

**CARACTERIZAÇÃO EM SDS-PAGE DE PROTEÍNAS PRESENTES NO PLASMA SEMINAL DE REPRODUTORES SUÍNOS**

**Bianchi, I.<sup>\*1</sup>; Collares, T.<sup>2</sup>; Campos, V.F.<sup>2</sup>; Cavalcanti, P.V.<sup>2</sup>; Corrêa, E.K.<sup>1</sup>; Lucia, T. Jr.<sup>1</sup>; Deschamps, J.C.<sup>1</sup>; Corrêa, M.N.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>PIGPEL – Pesquisa, Ensino e Serviços em Produção de Suínos

<sup>2</sup>Grupo de Pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal - Centro de Biotecnologia  
Campus Universitário s/nº, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS/Brasil, CEP: 96010-900

**PALAVRAS-CHAVE:** Proteínas, Plasma Seminal, Espermatozóides; Criopreservação, Suíno

**INTRODUÇÃO**

A maioria dos protocolos de congelamento de sêmen suíno atualmente utilizados derivam do método que se baseia na presença do plasma seminal que é retirado somente quando a curva de resfriamento atingir 15 °C (12), e noutro (7) pelo qual, imediatamente após a coleta do ejaculado é feita a remoção do plasma seminal através de centrifugação. A influência do plasma seminal na qualidade espermática é contraditória, tendo sido observado que a sua presença provocou maior sensibilidade ao choque térmico (8) e que a remoção do plasma não interferiu na viabilidade pós-descongelamento (10). Da mesma forma, não foi observado influência do plasma seminal na qualidade espermática, ao adicioná-lo na fração rica do ejaculado (6). O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil das proteínas do plasma de ejaculados de machos suínos.

**MATERIAIS E MÉTODOS**

**Animais utilizados:** Foram utilizados três machos suínos cruzados (Landrace x Large White) com aproximadamente 24 meses de idade, os quais apresentavam fertilidade conhecida e eram mantidos em baias individuais, sob as mesmas condições ambientais, na Estação Experimental da Palma, Universidade Federal de Pelotas (Brasil).

**Coleta do Sêmen:** As coletas foram realizadas através do método da mão-enluvada (1), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel.

**Perfil das proteínas do plasma seminal (SDS-PAGE):** O plasma seminal foi diluído três vezes em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Cada amostra foi preparada para a corrida com 50 µl de plasma seminal e 25 µl de tampão de amostra (Glicerol; Tris-HCl 0,6173M - pH 6,8; B-mercaptoetanol; SDS 10%; azul-de-bromofenol; H<sub>2</sub>O), após foram submetidas à fervura por 10 minutos para desnaturação protéica. A eletroforese do tipo SDS-PAGE foi feita pelo método vertical (11) com o sistema *BIO-RAD* Mini-Protean 3 Cell®. Foram feitas corridas com géis concentrados a 15% com uma voltagem de 100 V por 2 horas. Como padrão foi utilizado o marcador molecular BenchMark Protein Ladder™ (Invitrogen®, Carlsbad, USA). Os géis foram corados a temperatura ambiente com Coomassie Brilliant Blue em 'over-night'. O processo de descoloramento dos géis foi realizado em solução descolorante por 2 horas em banho-maria a uma temperatura de 75°C. A análise dos zimogramas foi baseada na clara visualização e distinção das bandas protéicas formadas durante a eletroforese, buscando identificar proteínas associadas à integridade de membrana dos espermatozóides. Foram analisados os perfis protéicos de todas as coletas.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

