

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL NA INTEGRIDADE DE ACROSSOMA DE SÊMEN OVINO CONGELADO

GONÇALVES, Alexander de Oliveira¹; GOULARTE, Karina Lemos²; CORCINI, Carine Dahl²; GASTAL, Gustavo Desire Antunes¹; SCHIAVON, Raquel Schiavon¹; SCHNEIDER, Jonas Rafael¹; LUCIA, Thomaz, Jr².

^{1,2}Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária/UFPeI
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900 xander_goncalves@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Biotécnicas de reprodução assistida, tais como a inseminação artificial (IA), foram introduzidas na ovinocultura com o objetivo de acelerar o ganho genético de animais superiores, visando o incremento da eficiência reprodutiva (SMITH, 1986). A criopreservação do sêmen amplia as vantagens da IA, permitindo a eliminação do contato físico entre animais e limitando a proliferação de doenças sexualmente transmissíveis. Porém, a IA não é amplamente utilizada na espécie ovina, em função de diversos fatores limitantes: a anatomia da cérvix ovina que impede a passagem de cateteres; a ausência de uma técnica de IA eficaz, simples e de baixo custo; e a limitação dos métodos de avaliação da qualidade de sêmen criopreservado para estimar a capacidade fecundante das células espermáticas (NAQVI et al., 1998; LUZ et al., 2000).

A baixa fertilidade com sêmen congelado é atribuída, em geral, às alterações na estrutura das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, em função da ocorrência de choque térmico durante o processo de criopreservação (PARKS & GRAHAM, 1992). Sendo assim, a reduzida fertilidade obtida com sêmen ovino congelado pode ser atribuída a diversos processos ocorridos durante a criopreservação, como o choque térmico, o estresse osmótico e o efeito citotóxico decorrente da adição e remoção de substâncias crioprotetoras, além da desidratação celular e formação de cristais de gelo (WATSON, 2000).

Algumas proteínas identificadas no plasma seminal podem ser associadas com a congelabilidade do sêmen (JOBIM et al., 2003; RONCOLETTA et al., 1999) e com algumas características espermáticas (ROMITTO et al., 2003). Desta forma, a detecção de fatores protéicos do plasma seminal que possam ser empregados como marcadores bioquímicos pode ser usada como um critério para a predição da fertilidade masculina (FRASER et al., 2006), bem como, torna-se essencial para a identificação de propriedades e funções de proteínas envolvidas nos mecanismos de regulação das funções do trato reprodutivo masculino (STRZEZEK et al., 2005). Portanto, o estudo do perfil protéico do plasma seminal de machos ovinos seria

justificado pela possível identificação de bandas protéicas, cuja presença ou ausência, possa ser associada com parâmetros de qualidade seminal.

O presente estudo objetivou avaliar o perfil protéico do plasma seminal de machos ovinos, identificando marcadores associados com a qualidade do sêmen após o descongelamento.

2. MATERIAS E MÉTODOS

Foram realizadas oito coletas de sêmen de sete machos ovinos, 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.

A avaliação da integridade do acrossoma foi realizada somente após o descongelamento, com base na técnica descrita por Kawamoto et al. (1999). Inicialmente, amostras de 20µL foram centrifugadas a 86 x g por 10min, sendo o sobrenadante desprezado. Após, o pellet era re-suspenso em 80 µL de PBS (Phosphate Buffer Saline) a 1%, sendo a amostra agitada e centrifugada novamente a 16000 x g por 10min. O sobrenadante era novamente desprezado e o pellet resultante re-suspenso em 20 µL de PBS. A partir dessas amostras, foram confeccionados esfregaços em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram submersas em álcool etílico absoluto 95,55% por 5min, sendo novamente lavadas em PBS. Em uma sala escura, adicionaram-se às amostras, por 10min, 20 µL de Lectin from *Arachis hypogaea* FITC Conjugate (20 mg/mL). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas. Após esse procedimento, adicionaram-se 10 µL de solução de Glicerol com PBS (9:1 v/v). As lâminas foram avaliadas sob aumento de 1000 x, em microscópio de epifluorescência, em filtro WU com excitações de 450-490nm e emissão de 520nm. Após a contagem de 100 espermatozoides por lâmina, foram consideradas células com acrossoma integro aquelas que apresentavam fluorescência verde no acrossoma. Quando toda a célula não era corada e a coloração verde não era aparente, foi considerado que o acrossoma não estava íntegro ou havia sofrido a reação acrossômica.

Para caracterização das proteínas do plasma seminal (PPS), após a coleta, alíquotas de 400µl do ejaculado foram centrifugadas duas vezes a 5.250 x g por 10min. Do sobrenadante resultante, retirou-se 10µl, aos quais foram adicionados 20µl de H₂O deionizada e 15µl de tampão de amostra constituído de: 20% de Glicerol; 10% TRIS-HCl 0,6173M, pH 6,8 ; 2% β-Mercaptoetanol; 20% SDS o de sódio a 10%); 2,5mg de Azul de bromofenol; e H₂O deionizada. As amostras foram submetidas à desnaturação das proteínas em termociclador a 100°C por 10min.

