

PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS À CONGELABILIDADE DO SÊMEN SUÍNO

(Seminal plasma proteins associated with boar semen freezability)

Tatyane Bandeira Barros, Daiany Barbosa Guimarães, Alina Viana Dias, Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura, Lina Raquel Santos Araújo, Ricardo Toniolli

Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

*Corresponding author: ricardo.toniolli@uece.br

Editor de Seção: Gilson Pessoa

RESUMO - Esse trabalho objetivou identificar as proteínas do plasma seminal que estejam relacionadas com a proteção espermática durante o processo de criopreservação. Amostras de sêmen de 14 varrões foram coletadas e duas alíquotas foram separadas e destinadas à criopreservação do sêmen e ao estudo proteômico do plasma seminal. Os ejaculados foram submetidos a uma curva de resfriamento lenta. O sêmen descongelado foi ressuspenso e analisado quanto ao vigor e motilidade. Para o estudo das proteínas do plasma seminal, estes foram submetidos à eletroforese bidimensional. Os géis foram corados, digitalizados e analisados por meio do aplicativo PDQuest. Para a busca por marcadores de congelabilidade, foi feita uma divisão dos animais em dois grupos: congelabilidade boa (GFEs) e ruim (PFEs), segundo os resultados de vigor e motilidade após a descongelação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Seis animais foram considerados do grupo GFEs e apresentaram uma média para vigor e motilidade espermática de $2,2 \pm 0,8$ e $41,8 \pm 22,9$, respectivamente, enquanto o grupo PFEs foi composto por oito animais que apresentaram média de $1,9 \pm 0,6$ de vigor espermático e $26,8 \pm 17,5$ de motilidade espermática. Foram encontrados 28 spots que divergiram significativamente entre os grupos, correspondendo a 16 proteínas. Dois desses foram expressos com maior intensidade no grupo GFEs, e correspondeu a apenas uma proteína característica do plasma seminal, a *Carbohydrate-binding protein*. Assim, conclui-se que a *Carbohydrate-binding protein* pode ser utilizada como um marcador de congelabilidade para a espécie suína.

Palavras-chave - Congelação; marcadores; proteínas; plasma seminal; suíno.

ABSTRACT - This study aimed to identify proteins in seminal plasma that are related to sperm protection during the cryopreservation process. Semen samples from 14 boars were collected and two aliquots were separated and subjected to cryopreservation of semen and seminal plasma proteomic study. The ejaculates were subjected to a slow cooling curve. The thawed semen was resuspended and analyzed for vigor and motility. To study the seminal plasma proteins, they were obtained by centrifugation as whole semen and subjected to two-dimensional electrophoresis. The gels were stained, scanned, and analyzed using the PDQuest application. To search for markers freezability was made a division of the animals into two groups: good freezability (GFEs) and bad (PFEs), through the results of vigour and motility after thawing. The experimental design was completely randomized. Six animals were considered GFEs the group and had a mean sperm motility and vigor to 2.2 ± 0.8 and 41.8 ± 22.9 , respectively, while the PFEs group consisted of eight animals had an average of 1.9 ± 0.6 to 26.8 ± 17.5 vigor and sperm motility. Twenty-eight spots were found that differed significantly between

Recebido em 28/01/2021
Aprovado em 21/10/2021



groups, corresponding to 16 proteins. Two of these were expressed with greater intensity in GFEs and corresponded to only one protein of seminal plasm, the *Carbohydrate-binding protein*. So, concluded that *Carbohydrate-binding protein* can be used as a freezer marker for the swine species.

Keywords - Freezing; markers; proteins; seminal plasm; swine.

INTRODUÇÃO

As biotécnicas reprodutivas aplicadas à suinocultura têm resultado em desenvolvimento do setor, permitindo maiores ganhos genéticos e econômicos com o aperfeiçoamento da técnica de inseminação artificial. Trabalha-se atualmente o conceito da genética líquida, que consiste na aquisição de doses de sêmen resfriado de centrais de inseminação para fins de melhoramento genético do plantel, em vez da aquisição de reprodutores, reduzindo assim riscos sanitários (Fisher et al., 2019). No entanto, esta proposta está restrita a alguns estados do país, pois trabalha-se com o sêmen suíno resfriado, envolvendo cuidados em seu manuseio, transporte, temperatura de armazenamento e viabilidade das doses, que é mais curta quando comparada a um sêmen criopreservado.

