



Hygiene management during semi-automatic boar semen collection is a useful tool to reduce bacterial load and improve sperm quality

Cuidados higiênicos durante a coleta semi-automática de sêmen suíno é uma ferramenta para a redução da carga bacteriana e melhoria da qualidade espermática

Aline Fernanda Lopes Paschoal^{1,*}, Cristina Vicente Ferrari², Gabriela da Silva Oliveira¹, Karine Ludwig Takeuti¹, Ana Paula Gonçalves Mellagi¹, Rafael da Rosa Ulguim¹, Fernando Pandolfo Bortolozzo¹

¹Faculdade de Veterinária, Setor de Suínos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

²Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, Brasil.

*E-mail: alinepaschoal3@gmail.com

Despite the increasing worldwide bacterial resistance to conventional antimicrobials used, these drugs are mandatory to reduce the damage caused by the bacteriospermia. Strategies to reduce the use of antimicrobials have been developed and the adoption of hygienic management during semen collection may exert a reduction on the initial bacterial load in the ejaculate. The aim was to identify critical points of hygiene during the semi-automatic semen collection system and compare bacterial load after using two different methods of penis fixation. Boars (n=56) from two different boar studs (A and B) were used. Each one collected twice: once by the traditional and once by the adjusted method. For the traditional, the technician fixed the penis directly into the artificial cervix. For the adjusted, a previous manual fixation was performed and then the penis was transferred to the artificial cervix. The critical points of contamination evaluated were: boar stud, the penis escaping from the hand during fixation, the technician performing the collection (1, 2 and 3), number of collections performed by each technician and the dummy. Only ejaculates with minimal initial motility of 80% were extended, being the total motility, sperm concentration and pH evaluated at 24, 72 and 120 hours of storage at 17 °C ($\pm 1.5^\circ\text{C}$). Raw semen samples were collected for CFU/mL counting. Two classes of bacterial load (low bacterial load (LBL): ≤ 231 UFC/mL; high bacterial load (HBL) > 231 UFC/mL) were determined based on the median observed. The total motility was analyzed as repeated measurements, using SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Analysis of relative contribution for each critical point of hygiene on obtaining samples categorized as HBL was performed. A higher frequency of HBL samples was observed in the traditional method compared to the adjusted (62.5 and 37.5% respectively; $P=0.010$). Boar stud B had higher bacterial load ($P<0.001$) in raw semen (median = 872.5 UFC/mL) compared to stud A (median = 85.2 UFC/mL). In stud B, where the frequency of HBL samples were superior (64.3%) compared to stud A (35.7%), the adjusted method reduced the frequency of samples categorized as HBL ($P=0.003$) compared to the traditional method (42.9 and 85.7%, respectively), but no difference was found in stud A ($P=0.579$). The technician 1 had lower frequency (22.6%) of HBL samples compared to 2 and 3 (52.0% and 64.3%, respectively; $P=0.003$). If the number of collections performed for the same technician was higher than 20 or if more than 9 collections were performed on the same dummy, higher frequency of HBL samples was observed ($P<0.001$ and $P=0.034$, respectively). HBL semen doses had lower total sperm motility at 120h of storage, compared to LBL (81.7 ± 1.23 and $84.0 \pm 1.23\%$, respectively; $P=0.047$). The adjusted method during semi-automatic collection is a useful tool to reduce the bacterial load of raw semen in boar studs with high risk for contamination. Identification of critical points of hygiene during semen collection is essential to reduce the bacterial load in raw semen and improve sperm quality during the storage. The knowledge about critical points of hygiene is a first step for the replacement or reduction of antibiotics in extended semen of boars.

The study was supported by Minitub do Brasil Ltda.

Keywords: bacterial contamination; ejaculate; reproduction; spermatozoa, swine.

Palavras-chave: contaminação bacteriana, ejaculado, reprodução espermatozoides, suínos.

Adição do extrato de Noni (*Morinda citrifolia*) em doses inseminantes de suínos
*Addition of Noni extract (*Morinda citrifolia*) in boar semen doses*

**Natácia Gaia Figueiredo^{1,*}, Andressa Vignatti Casagrande², Gabriela da Silva Oliveira³,
Willian Rodrigues Valadares⁴, Monike Quirino⁵, Thais Spohr Christ⁶,
André Belico de Vasconcelos⁷, Ana Paula Gonçalves Mellagi⁸, Elizabeth Uber Bucek⁹**

¹Graduanda de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba; ²Graduanda Medicina Veterinária UNIRITTER; ³Graduanda de Medicina Veterinária UFRGS; ⁴Mestrando Setor de Suínos UFRGS; ⁵Doutoranda Setor de Suínos UFRGS; ⁶Doutoranda LATOX UFRGS; ⁷Docente de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba e do Programa de Pós Graduação; ⁸Docente de Medicina Veterinária da UFRGS – Departamento de Medicina Animal, Setor de Suínos; ⁹Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade de Uberaba.
*E-mail: nataciagaia@hotmail.com.

