



RELAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA COM 22 KDa NO PLASMA DE SÊMEN SUÍNO COM A INTEGRIDADE DE MEMBRANA

PIGOZZO, Rudy¹; CORCINI, Carine Dahl¹; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio²; DESCHAMPS, João Carlos.¹; LUCIA, Thomaz Jr.¹

¹Laboratório de Reprodução Animal- Centro de Biotecnologia – 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](mailto:rudyfigozzo@yahoo.com.br)

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) em suínos vem sendo amplamente difundida na suinocultura tecnificada, pois permite o melhoramento genético em um curto espaço de tempo através da utilização de machos de alto valor genético. Além de facilitar o manejo, garantir uma melhor segurança sanitária e reduzir os custos da propriedade.

Na IA em suínos o sêmen após a coleta é diluído em BTS, este deve ser acondicionado na faixa de temperatura de 15 a 18 °C fazendo com que haja uma redução na taxa metabólica dos espermatozóides (Corrêa *et al.*, 2001). Desta forma se obtém uma dose inseminante (DI) que tem sua duração média de 72 h.

Apesar da biotecnia de IA em suínos com sêmen resfriado estar amplamente difundida a mesma possui como inconveniente seu curto período de duração da DI, vários estudos já foram conduzidos na tentativa de se fazer uso do sêmen suíno congelado, porém estas necessitam uma DI com número de espermatozóides duas ou três vezes maior (Johnson *et al.*, 2000), apresentando índices reprodutivos insatisfatórios, como redução na taxa de parição de 20–30% e no tamanho da leitegada de 1 a 2 leitões por parto (Johnson *et al.*, 2000). Com tudo isso, o uso da IA com sêmen congelado ainda é restrito, pois seus resultados insatisfatórios inviabilizam economicamente seu uso nos sistemas de produção.

Considerando que o efeito individual do macho seja o fator com maior influência sobre a variação na eficiência do processo de congelamento do sêmen suíno (Roca *et al.*, 2006), torna-se importante estudar técnicas que identifiquem variações na resposta ao congelamento entre diferentes machos e que permitam desenvolver testes para detectar o seu potencial de congelabilidade. Nesse contexto, a composição protéica do plasma seminal deve ser considerada como um fator importante a influenciar a fertilidade masculina (Strzeżek *et al.*, 2002), uma vez que já foram identificadas associações entre essas proteínas e alguns importantes processos fisiológicos, como a reação acrossômica (Siliciano *et al.*, 2008). Algumas dessas proteínas poderão se constituir em marcadores bioquímicos que permitam identificar indivíduos com maior ou menor potencial de fertilidade e congelabilidade do sêmen (Strzeżek *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o conteúdo protéico do ejaculado suíno antes destas serem submetidas ao congelamento e a associação entre a presença da proteína identificada no plasma seminal e integridade de membrana (IM) espermática pós-descongelamento, visando à identificação de marcadores bioquímicos em condições de predizer o potencial de congelabilidade de sêmen em diferentes machos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta de sêmen

Os ejaculados foram coletados de 4 machos suínos, totalizando 24 ejaculados, utilizando frasco isotérmico aquecidos a 38°C, coberto com filtro, a fim de separar a fração gelatinosa do sêmen (Hancock & Hovel, 1959). Para serem processados, os ejaculados deveriam apresentar, após a diluição com BTS, motilidade espermática igual ou superior a 60% e IM por fluorescência igual ou superior a 70%.

2.2. Processamento do ejaculado e criopreservação

Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi diluído em condições isotérmicas (1:1 v/v) no diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS), com a manutenção da temperatura de acordo com a temperatura do ejaculado. O congelamento do sêmen foi conduzido tomando-se como base o método descrito por Bianchi *et al* (2008), com modificações na curva de resfriamento. A curva de resfriamento foi realizada após a diluição inicial, usando tubos de 50 ml, imersos em um becker de 200 ml de água, mantidos na mesma temperatura da amostra e colocados a 15°C por 90 min. Quando o meio atingiu 15°C, foi realizada a centrifugação (800 x g por 10 min) para retirada do plasma seminal. O sedimento de espermatozóides obtido da centrifugação foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (DR), contendo 80% de solução de lactose a 11% e 20% gema de ovo, em volume suficiente para uma concentração de 2×10^9 espermatozóides por ml. Após, foi realizado resfriamento até 5°C por 90 min.

