

IDENTIFICAÇÃO DE UM FATOR DE 28 KDA NO PLASMA SEMINAL ASSOCIADO À MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE MACHOS SUÍNOS

CORCINI, C.D.¹; REMPEL, F.J.K.¹; PIGOZZO, R.¹; MOREIRA, F.¹; VARELA JUNIOR, A.S.²; GOULARTE, K.L.¹; BRUM, V.*¹; BONGALHARDO, D.C.³; LUCIA, T. JR.¹

INTRODUÇÃO

Em função dos espermatozóides de suíno apresentar alta sensibilidade ao choque térmico, quando submetido ao processo de criopreservação, o emprego da inseminação artificial com sêmen congelado fica restrito a programas de melhoramento genético, pesquisas científicas ou para a formação de bancos de germoplasma, uma vez que o seu desempenho é inferior ao obtido com sêmen resfriado (13;15). Essa redução é caracterizada por taxas de parição reduzidas em 20-30% e por um tamanho de leitegada reduzido em 1 a 2 leitões (15). Fatores como: a fração do ejaculado usada na criopreservação; a raça, a nutrição, época do ano e a idade do macho doador do sêmen; e o efeito individual de cada macho afetam na qualidade do sêmen criopreservado também (7; 19; 20). Em função desses fatores, os protocolos disponíveis para o congelamento de sêmen suíno ainda não são eficientes para produzir resultados consistentes, como ocorre na espécie bovina (25).

Se considerar o efeito individual do macho como a maior influência sobre a variação na eficiência do processo de congelamento do sêmen suíno (7; 20), 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. Em suínos, estudos realizados que utilizaram o plasma seminal na concentração de 5 a 10% como um dos componentes do diluidor de congelamento, verificaram melhor viabilidade espermática pós-descongelamento quando os espermatozóides estavam em contato com plasma seminal de outros machos ou quando o plasma seminal apresentava as proteínas PSP-I, AWN2 e PSP-II nas concentrações de 2,1, 0,2 e 1,5 mg/mL. Essas proteínas seriam associadas com melhorias na congelabilidade do sêmen (4; 5; 12).

As proteínas do plasma seminal (PPS) tem papel essencial nas funções espermáticas como: a capacitação e reação acrossômica (18), bem como a motilidade espermática (8), e a integridade genômica (6). Estudos que visam caracterizar marcadores bioquímicos que possam identificar indivíduos com níveis distintos de qualidade de sêmen vem no intuito de poder classificar os machos conforme sua capacidade de suportar criopreservação de sêmen (congelabilidade) e potencial fertilidade em humanos (2), suínos (22), bovinos (14), peixes (24) e búfalos (1). Porém, a relação entre o conteúdo protéico do plasma seminal e a congelabilidade do sêmen pode ser relevante nesse contexto, uma vez que proteínas presentes no plasma seminal ligam-se às proteínas da membrana dos espermatozóides, provocando alterações bioquímicas (11).

Este trabalho teve por objetivo identificar polipeptídeos provavelmente associados à motilidade espermática de sêmen suíno submetido ao congelamento e descongelamento.

¹PIGPEL – Pesquisa, Ensino e Serviços em Produção de Suínos, Faculdade de Veterinária- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil, CEP-96010-900 .E-mail: caca_vet@hotmail.com; ² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande; ³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia– UFPel.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro machos suínos F1 (Landrace x Large White), 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). Os ejaculados foram coletados pelo método da mão enluvada, utilizando frascos de 10 mL aquecidos a 38° C e cobertos com filtro (10). Após a coleta do ejaculado, foram avaliados a motilidade (MOT) por microscopia ótica em aumento de 200x. Somente ejaculados com motilidade > 70% foram utilizados.

Imediatamente após a coleta, o ejaculado foi diluído separadamente em condições isotérmicas (1:1 v/v) no diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS). Após a diluição inicial foi feito o resfriamento a 15°C por 90 min. Quando o meio atingiu 15°C, foi realizada a centrifugação (800 x g por 10 min). O sedimento de espermatozóides foi re-suspenso no diluidor de resfriamento (DR) (80%, v/v, de solução de lactose a 11%; 20%, v/v, gema de ovo), 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 N,N Dimetilacetamida. A cada 2 mL de sêmen com DR, foi adicionado 1 mL de DC para que se obtivesse uma concentração final de 5% de DMA (3). 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 por 20 min. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C e armazenadas até o descongelamento. O descongelamento das palhetas foram a 37°C por 20s, sendo re-suspensas em tubo cônico contendo 5 mL de BTS previamente aquecido a 37°C (1:10, v/v) (19). Foi feita a incubação em banho-maria a 37 °C por 10 min e avaliados a MOT (0 a 100 %)(19).

