of the bands were analyzed by the IMAGEJ program (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). After scanning the gels, this program analyzed the bands on pixel intensity obtained.

Results

Male Prostates

The prostatic lobes of the experimental groups of males were weighed as shown in Table 1. The treated group almost doubled its weight in all lobes compared with the control group. In the castrated group, there was a significant decrease in their weight, due to the action of androgen on the gland. Analysis protein profiles of adult male gerbils of prostates lobes dorsal for the control group, castrated and treated groups (Figs. A,B, C, J, K, L) and dorsolateral groups (Figs. D, E, F, M, N, O) revealed the presence of a pool of proteins in all molecular weights.

There were some regions with higher molecular weight proteins (170 KDa and 70 KDa) that were featured in greater quantity in these areas. This was observed by the greater intensity of the bands compared to the ventral lobe of the male prostate gland

(Figs. G, H, I P, Q, R) and the female prostate (Figs. S, T, U, V, X, W) of the experimental groups. In addition, there was a set of proteins in the 70-KDa range in the dorsolateral lobes of all experimental groups. In the treated group of males, there was a significant increase in the production of total protein in the dorsal and dorsolateral lobes with characteristic peaks of 100, 70, 25 and 15 KDa that were wider. However, in the neutered Group these characteristic peaks were narrower indicating a lower concentration of proteins in the molecular weight region. In the ventral male prostate of all experimental groups (Figs. G, H, I P, Q, R) there were proteins in all molecular weights; however, there were also narrow peaks, that is, sharply defined bands in the region of 70 and 40 KDa. In the treated group, in addition to these peaks there was a subtle increase in almost all molecular weights compared with the observed increase in the dorsal and dorsolateral lobes, mainly in the regions of proteins with higher molecular weight (between 170 and 55 KDa).

Female Prostates

Table 1 shows the biometric analysis of female prostates, in which the treated group showed a statistically significant increase of twice the control group and a decrease of prostate weight in spayed females. In all experimental groups of adult gerbils, the female prostate showed a pool of proteins in almost all molecular weights, as well as that observed in the male prostate gland. However, in the female gland there were more higher molecular weight proteins (between 100 and 35KDa). Additionally, there was a higher concentration of 40- and 70-KDa proteins as shown in Figures 1D and 2H with a narrow peak in these bands. Analysis of the experimental groups of females (control, castrated and treated) showed that the treated group had an electrophoretic profile with thicker bands, indicative of increased protein expression. Even the narrow bands of 70 and 40 KDa from the ventral lobe of the male prostate and treated control group (Fig. G) compared with the female of all experimental groups (Fig. 3), both stained with Coomassie blue and silver. This comparison shows a high protein similarity between the female and ventral male gerbil prostates.

Discussion

The male gerbil prostate gland is similar to the human prostate [16,17]; however, different from human gland, most of the glands of the rodents, such as the gerbil are

divided into lobes including the dorsal, ventral and dorsolateral [6]. According to Rochel et al. (2007), these lobes differ with those aspects of secretion, the pleating of the epithelium and stromal organization. However, with the protein character analysis it was possible to observe similarities between the dorsal and dorsolateral lobes of the male prostate, showing a pattern of similar bands between 170 and 70 KDa.

The morphological aspects and the functioning of the prostate gland are dependent on the action of androgens, primarily testosterone [17,18]. The action of this hormone occurs via interaction with the androgen receptors, which are soluble 110-KDa phosphoproteins [18]. Thus, the action of exogenous testosterone on the male prostate resulted in the presence of thicker bands in all the molecular weights of the dorsal and dorsolateral lobes, especially in the 100-KDa region, which is a similar weight as the androgen receptor. While in the Group castrated, which underwent a testosterone depletion, there were protein bands with reduced intensities. The oscillation in testosterone levels changes the protein character of the prostate gland.