Ao final desse período, o meio foi re-suspenso no diluente de congelamento (DC), elaborado a partir do DR. O DC era constituído de: 83,5% de DR, 1,5% de *Orvus Ex Paste* e 15% do crioprotetor Dimetilacetamida. A quantidade de DC acrescentada foi de 1:1, ou seja, para cada 2 ml de sêmen com DR, foi adicionado 1 ml de DC para que se obtivesse uma concentração final de 5% de DMA (Bianchi *et al*, 2008). Posteriormente, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, contendo 1×10^9 espermatozóides. As palhetas foram congeladas horizontalmente, em vapor de nitrogênio líquido, 5 cm acima do nível do nitrogênio, a uma temperatura aproximada de -90°C, por 20 min. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C e armazenadas até o descongelamento. Para as avaliações subseqüentes, as palhetas foram descongeladas a 37°C por 20 s, sendo re-suspenso em tubo cônico contendo 5 ml de BTS previamente aquecido a 37°C.

2.3. Avaliação da integridade da membrana espermática

A avaliação da IM espermática, considerada indicativa da viabilidade da célula espermática, foi realizada com sêmen *in natura* e pós-descongelamento, através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). A avaliação foi feita sob aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. Foi realizada a contagem de 100 espermatozóides por lâmina. As células espermáticas apresentando

fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto que as células apresentando fluorescências vermelhas, ou ambas as cores foram consideradas danificadas.

2.4. Caracterização das proteínas do plasma seminal

Após a coleta, alíquotas de 1 ml do ejaculado 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 minutos, para desnaturação das proteínas.

A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) era realizada com o sistema BIO-RAD Mini-Protean 3 Cell[®], segundo Laemmli (1970). Foram feitas corridas com géis de poli-acrilamida concentrados a 15% (Maňásková 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. O processo de descolorimento 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

A análise inter-machos identificou associação ($P < 0,05$) entre a IM espermática pós-descongelamento para proteína com 22 kDa. Quando esta proteína estava presente a média para IM espermática foi de $47,9 \pm 6,9$ enquanto que sua ausência foi de $32,0 \pm 2,0$ diferindo estatisticamente ($P < 0,05$).

Na análise intra-machos a associação da proteína com 22 kDa com a IM pós-descongelamento foi verificada somente em 2 machos conforme Tabela 1.

Tabela 1-Integridade de membrana pós- descongelamento em função da presença ou ausência da proteína com 22kDa no plasma seminal de machos suínos (4 machos x 6 coletas)

Macho	Proteína com 22 kDa	Integridade de membrana (%)
1	Ausência	$24,4 \pm 1,65^a$
1	Presença	$27,7 \pm 1,65^a$
3	Ausência	$34,9 \pm 1,65$
3	Presença	NV
4	Ausência	$45,2 \pm 1,65$
4	Presença	NV
9	Ausência	$48,3 \pm 1,65^a$
9	Presença	$64,9 \pm 1,65^b$

Média \pm EPM com expoentes diferentes na coluna e no mesmo macho. NV – não verificado.

No presente estudo, a presença da proteína com 22 kDa foi associada a um maior percentual de integridade de membrana no macho 9. No entanto, nos machos 3 e 4, não foi possível fazer qualquer comparação, pois essa PPS se encontrava ausente em todos os ejaculados, demonstrando mais uma vez que existe uma variabilidade entre os machos conforme o descrito por Roca (2006). Por este motivo muitas vezes fica difícil determinar um marcador e uma padronização na técnica de congelamento de sêmen suíno. Portanto, para os machos 9 em particular, caso a integridade de membrana espermática seja considerada como critério limitante para programas de IA com sêmen congelado, essa PPS seria um potencial marcador relevante.

4. CONCLUSÃO

Outros estudos devem ser realizados com o objetivo de se ter uma melhor determinação do plasma seminal e seu desempenho frente o congelamento. Este estudo demonstrou que a presença da proteína com 22 kDa melhorou a IM e que existe uma grande variação entre os machos com relação a composição protéica do plasma seminal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bianchi, I., Calderam, K., Maschio, É.F., Madeira, E.M., Rosa Ulguim, R., Corcini, C.D., Bongalhardo, D.C., Corrêa, É.K., Lucia JR., T., Deschamps, J.C., Corrêa, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology** v. 69, p. 632 – 638, 2008.
- Corrêa, M. N.; Meincke, W.; Lucia JR, T.; Deschamps, J.C. **Inseminação Artificial e Suínos**. Pelotas: 2001.
- Hancock, J.L., Hovell, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record** 71, 664 – 665. 1959.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility** 88, 343 – 352. 1990.
- Hofmo, P.O., Grevle, I.S. Development and commercial use of frozen boar semen in Norway In (eds): Johnson, L.A., Guthrie, H.D. **Boar semen preservation IV**, p. 71 - 77, 2000
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science** 62, 143 – 172. 2000.
- 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
- Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology** 48, 209 – 219. 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.
- Siciliano, L., Marciano, V., Carpino, A. Prostate-like vesicles stimulate acrossoma reaction pig spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology** 6, 1 – 7.2008.

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.