Para análise das proteínas do plasma seminal dos ejaculados 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 min, para desnaturação das proteínas. A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) foi realizada com o sistema Bio-Rad Mini-Protean 3 cell® (16). Foram feitas corridas com géis de poliacrilamida concentrados a 15% (17), primeiramente, com uma voltagem de 70 V por 20 min, para promover a concentração das proteínas e, após, a 120 V por 70-80 min. Como padrão, foi utilizado o marcador molecular benchmark protein ladder®. Os géis foram corados com coomassie brilliant blue por 20 min (23). 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.

A variável motilidade espermática pré-congelamento e pós-descongelamento foi avaliada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. De acordo com este teste, esta variável não apresentou distribuição não normal ($P < 0,05$), tendo sido submetidas à transformação arco-seno. Para fins de interpretação, os resultados das análises envolvendo a variável transformada será relatada em sua escala original.

A análise inter-machos foi conduzida por análise de variância com medidas repetidas, considerando como variáveis independentes a coleta e a PSP identificada. A análise intra-machos foi feita através de análise de variância convencional, para cada um dos quatro machos avaliados, considerando como variáveis independentes a PSP, incluindo ainda a coleta como co-variável. Nos dois tipos de análises, as comparações entre médias foram realizadas através do teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do software Statistix 8.0® (21).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média geral para a motilidade espermática foi de $71,4 \pm 8,5\%$ pré-congelamento e após o descongelamento, a motilidade espermática foi de $41,8 \pm 18,6\%$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Motilidade de espermatozoides suínos pré e pós- congelamento, por macho (4 machos x 6 coletas)

		Motilidade pré-congelamento (%)	Motilidade pós-descongelamento (%)
Macho	A	$61,7 \pm 1,2^b$	$20,8 \pm 1,7^c$
	B	$75,9 \pm 1,2^a$	$38,3 \pm 1,7^b$
	C	$74,2 \pm 1,2^a$	$50,8 \pm 1,7^a$
	D	$74,2 \pm 1,2^a$	$57,5 \pm 1,7^a$

Médias \pm EPM com expoentes diferentes na coluna diferem por $P < 0,05$

A presença da proteína do plasma seminal com peso molecular de 28 kDa foi associada com aumento na motilidade espermática pré- congelamento em todos os machos (Figura 1), porém teve efeito inibidor na motilidade pós-descongelamento. Esta proteína, cuja ausência, também nos machos C e D, foi associada com maior motilidade espermática pós-descongelamento, mas esse efeito não foi confirmado na análise inter-machos. No entanto, a análise inter-machos identificou uma associação entre a ausência dessa mesma proteína e a motilidade pré-congelamento, o que sugere que tal proteína possa ter um efeito positivo na motilidade antes do congelamento, e inibidor após o descongelamento.

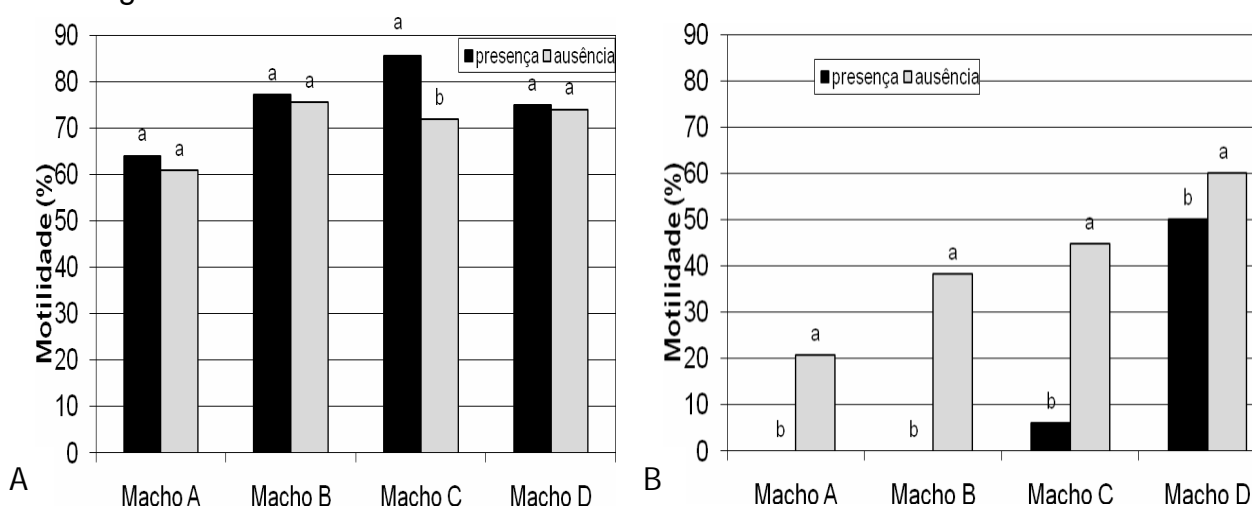


Figura 1 - Motilidade espermática pré-congelamento (A) e pós-descongelamento (B) em função da presença da proteína com 28 kDa no plasma seminal de diferentes machos a,b Freqüências diferem por $P < 0,05$ em cada macho.