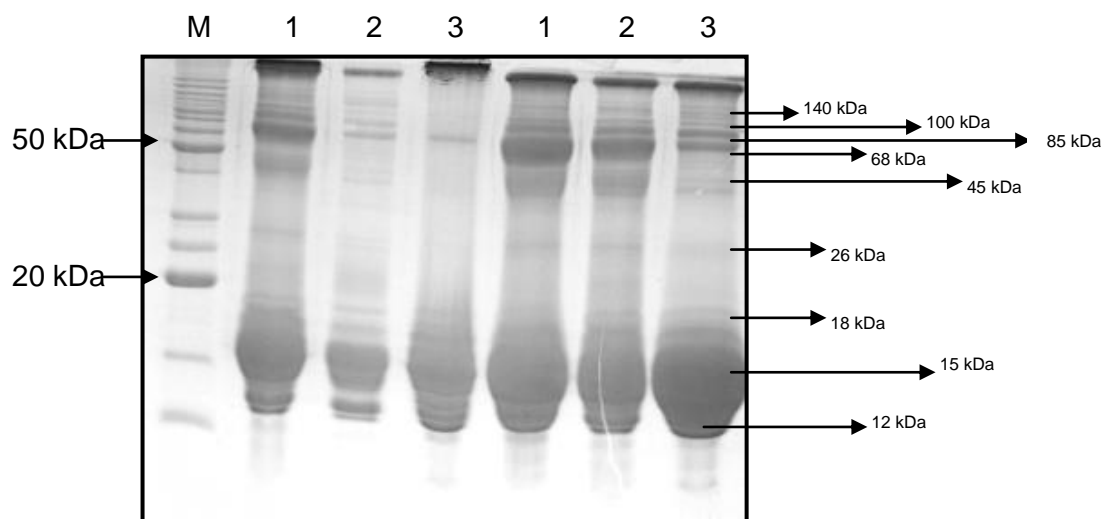
As proteínas caracterizadas no plasma seminal suíno foram: 140, 100, 85, 68, 45, 26, 18, 15 e 12 kDa (Figura 1). Das amostras analisadas, um grupo de proteínas (85, 68, 15 e 12 kDa) estavam presentes em todos os ejaculados. No entanto as bandas de 140, 100, 45, 26 e 18 kDa apresentaram variações (presença e ausência) entre as diferentes coletas. Outras bandas, além destas nove descritas acima, foram visualizadas com uma menor definição. Evidências têm sido apresentadas demonstrando o papel de proteínas do plasma seminal na preservação do sêmen de machos suínos (2, 3, 4). Foi demonstrado em um trabalho (5), a importância biológica de proteína de 26 kDa, presente no plasma seminal do machos suínos, e que a concentração elevada (unidades relativas maiores de 10) no ejaculado, correspondeu ao aumento das taxas parição (mais de 86%) e no aumento do número de leitões nascidos vivos (mais de 11). A influência do plasma seminal sobre os espermatozóides foi demonstrada quando se adicionou 10-12% do plasma seminal na dose inseminante, trazendo efeito benéfico na viabilidade do sêmen do macho. A taxa de retorno ao cio em vacas sofreu variação de acordo com a presença de diferentes glicoproteínas no plasma seminal de touros, em que a presença de proteína de 16 kDa era mais prevalente em ejaculados de touro com baixa fertilidade. Além das funções regulatórias no processo da fertilização, as proteínas do plasma seminal têm um importante papel na resposta inflamatória uterina, intermediada por leucócitos, após a deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea (9). No entanto, até o momento poucos trabalhos apresentam correlações das proteínas do plasma seminal com parâmetros de sêmen suíno utilizado em inseminação artificial. Trabalhos futuros a fim de avaliar a fertilidade de machos selecionados a partir de marcadores de congelabilidade são necessários, a fim de esclarecer mais detalhes da biologia seminal de ejaculados suínos e sua correlação com parâmetros de avaliação seminal e fertilidade.

## CONCLUSÃO

Através da caracterização em SDS-PAGE foi possível identificar um grupo proteínas conservadas e outro grupo com variação nos ejaculados. As proteínas do grupo variável podem ser estudadas como potenciais marcadores bioquímicos para prever parâmetros de avaliação espermática e fertilidade a fim de contribuir para a seleção de reprodutores em potencial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen collection, in: H.J. Bearden, J.W. Fuquay (Eds.), **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 147-157. 1997.
2. CABALLERO, I., *et al.* Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. **Reprod. Domestic. Anim.** v.39, p.370-375, 2004.
3. CENTURION, F., *et al.* Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biol. Reprod.** v.69, p.640-646, 2003.
4. CEREMADES, T., *et al.* Freezing of boar semen is not affected by the addition of seminal plasma spermadhesins. **Reprod. Domestic. Anim.** v.39, p.269, 2004.
5. FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**, USA, p.1-4. 2001.
6. JOHNSON, L.A., *et al.* Storage of boar semen. **Anim. Reprod. Sci.** v.62, p.143-172, 2000.
7. PAQUIGNON, M., *et al.* Technologie de la congélation de la semence de verrat: étude in vitro. **J. Rech. Porcine France**, v.6, p.71-76, 1974.
8. PURSEL, V.G., *et al.* Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **J. Anim. Sci.** v.34, p.278-283, 1972.
9. ROZEBOOM, K. Improving fertility with seminal plasma. **Swine News**, USA, v.23, p.1-4, 2000.
10. SALAMON, S. Deep freezing of boar semen III. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume, and method of thawing on survival of spermatozoa. **Austr. J. Biol. Sci.** v.26, p.239-247, 1973.
11. STRZEZEK, J. *et al.* Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports**. v.20, p.255-266, 2002.
12. WESTENDORF, P., *et al.* Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.** v.82, p.261-267, 1975.



**Figura 1.** Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal dos machos suínos (1, 2, 3), mostrando a distribuição das bandas de acordo com seu peso molecular (M: Marcador de Peso Molecular).