A criopreservação permite a conservação de ejaculados de animais de alto valor genético por tempo indeterminado (Toniolli et al., 2009b), reduzindo custos de manutenção de reprodutores, uma vez que se possa adquirir sêmen congelado com qualidade comprovada (Castelo et al., 2008). Estudos da criopreservação nas últimas três décadas, resultaram em avanços na aplicação dessa biotécnica, no entanto o emprego do sêmen congelado na espécie suína, apresenta índices produtivos insatisfatórios (Johnson, 1998), assim sendo, uma previsão antecipada da boa congelabilidade de um ejaculado, permitiria a seleção prévia de reprodutores suínos, o que poderia melhorar os resultados de fertilidade do sêmen assim conservado.

A utilização do sêmen suíno criopreservado seria um salto importante para o melhoramento genético principalmente em plantéis menores (Yeste, 2017). Neste sentido, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de viabilizar essa biotécnica, tanto propondo novos protocolos de congelação, como estudando os componentes do plasma seminal e suas propriedades sobre a criopreservação da célula espermática suína, inclusive levando em consideração as variações individuais dos reprodutores (Bianchi et al., 2011; Fernandez-Gago et al., 2013; Yeste, 2017).

Vários são os fatores que podem levar a essa variação individual, entre eles os componentes do plasma seminal (Bianchi et al., 2011). As secreções provenientes das

glândulas sexuais acessórias são capazes de aumentar a capacidade de fertilização do sêmen (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). Elas afetam a capacitação espermática, a reação acósmica (Fernandez-Gago *et al.*, 2013), a motilidade (Li *et al.*, 2018), a integridade do DNA (Chen *et al.*, 2002) e a interação com o oócito (Recuero *et al.*, 2019). Contudo, as diferenças individuais no conteúdo desses componentes no plasma seminal, em sua maioria proteínas, podem explicar as diferenças na qualidade da congelação do ejaculado (Li *et al.*, 2018).

O estudo do proteoma do plasma seminal e da membrana da célula espermática tem revelado centenas de proteínas que podem ou não estar relacionadas a boa ou a má congelação do sêmen, cabendo então a identificação de possíveis marcadores de fertilidade e/ou congelação do sêmen suíno (Strzezek *et al.*, 2005). A indicação desses marcadores permite ao criador redução de custos, já que ao saber que o ejaculado de um animal pode não apresentar bons resultados de congelação, evita-se os custos com a criopreservação do sêmen deste animal. Assim, esse trabalho objetivou estudar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e da membrana espermática de ejaculados suíno e comparar os perfis proteicos a fim de encontrar possíveis marcadores de congelação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, Coleta e Avaliação dos ejaculados *in natura*

A cada semana, o sêmen de 5 varrões foi coletado, sendo retiradas duas alíquotas de cada ejaculado, destinadas à criopreservação do sêmen e ao estudo proteômico do plasma seminal. Um total de 14 varrões foram utilizados para esse estudo, e cada varrão teve seu sêmen coletado 5 vezes ($n = 70$). Os experimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal, registrado sob o número 11518234-9/72 (CEUA/UECE).

Os animais utilizados para o estudo foram provenientes do Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen, localizado na Faculdade de Veterinária, na Universidade Estadual do Ceará (animais Dalland) e da Granja Suinícola Xerez S/A (animais TOPIGS) no Município de Maranguape, Ceará. Eles apresentavam idade variando entre 12 e 24 meses e encontravam-se em sistema rotineiro de coleta de sêmen (coletas semanais). Os animais eram alimentados com ração balanceada de boa qualidade, com os níveis proteicos, energéticos e minerais dentro dos padrões estipulados para

reprodutores em sistema de trabalho (3.150 Kcal e 14% de PB; 2,5 Kg/dia em dois arraçoamentos).

Antes de cada coleta, foi realizada a higienização do prepúcio com água corrente, seguida de esgotamento prepucial por pressão manual no sentido caudo-cranial e secagem da região com papel toalha descartável. Para a coleta do sêmen foi empregada a técnica da mão enluvada (Hancock e Hovell, 1959) com utilização de manequim, sendo aproveitado o ejaculado total, após a separação da parte gelatinosa, com o sêmen colhido em recipiente plástico, coberto por filtro e protegido em copo térmico de coleta aquecido a 37 °C. Após a coleta, o ejaculado foi levado ao laboratório para as análises.

Cada ejaculado in natura foi avaliado através das seguintes características: volume (mL, em balança digital de precisão), concentração ($\times 10^6$ sptz / mL, em espectrofotômetro Minitub do Brasil para sêmen suíno), total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptz, é o volume x concentração), vigor espermático (notas de 0 a 5 – Toniolli et al., 2009a), motilidade espermática (valores de 0 a 100% - Martin Rillo et al., 1996). Apenas os ejaculados que apresentaram vigor $\geq 3,5$ e motilidade $\geq 85\%$, foram utilizados para o experimento.