In addition, according to the results obtained, testosterone has a greater influence on the protein composition of the dorsal and dorsolateral male prostatic lobes, compared with the ventral lobe, in which proteins were observed at peaks of 70 and 40 KDa, unlike other lobes. The ventral lobe showed an increase in proteins with higher molecular weights, but this increase was not significant. Studies carried out by Banerjee et al. (1994) reported that mice exposed to exogenous testosterone have in response an increase of DNA content (number of cells) in the dorsal and dorsolateral lobes, compared to the ventral lobes. In this way, this amendment may result in increased protein synthesis, resulting in increased concentration of proteins expressed.

The female prostate gland develops in an environment with low testosterone levels and high levels of estrogen [19]. However, studies have shown that the growth and activity of this gland can be stimulated in hyperandrogenic conditions [20]. The androgenic action was reflected also in the protein prostate female character, such as in the presence of a pool of proteins in all molecular weights. In addition, there were no significant changes in the prostate protein profile in the environment in which there was estrogen depletion (castrated). Despite the estrogen depletion, the levels of estrogen in animals are not fully reduced, because about 5% of female testosterone levels are produced by the adrenal gland [20]. The prostates of castrated females suffer the action of these levels of testosterone, the hormone that is converted into estrogen by aromatase enzyme action [8].

The electrophoretic profile analysis of male and female prostates of gerbils reinforced the morphological studies that show a similarity between the ventral lobe of the male and female prostates [10,16]. This similarity was determined by the pattern of similar protein bands among the 70 KDa molecular weights and 40KDa, these being striking features in the two experimental groups in the study, as compared to the dorsal side and back lobes whose protein profiles were not similar. An important secretion product of male and female prostates is glycoprotein, as has been observed morphologically in PAS techniques [22]. The presence of glycoprotein has been observed by silver staining, in which the bands did not stain positive [23,24]. Protein analyses together with the morphological studies of male and female prostates are crucial factors to understand the physiology and function of this gland.

Characterization of the proteins that compose the male and female prostate is of fundamental importance to elucidate the normal and pathological physiology of these glands, especially when there are hormonal changes, such as testosterone levels that affect the functionality and behavior of these glands [11,19,21].

Our study provides results that are complementary to the morphologic studies of gerbil prostates that relate androgen action on the prostate gland. The results reinforce the importance of this hormone to the gland, especially the action of testosterone on the dorsal and dorsolateral lobes of the male prostate gland.

Further studies will be essential for greater detailing of the protein profile in order to identify the proteins that compose these glands and, thus, try to understand the dysfunctions that occur in them. Proteomics is a powerful tool for understanding the protein content discriminatory to the prostate.

Funding

FAPESP – São Paulo Research Foundation (Procs. N° 2011/11908-8)

Conflict of interest statement

None.

Legends

Figure 1. Total protein of male gerbil prostates separated by 12% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining. The experimental groups: control, castrated and treated are shown in A, B, C for dorsal (D), respectively; D, E, F for dorsolateral(DL), respectively and G, H I for the ventral (V) prostate respectively. All samples were analyzed by a software optical density, thus, visualizing the data in pixel intensity for molecular weight.

Figure 2. Total protein of male gerbil prostates separated by 12% SDS-PAGE and visualized by silver nitrate staining. The experimental groups: control, castrated and treated are shown in J, K, L for dorsal(D), respectively M, N, O for dorsolateral (DL), respectively and P, Q, R for the ventral(V) prostate of the male prostate. All samples were analyzed by a software optical density, thus, visualizing the data in pixel intensity for molecular weight.

Figure 3. Total protein of female gerbil prostates separated by 12% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue and silver nitrate staining. The experimental groups: control, castrated and treated are shown S, T, U, V, X, W. All samples were analyzed by a software optical density, thus, visualizing the data in pixel intensity for molecular weight.

Table 1. Biometrics analysis of the experimental groups of adult male and female gerbils.

