



NÚMERO DE BANDAS PROTÉICAS DAS DIFERENTES PORÇÕES DO EJACULADO SUÍNO DE DIFERENTES MACHOS

**MASCHIO, Eder Francisco¹; PIGOZZO, Rudy¹; CORCINI, Carine Dahl¹;
VARELA JUNIOR, Antonio Sergio²; LEON, Priscila Marques Moura¹; LUCIA,
Thomaz Jr.¹**

¹ PIGPEL, Faculdade de Veterinária- UFPel ²Instituto de Ciências Biológicas - FURG
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. rudypigozzo@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura tecnificada apresenta varias ferramentas tecnológicas que permitem ao Brasil ser um dos grandes produtores de carne suína do mundo, medidas de controle sanitário, manejo nutricional, biotecnias reprodutivas são fatores que favorecem o desenvolvimento e a obtenção de resultados mais significativos na suinocultura. Porém vários fatores ainda devem ser melhor estudados, como o processo de criopreservação de sêmen, onde vários fatores estão sendo estudados dentre estes o plasma seminal.

Durante muitos anos, o plasma seminal foi considerado apenas como um meio de transporte e sustentação dos espermatozóides, desde a ejaculação até a fertilização (KRAUS et al., 2005; TROEDSSON et al., 2005). Porém, WOLFE et al. (1993), baseando-se nas diferenças apresentadas na qualidade seminal, com o uso de bovinos férteis e com degeneração testicular experimental, sugeriram que os conteúdos do plasma seminal influenciavam na fertilidade masculina. As interações entre os espermatozóides e o plasma seminal iniciam-se desde a espermatogênese, mas é durante a passagem pelo epidídimo que acontece a maturação da célula espermática, e alterações biológicas em sua membrana plasmática devido à interação com o meio (NAABY-HANSEN et al., 1997). Conforme descrito por SYNTIN et al. (1996), durante o transporte epididimário, os espermatozóides adquirem proteínas selecionadas, secretadas por células epiteliais da cabeça e da porção proximal do corpo do epidídimo. Nos suínos, essas regiões seriam responsáveis pela secreção de 70 a 80% de todas as proteínas secretadas no epidídimo. Porém, as glândulas vesiculares dos suínos são responsáveis pela secreção de 80 a 90 % das proteínas contidas no plasma seminal, enquanto que o restante seria proveniente da próstata e do epidídimo (STRZEŽEK, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o número de bandas protéicas das diferentes porções do ejaculado suíno de diferentes machos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados quatro machos suínos F1 (Landrace X Large White), instalados na Fazenda da Palma. Foram realizadas seis coletas de cada macho, durante 15 dias, totalizando 24 ejaculados. Os ejaculados foram coletados pelo

método da mão enluvada, utilizando frascos de 10 mL aquecidos a 38°C e cobertos com filtro, a fim de separar a fração gelatinosa do sêmen (HANCOCK & HOVEL, 1959). O ejaculado foi dividido durante a coleta em quatro porções: Porção 1 (P1) correspondendo aos primeiros 10 ml, porção transparente; Porção 2 (P2) correspondendo aos primeiros 10 ml da fração rica em espermatozóides; Porção 3 (P3) correspondendo ao restante da fração rica em espermatozóides e a Porção 4 (P4) correspondendo todo o ejaculado.

Após a coleta, alíquotas de 1 ml de P1, P2, P3 e P4 foram centrifugadas a 2.500 x g por 5 min. Logo após, as amostras foram colocadas em um recipiente com gelo por 1 h. O plasma seminal foi novamente centrifugado a 10.000 x g por 10 min, para a obtenção somente do plasma. Do sobrenadante, retiraram-se 10 µl, aos quais foram adicionados 30 µl de H₂O deionizada e 20 µl de tampão de amostra constituído de: 20% de Glicerol; 10% Tris-HCl 0,6173 M, pH 6,8 2% β-Mercaptoetanol; 20% Dodecil Sulfato de Sódio a 10% – SDS ; 2,5 mg de Azul de Bromofenol e H₂O deionizada. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min, para desnaturação das proteínas.

A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) foi realizada com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell[®], segundo LAEMMLI (1970). Foram feitas corridas com géis de poliacrilamida concentrados a 15% (MAÑÁSKOVÁ e JONÁKOVÁ, 2007), primeiramente, com uma voltagem de 70 V por 20 minutos, para promover a concentração das proteínas e, após, a 120 V por 70-80 minutos. Como padrão, foi utilizado o marcador molecular BenchMark Protein Ladder[®]. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue por 20 minutos (SYNTIN et al., 1996). O processo de descoloramento dos géis foi feito em solução descolorante constituída por 40% Metanol 10% ácido acético glacial e 50% H₂O deionizada, por 1 h, em banho-maria, a 75°C. A análise foi baseada na visualização e distinção das bandas protéicas formadas durante a eletroforese. Os dados obtidos da eletroforese foram analisados pelo *software* TotalLab TL100[®], v. 2006. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Statistix 8.0[®] (2003).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