CRIOPRESERVAÇÃO

Resfriamento e congelação do sêmen

De cada ejaculado foi retirado um total de $2,5 \times 10^9$ sptz incubados inicialmente sob a forma in natura a 30 °C por 15 minutos. Após este período foi realizada uma pré-diluição no diluente Beltsville Thawing Solution (BTS®) a uma proporção de 3 : 1 (diluente: sêmen), os quais já se encontravam previamente aquecido a 30 °C. A curva de congelação utilizada ocorreu conforme descrito por Barros et al. (2015).

Descongelação, Análises e Grupos experimentais

Para a descongelação, cada palheta foi aquecida à uma temperatura de 37 °C, durante 50 segundos em banho-maria e em seguida seu conteúdo foi adicionado em 2 mL do diluente de ressuspenção (BTS®) em tubo de ensaio também a 37 °C. O sêmen ressuspenso permaneceu à esta temperatura por 10 minutos, em seguida foi analisado quanto ao vigor espermático (0 a 5 – Toniolli et al., 2009) e motilidade espermática (0 a 100% - Martin Rillo et al., 1996). Para tanto, foi utilizada uma alíquota 15 µL do sêmen ressuspenso, colocada entre lâmina e lamínula e analisada em microscopia óptica com aumento de 200x.

De acordo com os resultados dessas análises, os ejaculados foram separados em dois grupos: o de congelabilidade boa (GFEs - Good Freezability Ejaculates) e o de congelabilidade ruim (PFEs - Poor Freezability Ejaculates). Esta separação foi feita através dos resultados do vigor e motilidade espermática, onde foram utilizados valores mínimos de vigor $\geq 2,0$ e de motilidade $\geq 40\%$ para serem considerados do grupo de congelabilidade boa e os demais foram considerados de congelabilidade ruim (Casas *et al.*, 2010).

ANÁLISE PROTEÔMICA

Para o protocolo de proteômica, imediatamente após a avaliação do sêmen in natura, alíquotas de sêmen totalizando 10×10^9 sptz foram separadas em tubo de ensaio de 50mL contendo o inibidor de protease phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) até atingir uma proporção de 0,5% (v/v). O sêmen juntamente com o inibidor de protease foi centrifugado a 700 g, 4 °C por 10 minutos, para separação das células espermáticas do plasma seminal. O plasma seminal foi retirado e novamente centrifugado a 10.000 g, 4 °C por 60 minutos. Em seguida, do sobrenadante foram retiradas 3 alíquotas de 2 mL cada, acondicionadas em microtubos a -80 °C.

Quantificação da concentração de proteína total no plasma seminal

Uma alíquota de cada amostra do plasma seminal foi descongeladas a temperatura ambiente e quantificadas quanto a concentração de proteínas total, seguindo o protocolo de Bradford (1976), utilizando como solução padrão a albumina séria bovina.

Eletroforese bidimensional de proteínas do plasma seminal

Um volume do plasma seminal contendo 750 µg de proteína total foi adicionado ao tampão de hidratação (8M uréia, 1M tiouréia, 2% CHAPS, 10% glicerol, 2% anfólitos na faixa de pH 3 a 10 não linear, 25 mM DTT e 0,002% de azul de bromofenol) em uma quantidade suficiente para 450 µL. Essa solução foi adicionada às canaletas da bandeja de hidratação e incubada com tiras de gradiente de pH immobilizado (GE Healthcare, USA) de 24 cm, com faixa de pH não linear de 3 a 10, por um período de aproximadamente 20 horas (Bradford, 1976; Souza *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2010).

A focalização isoelétrica foi conduzida em um equipamento IPGphor III (GE Lifesciences, USA) com a seguinte programação: 200V (120 min.), 1000V (60 min. gradiente), 1000V (30 min.), 7000V (180 min. Gradiente), 7000V (70000 Vh) e 100V (12:30

h.), totalizando 64.700 Vh. Após a focalização, as tiras foram equilibradas no tampão de equilíbrio I (6M uréia, 50mM Tris- HCl pH 8,8, 29, 3% glicerol, 2% SDS e 1% DTT) por 15 minutos e em seguida incubadas por mais 15 minutos com a solução de equilíbrio II (mesma composição da solução I, substituindo-se o DTT por 2,5% de iodoacetamida). Após a etapa de equilíbrio, as tiras foram posicionadas no topo de géis homogêneos de poliacrilamida (12,5%) e fixadas em agarose (5% em SDS-PAGE tampão de corrida). O conjunto foi submetido à corrida eletroforética a 500V, com 40mA por gel (EttanTMDaltSix - GE Lifesciences, USA) (Souza et al., 2010).