Figure 1

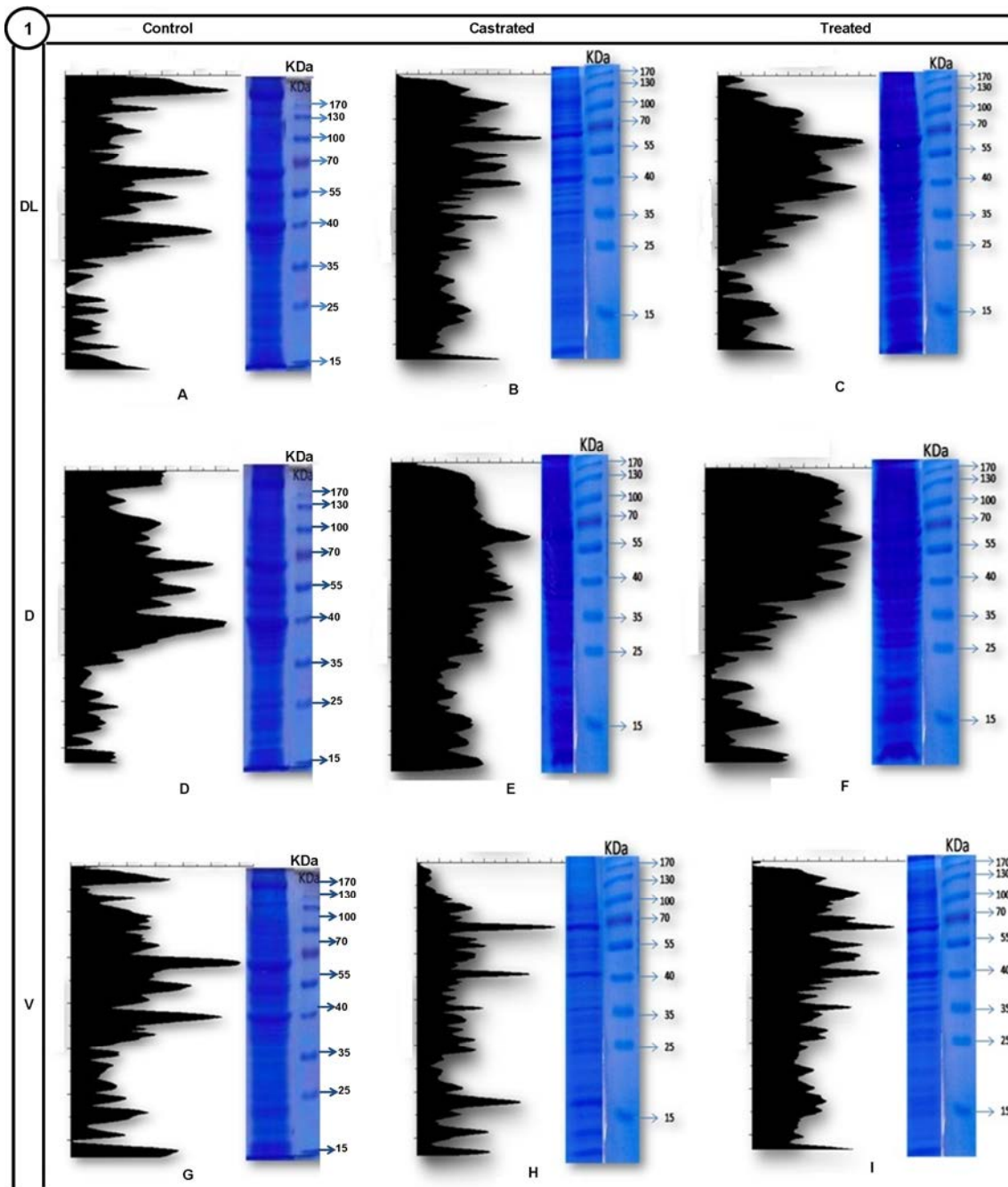


Figure 2

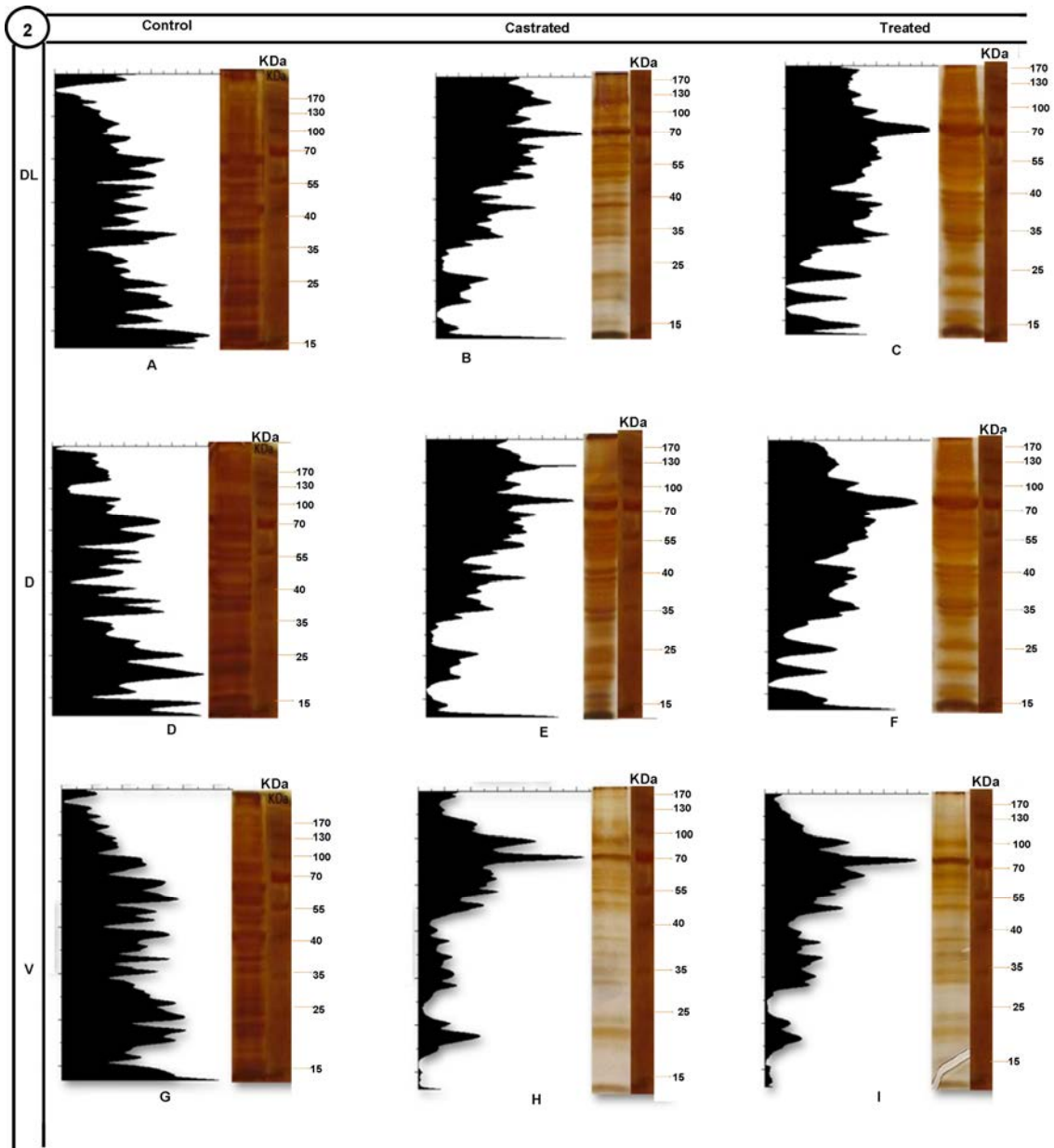


Figure 3

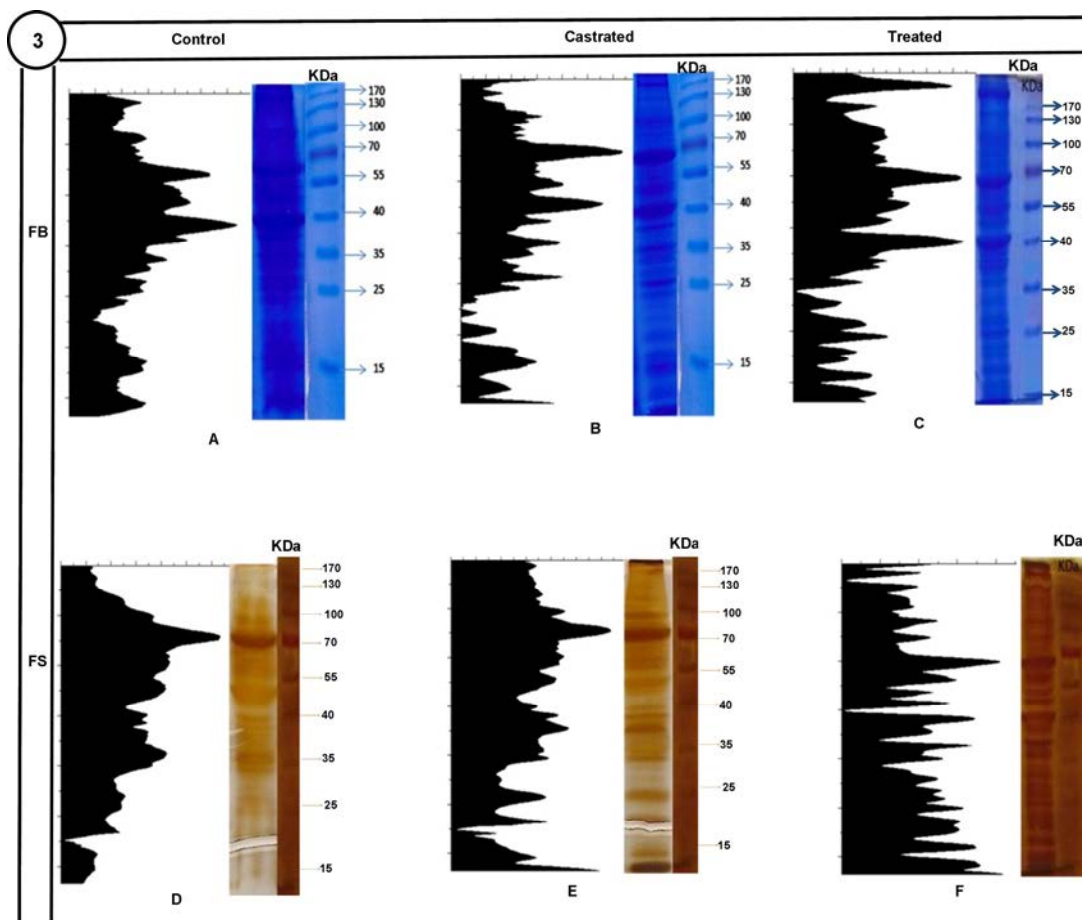


Table 1

<i>Parameters</i> (g)	<i>MALE</i>		
	Control	Treated	Castrated
Body weight	61.25 ± 0.95 ^a	71.00 ± 3.00 ^{a,b}	73.25 ± 2.21 ^b
Dorsal lobe	0.04 ± 0.004 ^{a,b}	0.08 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.004 ^a
Dorsolateral lobe	0.05 ± 0.01 ^{a,b}	0.11 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.01 ^a
Ventral lobe (x10 ⁻²)	0.57 ± 0.09 ^a	6.60 ± 0.40 ^b	0.57 ± 0.09 ^a

	<i>FEMALE</i>		
	Control	Treated	Castrated
Body weight	58.0 ± 4.60 ^a	61.30 ± 7.10 ^{a,b}	64.60 ± 4.60 ^b
Prostate (x10 ⁻²)	0.20 ± 0.10 ^a	0.40 ± 0.10 ^{a,b}	0.10 ± 0.05 ^b

Results are expressed as mean ± standard deviation. Superscript letters (^{a,b,c}) indicate statistically significant differences among experimental groups with $p \leq 0.05$.