

# IDENTIFICAÇÃO DE UM FATOR DE 26 kDa NO PLASMA SEMINAL SUÍNO ASSOCIADO A INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES APÓS O DESCONGELAMENTO

Bianchi, I.<sup>1\*</sup>; Collares, T.<sup>2</sup>; Campos, V.F.<sup>2</sup>; Cavalcanti, P.V.<sup>2</sup>; Calderam, K.<sup>1</sup>; Maschio, E.F.<sup>1</sup>; Corrêa, E.K.<sup>1</sup>; Lucia, T.Jr.<sup>1</sup>; Deschamps, J.C.<sup>1</sup>; Corrêa, M.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>PIGPEL: Ensino, Pesquisa e Serviços em Produção de Suínos. Centro de Biotecnologia - UFPEL, Campus Universitário s/n, CEP 96010-900, Pelotas, RS. \*E-mail: [ivan.bianchi@pfizer.com](mailto:ivan.bianchi@pfizer.com)

<sup>2</sup>EMTA: Grupo de Pesquisa em Embriologia Molecular e Transgênese Animal

**PALAVRAS CHAVES:** Proteínas seminais, Criopreservação, Sêmen, Marcador bioquímico.

## INTRODUÇÃO

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fertilização (7). O plasma seminal contém diferentes componentes, entre estes, proteínas, as quais são os maiores constituintes orgânicos do fluido seminal, apresentando fundamental importância fisiológica ao sêmen, estando presente na forma de distintos complexos associados. A composição, a conformação e o tamanho destas proteínas são específicos para cada espécie, as quais são estáveis também sob determinadas condições (4). A membrana plasmática do espermatozóide sofre extensas remodelações quando o espermatozóide interage com proteínas do plasma seminal durante a ejaculação (9). Desta forma, com a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies, alguns desses polipeptídeos vêm sendo utilizados como marcadores seletivos de fertilidade e de congelabilidade do sêmen (5). Roncoletta *et al.* (10) demonstraram que a presença de um fator polipeptídico de 61 kDa no plasma seminal está associado com a alta congelabilidade do sêmen de touros da raça Gir. Este trabalho teve por objetivo identificar polipeptídeos provavelmente associados à integridade de membrana plasmática de sêmen suíno submetido ao congelamento e descongelamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizada 6 coletas de cada um de três machos suínos adultos mantidos sob as mesmas condições ambientais e de manejo. Somente a porção do ejaculado com maior concentração espermática foi utilizada para o processo de congelamento (13). Imediatamente após a coleta do sêmen, para cada macho foi obtida da fração rica em espermatozóides uma alíquota de 20 ml em tubo cônico de 50 ml, e diluída (1:1, v/v) no diluente BTS. Após a diluição inicial foi feito o resfriamento por 60 min a 24 °C, e seguiu-se o resfriamento por mais 60 min até 15 °C, quando então foi feita a centrifugação a 800 x g por 10 min (SORVALL®RC6). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de espermatozóides 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 450 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/ml. O resfriamento foi realizado durante 90 min até 5 °C. No processo de congelamento foi utilizada a N,N-Dimetilacetamida (DMA) 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% do detergente Orvus Ex Paste, e o respectivo crioprotetor para concentração final de 5%, v/v, (DMA 5%). O envase das doses de sêmen foi feito em palhetas de 0,5 ml, com 150 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/palheta. As palhetas foram congeladas horizontalmente, 5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido, por 20 min, sendo após armazenadas 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). Uma alíquota de sêmen após a coleta foi centrifugada (2000 x g, 10 min, 4 °C) para obter o plasma seminal. Para a análise as amostras de sêmen foram descongeladas e recentrifugadas (3000 x g, 10 min, 4 °C). O plasma seminal foi diluído três vezes em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Cada amostra foi preparada para a corrida em eletroforese com 50 µl de plasma seminal e 25 µl de tampão de amostra (Glicerol; Tris-Hcl 0,6173M - pH 6,8; B-mercaptoetanol; SDS 10%; azul-de-bromofenol; H<sub>2</sub>O), após foram submetidas à fervura por 10 min para desnaturação protéica. A eletroforese unidimensional SDS-PAGE (8) foi realizada, utilizando-se géis concentrados a 15%. As amostras foram concentradas a 50 V por 20 min, e a corrida a 100 V por aproximadamente 2 h. Os géis foram corados a temperatura ambiente com *Coomassie Brilliant Blue* em *over-night*. Os géis foram analisados com o software TotalLab TL 100 v. 2006. Após o descongelamento foi feita a avaliação da integridade de membrana plasmática espermática (IMP) por fluorescência (3). Após o descongelamento das palhetas foi feita a distribuição de frequências dos resultados de IMP dos espermatozóides 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 protéica no plasma seminal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram detectadas nove bandas protéicas no perfil eletroforético do plasma seminal dos machos analisados. O peso molecular das bandas variou de 11 a 122 kDa. Uma banda de 26 kDa (Figura 1) apresentou uma associação com a IMP. Foi observado que, em 88% das amostras que apresentavam IMP ≥ 55%, a banda de 26 kDa estava ausente (Tabela 1). Por outro lado, não foi observada a associação de outras bandas detectadas com a integridade de membrana. O plasma seminal contém fatores protéicos específicos que provocam importantes efeitos tanto na capacidade de fertilização do espermatozóide quanto na fisiologia reprodutiva da fêmea (11). Entretanto, os efeitos biológicos específicos das proteínas do plasma seminal nas funções espermáticas são complexos e não compreendidos totalmente. Nos bancos de dados *in silico* foi