Os géis foram corados em azul coloidal de coomassie, baseado no protocolo descrito inicialmente por Candiano et al. (2004) e adaptado posteriormente (Van Tilburg et al., 2013).

Digitalização e análise dos géis

Os géis bidimensionais foram digitalizados a 600 dpi (Image Scanner III; GE Lifesciences, USA) em modo transparente e as imagens armazenadas em arquivo do tipo .tiff para posterior avaliação com o software PDQuest, version 7.3.0 (Bio-Rad, USA). Seguindo uma metodologia anteriormente descrita em detalhe (Moura et al., 2010; Souza et al., 2010; Van Tilburg et al., 2013). Um total de 14 géis foi utilizado para esta análise.

Um gel representativo (master gel) foi criado com base nos géis de todos os indivíduos. Spots presentes consistentemente nos mapas também foram adicionados ao gel sintético, conforme descrito (Moura et al., 2006; Moura et al., 2010). A quantificação dos spots foi dada em partes por milhão (ppm) da densidade óptica integrada total de cada gel, fornecida pelo aplicativo (Moura et al., 2006).

Digestão das proteínas

As proteínas separadas por electroforese 2-D e marcadas como spots nos géis foram decoradas e submetidas à digestão com tripsina (Moura et al., 2010). Resumidamente, cada spot foi cortado individualmente a partir de três géis, em pedaços de 1 mm³ e transferidos para tubos limpos. O corante e o SDS foram removidos dos spots após três lavagens com 400 µL de uma solução que contém acetonitrila (50 %) e bicarbonato de amônio (50 %, 25 mM, a pH 8,0). Os pedaços de gel foram desidratados, depois de duas lavagens com 200 µL de acetonitrila durante 5 minutos e à temperatura ambiente e secados em "speed vacuum". Os pedaços de gel foram incubados com tripsina (20 ng por spot) durante 20 horas a 37 °C. Após a incubação final, os peptídeos foram extraídos por três lavagens com ácido trifluoroacético a 5%, acetonitrila 50%, em

bicarbonato de amônio (50 mM). Os sobrenadantes foram concentrados em micro tubos usando um concentrador a vácuo “speed vacuum”. Um pedaço de gel em branco, sem spots, e um pedaço de albumina do marcador de peso molecular foram submetidos ao mesmo procedimento e utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Espectrometria de massa

Como anteriormente descrito (Souza *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013; Van Tilburg *et al.*, 2013), as digestões proteolíticas (5 µL) foram injetados em solvente A para a dessalinização em linha e a pré-concentração. Após lavagem por 3 minutos com solvente A em 5 µL / min, os peptídeos presos foram levados de volta através do fluxo de solvente com gradiente para a coluna analítica, HSS T3 (fused sílica capillary, C-18 5 µm, 0,075mm x 150 mm), usando uma válvula de comutação de 10 portas. A coluna analítica foi executada em gradiente (5 a 80% de solvente B; acetonitrila/água/ácido fórmico; 95/5/0.2; por 40 min). O espectrômetro de massa foi calibrado usando fragmentos de ions do produto Glu-Fib conforme necessário para manter a precisão da massa dentro de 10 partes por milhão.

Para a identificação de proteínas, seguiu-se o protocolo descrito por González *et al.* (2014). Resumidamente, as pesquisas de ions de MS/MS foram realizadas sobre os espectros processados contra as bases de dados Swissprot e NCBIInr utilizando MASCOT Daemon na plataforma de busca Matrix Science (Inc., Boston, MA, EUA). As pesquisas foram feitas usando o banco de dados NCBIInr com o pressuposto de que havia um máximo de uma falta clivagem tripsina e peptídeos que foram mono-isotópico. As modificações pós-traducionais variáveis consideradas foram oxidação da metionina e carbamidometilação dos resíduos de cisteína como modificações fixa. A tolerância dos peptídeos da massa e a tolerância dos fragmentos de massa foram inicialmente definidas para 0.1 e 0,1Da, respectivamente, por MS/MS de íons da procura. No entanto, os IDs dos peptídeos candidatos foram aceitos apenas se os valores de m/z foram observados dentro de 0,1Da da massa teórica da ID do candidato, como determinado e revisto manualmente os resultados da pesquisa MASCOT.

Pesquisa em banco de dados

Os espectros iônicos obtidos para cada peptídeo foram submetidos a buscas utilizando a ferramenta MASCOT (www.matrixscience.com) no banco de dados

SWISSPROT, utilizando o modo MS/MS ion search (Souza et al., 2012). Para busca, foram considerados valores de massa monoisotópicos, com carga +2, +3 e +4 e tolerância de massa dos peptídeos de ± 100 ppm e dos fragmentos de $\pm 0,1$ Da, tendo apenas 1 clivagem perdida. As modificações pós-tradicionais variáveis consideradas foram carbamido metilação dos resíduos de cisteína e oxidação dos resíduos de metionina. A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína for significativo ($P < 0,05$), e pela coincidência próxima da massa molecular e pl teóricos e experimentais da proteína.

