

MARCADOR MOLECULAR NO PLASMA SEMINAL SUÍNO ASSOCIADO À INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES APÓS A DESCONGELAMENTO**Bianchi, I.^{*1}; Collares, T.²; Campos, V.F.²; Cavalcanti, P.V.²; Corrêa, E.K.¹; Lucia, T. Jr.¹; Deschamps, J.C.¹; Corrêa, M.N.¹**¹PIGPEL – Pesquisa, Ensino e Serviços em Produção de Suínos²Grupo de Pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal - Centro de Biotecnologia Campus Universitário s/n°, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS/Brasil, CEP: 96010-900**PALAVRAS-CHAVE:** Marcador, Congelabilidade, Integridade de Membrana; Plasma Seminal, Suíno**INTRODUÇÃO**

Pesquisas com diversos tipos de marcadores bioquímicos de qualidade do sêmen de mamíferos vêm sendo desenvolvidas (1). O plasma seminal foi indicado como sendo importante para a manutenção da motilidade espermática em touros (2), aumentando também a resistência dos espermatozoides de suínos ao dano do choque térmico (6). Foi demonstrado que as proteínas do plasma seminal também são capazes de reverter os danos causados pelo choque térmico (3). A identificação dos vários grupos proteicos presentes no sêmen de muitas espécies pode dar suporte a linhas de pesquisas: na criopreservação de gametas, determinando marcadores de congelabilidade (11) e no melhoramento de técnicas de fertilização artificial, caracterizando proteínas específicas de cada espécie envolvidas em parâmetros espermáticos e fertilidade (4, 11). O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores bioquímicos do plasma seminal suíno, correlacionados com a integridade de membrana plasmática após o congelamento-descongelamento usando dimetilacetamida (DMA) como crioprotetor intracelular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados três machos suínos adultos mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo. Para a coleta, processamento e criopreservação do sêmen foram realizadas seis coletas de cada macho. As coletas foram realizadas através do método da mão-enluvada (5), usando um copo plástico protegido por um copo isotérmico recoberto por gaze, a fim de separar a fração do ejaculado rico em gel. Somente a porção do ejaculado com maior concentração espermática foi utilizada para o processo de congelamento (7, 21).

Criopreservação, envase e descongelamento: Imediatamente após a coleta do sêmen, para cada macho foi obtida da fração rica em espermatozoides uma alíquota de 20 mL em tubo cônico de 50 mL, e diluída (1:1, v/v) no diluente *Beltville Thawing Solution* (BTS) (16). Após a diluição inicial foi feito o resfriamento por 90 min a 24 °C, e seguiu-se o resfriamento por mais 90 min até 15 °C, quando então foi feita a centrifugação em centrífuga refrigerada a 800 x g por 10 min (SORVALL[®]RC6). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozoides foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo) para uma concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL, e feito o resfriamento por 90 min até 5 °C. No processo de congelamento foi utilizada a N,N-Dimetilacetamida (DMA) (C_4H_9NO) com peso molecular de 87,12 como crioprotetor intracelular. O diluidor de congelamento a ser adicionado a 5 °C foi elaborado a partir do diluidor de resfriamento, acrescido de 1,5% *Orvus Ex Paste*, Equex-Paste e o respectivos crioprotetor para concentração final de 5%, v/v, (DMA 5%). O envase do sêmen foi feito em palhetas de 0,5 mL, com concentração final de 500×10^6 espermatozoides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após estocadas em nitrogênio líquido a -196°C até o descongelamento. As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 20 s, sendo re-suspenso em tubo cônico contendo 10 mL de BTS previamente aquecido a 37 °C (1:20, v/v).

Avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP) de espermatozoides (SPTZ): Após o descongelamento foi feita a avaliação da IMP espermática por fluorescência (10), através das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP). Após incubação em temperatura de 22°C por 15 min foi feita a avaliação em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC), através de excitação em filtro WU sob aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozoides em uma mesma lâmina e classificadas conforme sua coloração em íntegros (espermatozoides corados em verde em toda sua extensão) e lesados (espermatozoides corados em vermelho).

Perfil das proteínas do plasma seminal (SDS-PAGE): Foram analisados os perfis proteicos no plasma seminal através de SDS-PAGE (19) das bandas de 140, 100, 85, 68, 45, 26, 18, 15 e 12 kDa, no congelamento de cada um dos machos para cada uma das coletas realizadas.

Análise: Após o descongelamento das palhetas foi feita a distribuição de frequências [Statistix] dos resultados de IMP dos espermatozoides, e feita a categorização em menor de 55% e igual ou maior que 55%. Com isso foi relacionado à integridade no descongelamento com a presença ou ausência de cada banda proteica no plasma seminal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de IMP após o descongelamento foi de 55,7%. Não houve diferença ($P > 0,05$) na IMP entre os machos utilizados (59,5; 50,4 e 57,0%). Em diferentes espécies o uso de amidas em substituição ou associação com outros crioprotetores têm sido realizados com sucesso em equinos (17), galos (20) e peixes

