



POTENCIAIS MARCADORES DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PARA SÊMEN OVINO CONGELADO

¹GASTAL, Gustavo Desire Antunes; ¹SCHIAVON, Raquel Schiavon;
¹GONÇALVES, Alexander de Oliveira; ¹SCHNEIDER, Jonas Rafael; ¹CORCINI,
Carine Dahl; ¹GOULARTE, Karina Lemos; ¹LUCIA Jr., Thomaz

¹Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Reprodução animal, Faculdade de Veterinária UFPeL, Campus Universitário - Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 Capão do Leão, RS, Brasil.
Email: ggastal.vet@ufpel.edu.br

1. Introdução

Métodos como as avaliações da integridade da membrana plasmática e do acrossoma do espermatozóide, têm sido usadas na avaliação da qualidade espermática após o descongelamento, mas suas associações com a fertilidade *in vivo* também são pouco consistentes (O' Meara *et al.*, 2008). Algumas proteínas presentes no plasma seminal têm sido associadas com a fertilidade espermática, tendo influência sobre a motilidade espermática, capacitação espermática e interação com o gameta, enquanto outras são descritas como fatores de infertilidade. Em função da importância do plasma seminal, o seu conteúdo protéico vem sendo estudado, através da técnica de eletroforese, na busca de marcadores bioquímicos relacionados à fertilidade (Roncoletta *et al.*, 1999; Cardozo *et al.* 2006). Em ovinos, a adsorção de algumas proteínas do plasma seminal a amostras de sêmen congelado e descongelado, foi associada com a reversão de danos na célula espermática atribuídos ao choque-térmico (Barrios *et al.*, 2000, Pérez-Pé *et al.*, 2001). O objetivo do presente estudo foi descrever as proteínas do plasma seminal ovino com peso molecular de 11, 24 e 45 kDa como potenciais marcadores e avaliar a sua associação com a integridade de membrana de sêmen congelado/descongelado.

2. Materiais e métodos

Foram utilizados sete machos sem raça definida, onde foram realizadas oito coletas de sêmen de cada macho, durante os meses de maio e junho de 2008, totalizando 56 amostras. As coletas foram realizadas utilizando vagina artificial, previamente aquecida a 42 °C, com o uso de uma fêmea imobilizada como manequim. Imediatamente após a coleta, uma alíquota de 400 µL do ejaculado foi

diluída para criopreservação. Esta alíquota foi dividida em duas partes iguais, ambas diluídas em condições isotérmicas (1:1 v/v) em dois diluentes: **D1**, contendo o diluente Tris, com inclusão de 20% de gema de ovo e 5% glicerol; e **D2**, incluindo Tris, 20% de gema de ovo e 100 mM de trealose (Tonieto, 2008). A motilidade espermática foi aferida no sêmen fresco, imediatamente após a chegada da amostra no laboratório e, após o descongelamento. A avaliação da integridade da membrana espermática foi realizada antes do congelamento e após o descongelamento das amostras, através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP). As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha foram consideradas danificadas, conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). Após a coleta, alíquotas de 400 µL do ejaculado foram centrifugadas duas vezes a 12.500 rpm por 10 min. Do sobrenadante resultante, retirou-se 10 µL, sendo as amostras submetidas à desnaturação das proteínas em termociclador a 100 °C por 10 min. Foram feitas análises com géis de poliacrilamida (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA), concentrados a 15% (Maňásková & Jonáková, 2007), como padrão, foi utilizado o marcador BenchMark Protein Ladder® (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA). 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 (Nonlinear Dynamics, London, UK). Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o *software* Statistix 8.0®.

3. Resultados e Discussão

As médias para motilidade e integridade da membrana espermática pré-congelamento foram iguais a $71,3 \pm 13,9\%$ e $49,9 \pm 22,6\%$, respectivamente. Após o descongelamento, a motilidade foi igual a $21,0 \pm 18,8\%$, a integridade da membrana foi igual a $14,0 \pm 11,4\%$. As avaliações de qualidade seminal pós-descongelamento, por diluente, são mostradas na tab. 1.