Análise estatística

O presente trabalho foi conduzido sob um delineamento experimental inteiramente casualizado com dois grupos experimentais (boa e má criopreservação do sêmen). Todas as variáveis quantitativas foram avaliadas quanto a normalidade de sua distribuição utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$), bem como a avaliação da assimetria e curtose, por meio do procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do aplicativo estatístico SAS (v. 9.2, SAS Institute, NC, EUA). As variáveis foram transformadas por meio de $\text{Log}(x+1)$ ou arco-seno [$\text{raiz quadrada}(x/100)$] para ajuste da distribuição normal, se necessário, e aquelas que não obtiveram um ajuste adequado foram consideradas não-paramétricas.

As variáveis paramétricas foram submetidas a análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS e as médias foram comparadas entre os grupos por meio dos testes de T de Student ou de Tukey, segundo a sua instabilidade ($\text{CV\%} < 15$ ou > 15 , respectivamente). As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney, utilizando o procedimento NPAR1WAY com a opção WILCOXON do SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros seminais

O sêmen *in natura* dos ejaculados analisados no experimento (ejaculado total) apresentou aspecto normal, coloração branca leitosa, volume médio de 249,4mL e concentração média de $314,3 \times 10^6$ sptz / mL. Tais características estão dentro da normalidade para a espécie suína (Corrêa et al., 2001). O sêmen de todos os ejaculados *in natura* apresentou uma motilidade média (%) de $89 \pm 6,0$ e vigor espermático médio de $4,2 \pm 0,4$, encontrando-se dentro dos padrões mínimos estipulados pela metodologia

para serem utilizados no experimento (85% e 3,5 para porcentagem de células móveis e vigor, respectivamente). Um ejaculado com essas características estaria acima do mínimo das características desejáveis para se preparar doses de sêmen para utilização em programas de inseminação artificial (CBRA, 2013).

Grupos experimentais

Os animais foram separados em grupos de PFEs e GFEs, através dos resultados de vigor e motilidade espermática analisados logo após a descongelação seminal. O ponto de corte para considerar o animal no grupo GFEs era vigor $\geq 2,0$ e motilidade $\geq 40\%$. Entre os 14 animais utilizados no presente estudo, seis foram considerados GFEs, enquanto oito foram considerados PFEs. Os animais do grupo GFEs apresentaram uma média para vigor espermático de $2,2 \pm 0,8$ e motilidade espermática $41,8 \pm 22,9$, enquanto o grupo PFEs apresentou $1,9 \pm 0,6$ de vigor espermático e $26,8 \pm 17,5$ de motilidade espermática.

Os resultados dos parâmetros avaliados após a descongelação quanto à viabilidade do sêmen congelado neste estudo confirmam que, mesmo sob as mesmas condições de criopreservação, o grau de alterações produzidas pelo choque térmico não é o mesmo para ejaculados proveniente de animais diferentes, conforme anteriormente discutido por Gutiérrez-Pérez *et al.* (2009). Pérez-Patino *et al.* (2019) sugerem que a crosso sobrevivência espermática está associada a diferenças quantitativas no proteoma seminal desses animais.

Proteínas encontradas

Em média, foram detectados 28 spots por gel, de acordo com o pareamento gerado pelo aplicativo PDQuest® com base no gel master (Figura 1A), o qual representa uma combinação de todos os spots presentes no gel de referência (Figura 1B), além dos spots adicionados dos outros géis, os quais foram pareados. Destes, 27 spots foram diferenciais entre os grupos testados (Figura 1).