No total foram encontradas nove bandas, sendo que a maior frequência foi observada em ejaculados com duas bandas. Esses resultados são coerentes com os de BIANCHI et al. 2008, apenas diferem pela metodologia empregada que neste teve o plasma seminal congelado e diluído em solução salina. Em relação a fração e o número de bandas, a fração 1 foi a que observou-se menor número de bandas, diferindo estatisticamente das demais frações (P<0,05) (Tabela 1). A primeira fração do ejaculado pode constar menos bandas devido sua origem ser somente das glândulas anexas, e sua função somente é a limpeza do uretra assim como tamponar o pH do canal para a passagem das demais frações rica em espermatozóides e que sua origem começam no epidídimo conforme o descrito por STRZEŻEK, 2002.

Na fração 4 que corresponde a todo ejaculado não teve um aumento significativo no número devido algumas proteínas presentes ter o mesmo peso molecular assim como também ocorre a interação entre polipeptídeos.

Tabela 1- Bandas protéicas detectadas em diferentes frações do plasma seminal de suínos.

Fração	Bandas protéicas
--------	------------------

1	2,5±0,4 ^a
2	4,8±0,4 ^b
3	4,6±0,4 ^b
4	4,6±0,4 ^b

Médias ± EPM com expoentes diferentes na coluna diferem por P < 0,05.

Foram observadas diferenças no padrão do perfil eletroforético entre os machos e o número de bandas conforme Tabela 2. Essas diferenças demonstram o efeito individual do macho é um fator que influencia sobre esta variação na composição protéica do plasma seminal, pois o macho C apresentou 1,5 bandas a mais que o macho A.

Tabela 2 - Bandas protéicas detectadas em diferentes frações do plasma seminal de suínos

Macho	Bandas protéicas
A	3,3±0,4 ^b
B	4,4±0,4 ^{ab}
C	4,8±0,4 ^a
D	3,9±0,4 ^{ab}

Médias ± EPM com expoentes diferentes na coluna diferem por P < 0,05.

Na avaliação das proteínas presentes no plasma seminal pela técnica da eletroforese unidimensional, onde as proteínas são separadas somente pelo seu ponto isoelétrico descrevendo seu peso molecular aproximado dificultam a escolha de um marcador, pois conforme o verificado nesse experimento existe uma variação entre os machos. Assim como outras diferenças na composição protéica do plasma seminal pode ser atribuídas a época do ano, nutrição, raça e fração do ejaculado, o que dificulta a busca de um marcador para selecionar machos de alta fertilidade, conforme o constado por ROCA et al., 2006.

Estudos deverão ser conduzidos utilizando a técnica da eletroforese bidimensional ou por espectrometria de massa para diminuir essas diferenças. Estas alternativas devem ser utilizadas quando se busca um marcador bioquímico para fertilidade ou congelabilidade de machos.

4. CONCLUSÃO

Portanto neste estudo ficou comprovada a grande variabilidade entre as frações e os machos em relação ao número de bandas demonstrando que estudos mais aprimorados devem ser utilizados na busca de um marcador bioquímico para características reprodutivas de um macho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCHI, I., COLLARES, T., CAMPOS, V.F., CAVALCANTI, P.V., KAEFER, C., CORRÊA, E.K., DELLAGOSTIN, O.A., LUCIA, T. JR., DESCHAMPS, J.C., **Arquivo CORRÊA, M.N.** Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozóides suínos pós-descongelamento. **Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**. Aceito para publicação. 2008.

- HANCOCK, J.L., HOVELL, G.J.R. 1959. The collection of boar semen. **Veterinary Record** 71, 664 – 665.
- KRAUS, M., TICHÁ M, ZELEZNÁ B, PEKNICOVÁ J, JONÁKOVÁ V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**. v.65, p. 33–46, 2005.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 227, 680 – 685.
- MAŇÁSKOVÁ. P., JONÁKOVÁ, V. 2007. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. **Journal of Reproductive Immunology**. In press [doi:10.1016/j.jri.2007.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.10.001)
- NAABY-HANSEN, S.; FLICKINGER, C.J.; HERR, J.C. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. **Biology of Reproduction** v. 56, p. 771 – 787, 1997.
- ROCA, J., HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, G., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science** 84, 2692 – 2699. 2006.
- Statistix ®. Statistix for Windows User's manual. Tallahassee: Analytical software; 2003.
- STRZEŻEK, J., SAIZ-CIDONCHA, F., WYSOCKI, P., TYSKIEWICZ, A., JASTRZĘBSKI. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports** 22, 255 – 266.2002.
- SYNTIN, P., DACHEUX, F., DRUART, X., GATTI, J.L., OKAMURA, N., DACHEUX, J.L. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of Reproduction** 55, 956 – 974. 1996.
- TROEDSSON, M.H.T. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science** v. 89, p. 171 – 186, 2005.
- WOLFE, D.F. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology** v. 40, p. 1083 – 1091, 1993.