A proteína do plasma seminal com peso molecular de 26 kDa foi descrita como potencial marcador de fertilidade em suínos, pois a sua presença estaria associada com maiores taxas de parição e tamanho da leitegada, utilizando sêmen resfriado (9). Essa

proteína do presente estudo pode ser a mesma descrita como marcador de fertilidade devido a utilização do presente estudo de plasma seminal in natura diferente de outros que utilizam plasma seminal congelado, promovendo uma grande variação na qualidade das bandas conforme teste realizados anteriormente a este experimento.

CONCLUSÃO

Os avanços na pesquisa do conteúdo protéico do plasma seminal possibilitaram a identificação da proteína com 28 kDa como um possível futuro marcador para uma motilidade espermática de machos suínos, dependendo da empregabilidade deste sêmen se for resfriado a proteína deve estar presente e ao contrário se for submetido a criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASADPOUR, R., ALAVI-SHOUSHTARI, S.M., ASRI REZAI, S., ANSARI, M.H.KH. SDS- polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, suppl. v.102, p. 308 – 313, 2007.
2. AUTIERO, M., SANSONE, G., ABRESCIA, P., 1991. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology** v. 12, p. 191 – 200, 1991.
3. 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** 69, 632 – 638, 2008.
4. CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., CENTURIÓ, F., RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H., PARILLA, I., ROCA, J., CUELLO, C., MARTINEZ, E.A. Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals** 39, 370 – 375, 2004.
5. CENTURION, F., VAZQUEZ, J.M., CALVETE, J.J., ROCA, J., SANZ, L., PARRILLA, I., GARCIA, E.M., MARTINEZ, E.A. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biology of Reproduction** 69, 640 – 646, 2003.
6. CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H. et al. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v.124, p.491-499, 2002.
7. CORCINI, C.D. Perfil protéico do plasma seminal de suínos e sua associação com a qualidade do sêmen congelado. 74 pp. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS – 2008.
8. CURI, S.M.; ARIAGNO, J.I.; CHENLO, P.H. et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. **Arch. Androl.**, v.49, p.343-349, 2003.
9. FLOWERS, W.L. Relation between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**. p. 1-4, 2001.
10. HANCOCK, J.L., HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record** 71, 664 – 665, 1959.
11. HENAULT, M.A., KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** 108, 199 – 204, 1996.
12. HERNÁNDEZ, M., ROCA, J., CALVETE, J.J., SANZ, L., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., VAZQUEZ, J.M., MARTÍNEZ, E.A. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the

- presence of seminal plasma from good freezer boars. **Journal of Andrology** 28, 689 – 697, 2007.
13. 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.
14. JOBIM, M.I.M., OBERST, E.R., SALBEGO, C.G., SOUZA, D.O., WALD, V.B., TRAMONTINA, F., MATTOS, R.C., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology** 61, 255 – 266. 2004.
15. JOHNSON, L.A., WEITZE, K.F., FISER, P., MAXWELL, W.M.C., Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science** 62, 143 – 172. 2000.
16. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 227, 680 – 685, 1970.
17. MANÁSKOVÁ, P., JONÁKOVÁ, V. 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). 2007.
18. MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **J. Reprod. Immunol.**, v.53, p.109-119, 2002.
19. PEÑA, F.J., SARAIVA, F., NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? **Animal Reproduction Science** 93, 101 – 113, 2006.
20. ROCA, J., HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, G., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal Animal Science** 84, 2692 – 2699, 2006.
21. Statistix ®. Statistix for Windows User's manual. Tallahassee: Analytical software; 2003.
22. STRZEZEK, J., SAIZ-CIDONCHA, F., WYSOCKI, P., TYSKIEWICZ, A., JASTRZEBSKI. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports** 22, 255 – 266, 2002.
23. 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.
24. ZILLI, L., SCHIAVONE, R., ZONNO, V., ROSSANO, R., STORELLI, C., VILELLA, S. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. **Biology of Reproduction** 72, 1262 – 1267, 2005.
25. WATSON, P.F. the causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science** v. 60, p. 481 – 492, 2000.