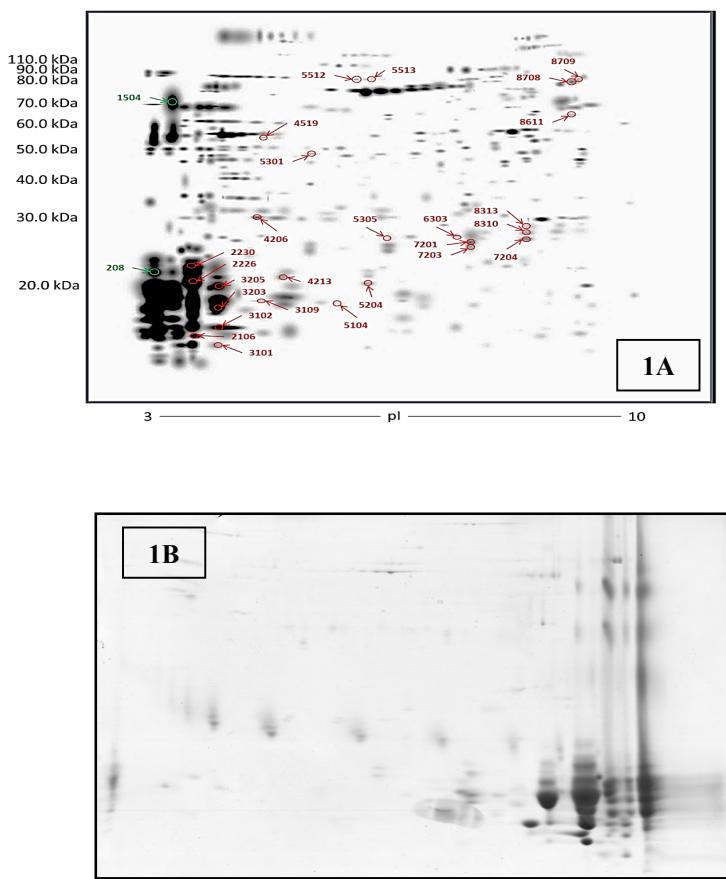


Figura 1 - Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de suínos. **Fig. 1A:** representa o gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado na combinação dos spots de todos os membros utilizados no estudo. **Fig. 1B:** mapa referência (Animal #3246), do qual o gel sintético foi primeiramente gerado. As proteínas foram coradas com Coomassie blue coloidal e identificadas por MALDI-ToF/ToF.

Um total de 58 *spots* de proteínas foi detectado em todos os géis de amostras de plasma seminal de suínos da raça Piau usando eletroforese bidimensional na região de pH 3 a 10 e SD-PAGE 14% (Lazari et al., 2020), sendo identificadas 12 proteínas pelo programa MASCOT (Shiomi, 2018).

Um total de 28 spots diferenciais foi detectado de forma consistente em todos os géis pareados pelo aplicativo PDQuest®. Esses spots foram submetidos à espectrometria de massas (ESI-QUAD-ToF), todos foram identificados e corresponderam a 16 proteínas diferentes. Quanto aos totais de spots analisados, foi observado que dois spots (208 e 1504) foram expressos com maior intensidade no grupo GFEs (Figura 2).

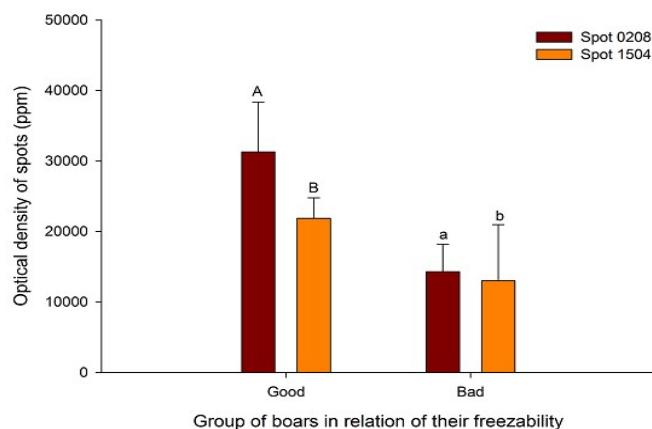


Figura 2 - Intensidades (médias e erros-padrão) dos spots 208 e 1504 no mapa bidimensional do plasma seminal de suínos, agrupados de acordo com os grupos PFEs e GFEs.

Mais de 250 proteínas já foram identificadas no plasma seminal de suínos (Perez-Patiño *et al.*, 2016; Perez-Patiño *et al.*, 2018), a maioria das proteínas presentes no plasma seminal é proveniente do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (Dacheux *et al.*, 2003), podendo influenciar na fertilidade dos machos (Perez-Patiño *et al.*, 2018).

As proteínas epididimárias adquiridas pela membrana espermática durante o trânsito epididimário são classificadas de acordo com o tipo de interação com a célula espermática. Podem ocorrer ligações fracas, responsáveis pela quiescência dos espermatozoides; ligações fortes, importantes no trato reprodutivo da fêmea e na fertilização; modificações das proteínas da membrana plasmática, encobrindo ou expondo receptores; ou presença de proteínas livres no fluido epididimário, colaborando com a manutenção do meio (MARENKO, 2008).