(15). Das amostras analizadas, 46,2% apresentaram IMP ao descongelamento superior a 55%. O perfil no plasma seminal relacionado à presença ou ausência das proteínas quando a IMP foi maior ou igual a 55% no descongelamento está apresentado na Tabelas 1. As proteínas de 85, 68, 15 e 12 kDa estavam conservadas entre todas as amostras analisadas. As bandas de 140, 100, 45, 26 e 18 kDa apresentaram variações entre as coletas analisadas. Nas amostras, com IMP >55% foi observada a ausência da banda de 26 kDa em 88% das amostras (Figura 1). Trabalho realizado com suínos miniatura observou-se que o plasma seminal contém fatores que modificam a célula espermática antes do congelamento e reduzem a capacidade de penetração no oócito após o congelamento (12). O efeito prejudicial do plasma seminal especialmente em espermatozoides armazenados por pelo menos 6 h antes da criopreservação também é relatado em outro trabalho (14). Por outro lado, efeitos benéficos das proteínas do plasma seminal são relatados em vários trabalhos (8, 9, 13). Alguns autores (11) sugerem que há diferenças nas proteínas do plasma seminal de touros com boa e má resposta ao congelamento, sugerindo o estudo dessas proteínas do plasma como marcadores de congelabilidade.

CONCLUSÃO

A ausência da banda de 26 kDa, no plasma seminal suíno, pode ser um marcador bioquímico relacionado positivamente com a integridade de membrana plasmática de espermatozoides submetidos ao congelamento e descongelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVI, S.M.H; COSSON, J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v.29, p.101-110, 2005.
- BAAS, J.W. *et al.* Factors in seminal plasma of bulls that effect the viability and motility of spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.68, p.275-280, 1983.
- BARRIOS, B. *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biol. Reprod.**, v.63, p.1531-1537, 2000.
- BARRIER-BATTUT, I., *et al.* Seminal plasma proteins semen characteristics in relation with fertility in the stallion. **Abstracts Anim. Reprod. Sci.**, v.89, p.199-321, 2005.
- 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.
- BERGER, T.; CLEGG, E. Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock. Initiation of motility and loss of cytoplasmic droplets. **J. Anim. Sci.** v.60, p.1295-1302, 1985.
- BORDIGNON, V. *et al.* Efeito da trealose sobre a motilidade, acrossoma e fertilidade do sêmen congelado de suínos. **Rev Bras Reprod Animal**. v.20, p.54-62. 1996.
- CASTELLINI, C., *et al.* Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa, **Anim. Reprod. Sci.** v.63, p.275-282, 2000.
- GARNER, D.L., *et al.* Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**. v.56, p.31-40, 2001.
- HARRISON, R.A.P.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa, **J. Reprod. Fertil**. v.88, p.343-352, 1990.
- JOBIM, M.I.M., *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.61, p.255-266, 2004.
- KAWANO, N., *et al.* Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing, **Theriogenology**. v.61, p.351-364, 2004.
- LAHNSTEINER, F., *et al.* Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, **Theriogenology**. v.62, p.801-808, 2004.
- MOORE, A.I., *et al.* Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa, **Theriogenology**. v.63, p.2372-2381, 2005.
- OGIER De BAULNY, B., *et al.* Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants, **Cryobiology**. v.39, p.177-184, 1999.
- PURSEL, V.G.; Johnson. L.A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **J. Anim. Sci.** v.40, p.99-102, 1975.
- SQUIRES, E.L., *et al.* Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa, **Theriogenology**. v.62, p.1056-1065, 2004.
- STATISTIX®. **Statistix® 8 Analytical software**. Tallahassee, FL. 2003
- 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.
- TSELUTIN, K., *et al.* Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa, **Poultry Sci.** v.78, p.586-590, 1999.
- WESTENDORF, P., *et al.* Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.** v.82, p.261-267, 1975.

Tabela 1: Presença (Sim) e Ausência (Não) de proteínas no plasma seminal relacionado com IMP >55% descongelado

Macho	Perfil	Banda, kDa, n (%)								
		140	100	85	68	45	26	18	15	12
1	Sim	5 (83)	6(100)	6 (100)	6 (100)	6(100)	2 (33)	3 (50)	6 (100)	6 (100)
1	Não	1 (17)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (67)	3 (50)	0 (0.0)	0 (0.0)
2	Sim	3 (60)	3 (60)	5 (100)	5 (100)	2 (40)	0 (0.0)	3 (60)	5 (100)	5 (100)
2	Não	2 (40)	2 (40)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (60)	5(100)	2 (40)	0 (0.0)	0 (0.0)
11	Sim	3 (60)	3 (60)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	0(100)	4 (80)	5 (100)	5 (100)
11	Não	2 (40)	2 (40)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (40)	5(100)	2 (40)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	Sim	11(69)	12(75)	16 (100)	16(100)	11(69)	2 (12)	10 (62)	16 (100)	16 (100)
Total	Não	5 (31)	4 (25)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (31)	14(88)	6 (38)	0 (0.0)	0 (0.0)

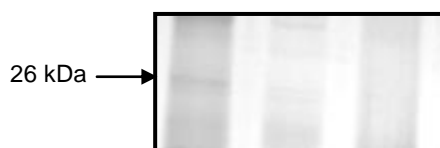


Figura 1: Banda de 26 kDa em plasma seminal suíno