Tabela1: Motilidade espermática e integridade da membrana espermática após o descongelamento por diluente.

Avaliação	D1	D2
Motilidade (%)	$18,6 \pm 2,31$	$23,4 \pm 2,67$
Integridade de membrana (%)	$12,6 \pm 1,35$	$15,3 \pm 1,67$

Média \pm erro padrão da média não diferem ($P > 0,05$)

D1 = Tris + gema de ovo + glicerol

D2 = Tris + gema de ovo + trealose.

De acordo com a análise inter-machos, na ausência da proteína com 24 kDa, a motilidade ($28,9 \pm 3,2$) e a integridade de membrana pós-descongelamento ($19,5 \pm 1,8$) foram maiores ($P < 0,05$) do que na sua presença ($17,5 \pm 1,9$ e $11,5 \pm 1,1$, respectivamente). Enquanto a ausência das proteínas com 11 e 45 kDa foi associada com maior integridade de membrana pré-congelamento ($P < 0,05$).

De acordo com a análise intra-machos, a presença da proteína com 45 kDa foi associada com menor percentual de integridade de membrana pré-congelamento, para o macho 1 ($P < 0,05$), porém com maior integridade de membrana, para o macho 2 ($P < 0,05$). Logo, a análise inter-machos indicou que as proteínas com 11, 24 e 45 kDa poderiam ser potenciais marcadores para infertilidade de machos ovinos com sêmen congelado. A ausência das proteínas com 11 e 45 kDa foi associada com maior integridade de membrana espermática pré-congelamento, enquanto que a ausência da proteína com 24 kDa foi associada com a motilidade e a integridade de membrana, ambas após o descongelamento. A proteína com 20 kDa também seria uma candidata para avaliação em futuros estudos, em função de que uma proteína com o mesmo peso molecular, denominada RSVP20, foi descrita como associada com maior motilidade espermática para sêmen ovino (Barrios *et al.*, 2005; Fernández-Juan *et al.*, 2006). No presente estudo, a proteína 20 kDa, no macho 4, foi associada com maior integridade de membrana pré-congelamento, quando ausente do plasma seminal, no entanto, quando presente, foi associada com maior motilidade pós-descongelamento.

4. Conclusão

As proteínas do plasma seminal ovino com peso molecular de 11, 24 e 45 kDa seriam potenciais marcadores para infertilidade com sêmen congelado, pois sua ausência foi associada com incremento na integridade da membrana espermática, pré-congelamento e pós-descongelamento, e na motilidade espermática pós-descongelamento, independentemente do efeito dos machos doadores de sêmen. Porém, há grande variação entre distintos indivíduos, não apenas na composição do plasma seminal, bem como na associação entre as proteínas do plasma seminal e indicadores de qualidade do sêmen congelado.

5. Referências

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGOS, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1531-1537, 2000.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. **Journal of Andrology**, v.27, p.588–595, 2005.

CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841-850, 2006.

FERNÁNDEZ-JUAN, M.; GALLEGOS, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.27, n.4, p.588-595, 2006.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.88, p.343-52, 1990.

MAŇÁSKOVÁ, P.; JONÁKOVÁ, V. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. **Journal of Reproductive Immunology**, v.78, p.40-48, 2007.

O' MEARA, C.M.; HANRAHAN, J.P.; PRATHALINGAM, N.S.; OWEN, J.S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; WADE, M.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Relationship between *in vitro* functional tests and *in vivo* fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.69, p.513-522, 2008.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.425–434, 2001.

RONCOLETTA, m.; FRANCESCHINI, p.h.; Hossepian de LIMA, V.f.m.; RODRIGUES, I.h.; OLIVEIRA, m.a.; SILVA, c. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v.36, 1999.

Statistix ®. **Statistix for Windows User's manual**. Tallahassee, FL: Analytical software; 2003.

TONIETO, Rafael Adolfo. **Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.