Proteínas encontradas no grupo GFEs

Nos dois spots encontrados em maior abundância no grupo GFEs, foram identificadas a *Carbohydrate-binding protein* no spot 208 e as *Bone morphogenetic protein* e *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, presentes no spot 1504. A *NADH-ubiquinone oxidoreductase* foi encontrada em ambos os spots.

A *Carbohydrate-binding protein* foi a única das proteínas encontradas, que é característica do plasma seminal, as demais são proteínas celulares, associadas ao metabolismo celular e geração de energia. Possivelmente a presença de proteínas celulares deva-se a questões metodológicas do estudo, como a centrifugação realizada

para separar o plasma seminal das células espermática. Fato este já descrito por Vasconcelos (2009), que observaram que as células espermáticas também podem também interferir indiretamente, nas reais concentrações e determinações dos constituintes do plasma seminal. Exemplificado pela técnica de centrifugação, a força centrípeta gerada pela técnica pode levar a saída de substâncias do interior do espermatozoide e contaminar o plasma seminal. Sua função é inibir a capacitação prematura, uma vez que esta pode ser iniciada por ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Rivlin et al., 2004). Além disso, ela promove uma economia de energia pela célula espermática através da diminuição da sua atividade metabólica e motilidade. A redução dessa atividade, apesar de levar a uma redução na produção de ATP, resulta numa menor produção de ROS. Com isso, a AWN não só previne a síntese de ROS, como também contribui na sua eliminação por possuir atividade antioxidante (Schoneck et al., 1996). Além disso, das proteínas encontradas, essa foi a única com relações diretas na manutenção da qualidade espermpática.

A Bone morphogenetic (BMP) é uma proteína de sinalização, que desempenha um papel central em vários órgãos incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose, especificação do desenvolvimento fetal durante a embriogênese bem como os tecidos adultos (Feng e Derynck, 2005). Contudo, a função da BMP de sinalização no plasma seminal ainda não está esclarecido.

A *Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase* (IMPDH) é uma enzima chave biossíntese do nucleotídeo guanina, bem como, sua função se torna vital para a replicação de todas as células. A IMPDH participa de uma etapa limitante na síntese de novo de nucleotídeos de guanina, a partir de inosina 5'-monofosfato (IMP). Ela catalisa a oxidação de IMP a xantosina 5'-monofosfato (XMP), com concomitante conversão de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) à sua forma reduzida, NADH (Sintchak e Nimmessgern, 2000).

Por fim, a *Ubiquinona oxireductase* participa da cadeia transportadora de elétrons, processo importante para a síntese de ATP e liberação de energia. Essa enzima consiste no complexo I, que é onde ocorre a desidrogenização do NADH e transporte de elétrons para a coenzima Q.

CONCLUSÃO

Com relação às proteínas diferenciais encontradas entre os grupos testados, pode-se concluir que a *Carbohydrate-binding protein* pode ser utilizada como um marcador de congelabilidade para a espécie suína, estando presente em ejaculados que suportam bem o processo de criopreservação espermática.

REFERÊNCIAS

- BARROS, T.B.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.V.; SOUZA, L.P.; FEUGANG, J.M.; TONIOLLI, R. The use of skimmed dried milk as an alternative diluent for the cooling step during the boar sêmen freezing procedure. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.3, p.2023-2030, 2015.
- BIANCHI, I.; MADEIRA, E.M.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V.R.; CORRÊA, E.K.; LUCIA JR, T.; CORRÊA, M.N. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.1-7, 2011.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, p.1327-1333, 2004.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**, v.74, p.940-950, 2010.
- CASTELO, T.S.; SILVA, A.R.; FROTA, T.R. Considerations on goat semen cryopreservation. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed., Copyright. Belo Horizonte, Brasil. 2013. 104p.
- CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, H.; CHEUNG, A.L.M.; LIU, W. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v.124, p.491-499, 2002.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. 1.ed. Copyright. Pelotas, Brasil, 2001. 194p.
- DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v.61, n.1, p.7-17, 2003.
- FENG, X.H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through smads. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.21, p.659-693, 2005.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. **Theriogenology**, v.80, n.4, p.400-410, 2013.

FISCHER, A.; BARROS, E.C.; MACHADO, I.P.; MIELE, M.; PINHEIRO, R.W.; MEDEIROS, S.A.F.; GUTH, T.L.F. **Novos caminhos na suinocultura: uma visão ampla e atual dos desafios e oportunidades da gestão nas granjas.** Sebrae, ABCS: Brasília, DF, 2019. 58p.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J.A.M.; MORENO, F.B.; ANDRADE, T.S.; SANTOS, A.C.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; MOURA, A.A. Proteins of the boar seminal plasma are associated with sperm parameters. **Theriogenology**, v.82, p.697-707, 2014.

GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.D.E.L.; CARVAJAL, S.U.; ORTEGA, M.E. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. **Criobiology**, v.58, n.3, p.287-292, 2009.

HANCOCK, J.L.; HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71, p.664-665, 1959

JOHNSON, L.A. **Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing.** In: Proceeding of 15th International Pig Veterinary Society Congress. Juç; 5-9, p.225-229, 1998

LAZARI, F.L., SONTAG, E.R., SCHNEIDER, A., MOURA, A.A.A., VASCONCELOS, F.R., NAGANO, C.S., DALBERTO, P.F.; BIZARRO, C.V.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C. Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 °C. **Theriogenology**, v.147, p.135-145, 2020.

LI, J.; BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MOLINA, M.F.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PARRILLA, I.; ROCA, F. Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance. **Theriogenology**, v.107, p.27-35, 2018.

MARENKO, S.R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.52-63, 2008.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practise. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.519-526, 1996.

MARTINS, J.A.; SOUZA, C.E.A.; SILVA, F.; GONZALEZ, V.; NOGUEIRA, D.; OLIVEIRA, J.T.A.O.; MOURA, E.A.A. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminants Research**, v.113, n.1, p.115–127, 2013.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.A. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v.27, p.201-211, 2006.

MOURA, A.A.; SOUZA, C.E.; STANLEY, B.A.; CHAMPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bull. **Journal of Proteome Research**, v.73, p.2006-2020, 2010.

PEREZ-PATIÑO, C.; BARRANCO, I.; PARRILLA, I.; VALERO, M.L.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. **Journal of Proteome Research**, v.142, p.15-23, 2016.

PEREZ-PATIÑO, C.; PARRILLA, I.; BARRANCO, I.; BARBERÁN, M.V.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; HERRERO-MARTINEZ, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E.A. New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.3, p.1065-1076, 2018.

PÉREZ-PATIÑO, C.; LI, J.; BARRANCO, I.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J.; PARRILLA, I. The proteome of frozen-thawed pig spermatozoa is dependent on the ejaculate fraction source. **Science Reproduction**, v.9, n.705, p.157-166, 2019.

RECUERO, S.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; BONET, S.; BARRANCO, I.; YESTE, M. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.137, p.36-42, 2019.

RIVLIN, J.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; BONET, S.; BARRANCO, I.; YESTE, M. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v.70, p.518-522, 2004.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; SANZ, L.; PEÑA, F.J.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J. The physiological roles of the boar ejaculate. **Society for Reproduction and Fertility**, v.66, p.1-21, 2009.

SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal plasma protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v.45, p.633-642, 1996.

SHIOMI, H.H. **Aspectos seminais de suínos da raça Piau: sazonalidade e criopreservação**. 2018. Viçosa, 95f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa.

SINTCHAK, M.D.; NIMMERSGERN, E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. **Immunopharmacology**, v.47, p.163-184, 2000.

SMEITINK, J.; VAN DEN HEUVEL, L.; DIMAURO, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. **Nature**, v.2, p.342-352, 2000.

SOUZA, C.E.A.; ARAÚJO, A.A.; OLIVEIRA, J.T.; LIMA SOUZA, A.C.; NEIVA, J.N.; MOURA, A.A. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.644-653, 2010.

SOUZA, C.E.A.; REGO, J.P.A.; LOBO, C.H.; OLIVEIRA, J.T.A.; NOGUEIRA, F.C.S.; DOMONT, G.B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F.C.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, J.R.; MOURA, A.A. Proteomic Analysis of the Reproductive Tract Fluids from Tropically-Adapted Santa Ines Rams. **Journal of Proteome Research**, v.75, n.14, p.4436-56, 2012.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRASER, L. Proteomics of boar seminal plasma – current studies possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**, v.5, n.3, p279-290, 2005.

TONIOLLI, R.; DUARTE, A.B.G.; FERREIRA, J.L.; MOREIRA, F.R.C. Influência da sensibilidade individual de varrões sobre a qualidade espermática após descongelação. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.16, n.3, p.124-128, 2009a.

TONIOLLI, R; COSTA E SILVA, M.; CHAVES, R.N. Utilização de diferentes meios de ressuspensão para o sêmen do varrão após descongelação. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.15, n.1, p.41-45, 2009b.

VAN TILBURG, M.F.; RODRIGUES, M.A.M.; MOREIRA, R.A.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; CÂNDIDO, M.J.D.; MOURA, A.A. Membrane associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v.79, n.9, p.1247–1261, 2013.

VASCONCELOS, A.B. Bioquímica do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.6, p.32-35, 2009.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. **Animal Reproduction**, v.14, n.1, p.69-81, 2017.