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 & JONÁKOVÁ, 2007), primeiramente, com voltagem de 70V por 20min, para promover a concentração das proteínas e, após, a 140V por 70-80min, para promover a separação das mesmas. Como padrão, foi utilizado o marcador BenchMark Protein Ladder[®]. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue por 20min a 60°C (SYNTIN *et al.*, 1996). O descoramento dos géis foi feito em solução constituída por: 40% de metanol; 10% de ácido acético glacial; e 50% de H₂O deionizada, por 1h, em banho-maria a 60°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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A integridade do acrossoma pós-descongelamento foi associada com as bandas com 18 e 21 kDa ($P < 0,05$, para todas as bandas). A presença da banda com 18 kDa foi relacionada com maior integridade do acrossoma ($24,6 \pm 3,2\%$) do que nos ejaculados sem esta banda ($14,7 \pm 2,4\%$), para o macho 4. A ausência da banda com 21 kDa, para o macho 7, foi associada com maior integridade do acrossoma ($25,1 \pm 2,2\%$) em comparação com ejaculados com presença desta banda ($8,0 \pm 1,0\%$). Para o macho 5, a ausência da banda com 21 kDa implicou em maior integridade do acrossoma ($25,3 \pm 2,6\%$) em comparação com a ausência desta banda ($13,3 \pm 2,4\%$).

A análise intra-machos permitiu avaliar como uma mesma proteína atua em diferentes indivíduos. Algumas das proteínas identificadas apresentaram efeito semelhante com relação a parâmetros de qualidade seminal, em diferentes machos. Na análise intra-machos, as proteínas com 18 e 21 kDa foram associadas com a integridade do acrossoma, em indivíduos distintos. Em suínos, a presença de uma proteína com 80 kDa foi associada com integridade do acrossoma pós-descongelamento em torno de 70%, apenas em um macho com qualidade seminal inferior aos demais indivíduos incluídos no estudo (CORCINI, 2008).

Outro fator que merece ser investigado futuramente é a proteína com 18 kDa cuja presença no plasma seminal foi associada com maior integridade de acrossoma no macho 4. Supondo que esta proteína seja a mesma identificada em eqüinos como sendo associada negativamente com a fertilidade (BRANDON *et al.*, 1999), estes resultados seriam contraditórios.

Em um estudo realizado com bovinos da raça Nelore, a proteína com 18 kDa se apresentou nos touros mochos, com 100% de aptidão reprodutiva (CHACUR *et al.*, 2006). Neste mesmo estudo foi encontrado uma proteína com 20 kDa, esta estava presente em 100% nos géis das eletroforeses dos touros da variedade padrão. Sendo a de 20 kDa descrita como seminalplasmin, e relatada como promotora de alta fertilidade e proteção à membrana plasmática dos espermatozoides de ovinos submetidos ao choque térmico (BARRIOS *et al.*, 2000).

4. CONCLUSÃO

As proteínas do plasma seminal ovino com peso molecular de 18 e 21 kDa podem ser um possível marcador bioquímico de integridade de acrossoma.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage of ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, New York, v.63, p.1531-1537, 2000.
- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-873, 1999.

CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; NETO, N. B. M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos Taurus Indicus*). **Vet Not**, Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 87-93, jan.-jun. 2006.

CORCINI, Carine Dahl. **Perfil protéico do plasma seminal de suínos e sua associação com a qualidade do sêmen congelado**. 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

FRASER, L.; WYSOCKI, P.; CIERESZKO, A.; PLUCIENNICZAK, G.; KOTLOWSKA, M.; KORDAN, W.; WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.; STRZEZEK, J. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen.

Reproductive Biology, v.6, p.5-20, 2006.

JOBIM, M. I. M. ; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; MATTOS, R.C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do semen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, RS, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

KAWAMOTO, A., KAZUTOMO, O., KISHIKAWA, H., ZHU, L., AZUMA, C., MURATA, Y. Two-color fluorescent staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v.71, p. 497 . 501, 1999.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONCALVES, P.B.D. Parametros utilizados na avaliacao do semen congelado ovino para inseminacao laparoscopica.

Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science, v.37, p.10-18, 2000.

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.

NAQVI, S.M.K.; JOSHI, A.; BAG, S.; PAREEK, S.R.; MITTAL, J.P. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malapura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**, v.29, p.329-333, 1998.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p.209.222, 1992.

ROMITTO, G.C. **Perfil bidimensional das proteínas de plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. 2003. 192f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do semen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.36, 1999.

SMITH, C. Use of embryo transfer in genetic improvements of sheep. **Animal Production**, v.42, p.81-88, 1986.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRAZER, L. Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction.

Reproduction Biology, v.5, p.279-290, 2005.

WATSON, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproductive Science**, v.61, p.481-92, 2000.