encontrado um grupo protéico com peso molecular de aproximadamente 26 kDa chamado *Sialoproteínas*, que tem por função a inibição da aglutinação das cabeças dos espermatozoides. A deficiência deste grupo pode comprometer o potencial espermático de fertilização (12). Usando eletroforese bidimensional (2D-PAGE), Flowers (1) demonstrou a importância biológica de duas proteínas (26 kDa, pl 6,2; 55 kDa, pl 4,8) presentes no plasma seminal de suínos, relacionadas com altas taxas de parição (em torno de 86%). Killian *et al.* (6) associaram quatro proteínas do plasma seminal com a fertilidade de touros, sendo que duas proteínas (26 kDa, pl 6,2; 55 kDa, pl 4,5) foram detectadas em touros de alta fertilidade e outras duas (16 kDa, pl 4,1; 16 kDa, pl 6,7) estavam presentes em touros de baixa fertilidade. Jobim *et al.* (5) demonstraram 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. O uso de marcadores bioquímicos para a identificação de propriedades biológicas do sêmen poderá ajudar a desenvolver novos critérios que são precisos e objetivos na predição e melhoramento da fertilidade de machos (2).

### CONCLUSÃO

Neste estudo é demonstrada a associação de um fator polipeptídico que possui 26 kDa, com a baixa integridade de membrana plasmática do espermatozoide suíno após o congelamento/descongelamento.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**, USA, 2001, p.1-4.
2. FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A. et al. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. **Reprod. Biol.**, v.6, p.5-20, 2006.
3. 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.
4. JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.32, p.99-107, 2003.
5. JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.253-266, 2004.
6. KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1202-1207, 1993.
7. KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **J. Reprod. Immunol.**, v.65, p.33-46, 2005.
8. LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.5, p.677-680, 1970.
9. MANÁSKOVÁ, P.; BALINOVA, P.; KRAUS, M. et al. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. **A. J. Reprod. Immunol.**, v.50, p.399-410, 2003.
10. RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.H. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazil. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, 1999.
11. STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W. et al. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reprod. Biol.**, v.5, p.279-290, 2005.
12. STRZEZEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P. et al. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Anim. Sci. Pap. Rep.**, v.20, p.255-266, 2002.
13. WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.**, v.82, p.261-267, 1975.

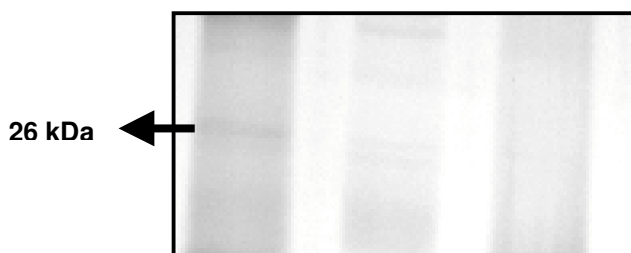


Figura 1. Banda de 26 kDa do plasma seminal suíno.

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

Macho	Perfil	Banda, kDa, n (%)								
		122	96	85	63	43	26	17	14	11
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)