Na reprodução animal, o diluente tem como principal função conservar e manter as características fisiológicas da membrana plasmática do espermatozoide, bem como aspectos bioquímicos do metabolismo durante o armazenamento das doses. Nesse contexto, a *Morinda citrifolia*, conhecida popularmente como Noni, é um fruto rico em carboidratos, proteínas e antioxidantes mistos, que em associação ao diluente, poderia promover ação positiva sobre a viabilidade espermática em doses refrigeradas ou até mesmo congeladas. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do Noni sobre a viabilidade espermática, em diferentes quantidades, em doses refrigeradas de suínos. Foram utilizados oito ejaculados de quatro cachaaos sexualmente maduros. Para cada ejaculado, foi avaliado peso, cor, aspecto e morfologia espermática. A motilidade e concentração espermática foram avaliadas no sistema CASA (AndroVision®). A integridade de acrossoma foi avaliada através de preparação úmida em formol citrato, e analisada em microscopia optica no aumento de 1000x. O ejaculado foi diluído em BTS, em *Split sample*, em quatro grupos, de acordo com a quantidade de extrato de *Morinda citrifolia* (Noni - 150 µg/mL), mantendo $1,5 \times 10^9$ de espermatozoides por dose (50 mL): 0 µL, 15 µL, 75 µL e 150 µL. Após 90 minutos em temperatura ambiente, as doses foram armazenadas a 17°C, e avaliadas às 24 e 72 h de armazenamento. Os resultados foram analisados utilizando o *software* SAS 9.4. Foram utilizados contratos polinomiais, com o procedimento GLIMMIX, para avaliar o efeito linear e quadrático da dose-resposta da adição de Noni. Os machos foram considerados como efeito aleatório, em todos os modelos. Para a integridade de acrossoma, foi considerado distribuição binomial. Os dados estão apresentados como LSMeans \pm erro-padrão da média. As motilidades, total e progressiva, não foram afetadas pelos tratamentos em nenhum dos momentos, 24 e 72 horas ($P > 0,43$), assim como também não foram observadas diferenças estatísticas nas demais motilidades (rápida, lenta e local; $P > 0,18$). Quando avaliada a integridade de membrana, com utilização de SYBR-14/PI (sistema CASA), não houve efeito da adição do Noni às 24 h (0 µL – $83,34 \pm 3,08\%$; 15 µL – $84,05 \pm 3,08\%$; 75 µL – $80,38 \pm 3,08\%$; 150 µL – $82,32 \pm 3,08\%$; $P > 0,52$) e às 72 h de armazenamento (0 µL – $78,10 \pm 5,65\%$; 15 µL – $81,86 \pm 5,65\%$; 75 µL – $88,11 \pm 5,65\%$; 150 µL – $78,53 \pm 5,65\%$; $P > 0,18$). Observou-se uma diminuição linear do pH ($P = 0,01$) das amostras às 24 h de armazenamento (0 µL – $7,46 \pm 0,03$; 15 µL – $7,42 \pm 0,03$; 75 µL – $7,40 \pm 0,03$; 150 µL – $7,38 \pm 0,03$), mas sem efeito às 72 h ($P > 0,12$). O percentual de lesão de acrossoma às 72h de armazenamento não foi influenciado pela adição de Noni (0 µL – $9,92 \pm 2,26\%$; 15 µL – $13,57 \pm 2,93\%$; 75 µL – $12,54 \pm 2,74\%$; 150 µL – $12,65 \pm 2,77\%$; $P > 0,15$). Essa redução do pH, conforme a adição de Noni, poderia estar relacionada com o pH ácido (pH=4) característico do fruto. Conclui-se que, apesar da redução da pH às 24 h de armazenamento, a presença do extrato de Noni sobre o sêmen refrigerado de suínos não influenciou as variáveis analisadas.

Palavras-chave: espermatozoide, cachaaço, integridade de membrana, acrossoma, pH.

Keywords: sperm, boar, membrane integrity, acrosome, pH.

Efeito da concentração e do tempo de incubação da polietilenoimina sobre a endocitose de fibroblastos fetais suínos

Effect of concentration and incubation time of polyethyleneimine on endocytosis of porcine fetal fibroblasts

**Andressa Pereira de Souza^{1,*}, Emanuelle Coldebella², Shaiana Salete Maciag³,
Francisco Noé da Fonseca⁴, Carlos André da Veiga Lima Rosa⁵, Mariana Groke Marques⁴**

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina; ²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³Graduanda em Medicina Veterinária, Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia; ⁴Embrapa Suínos e Aves, ⁵Docente da Universidade do Estado de Santa Catarina.

*E-mail: dressaps_souza@hotmail.com

Os polímeros catiônicos como a polietilenoimina (PEI) se destacam como uma alternativa para entrega segura e eficiente de genes, devido à sua boa biocompatibilidade, versatilidade e tamanho controlável de moléculas, além disso, são baratos e simples de preparar. Apesar de apresentarem muitas vantagens, a eficiência de entrega depende da otimização de parâmetros como concentração do polímero e tempo de incubação com as células, os quais precisam ser padronizados para cada tipo celular. Devido ao seu rápido crescimento e potencial proliferativo, os fibroblastos fetais têm sido o principal tipo celular usado na transferência nuclear de células somáticas modificadas (TNCSM). Além disso, fibroblastos fetais usualmente são mais fáceis de serem reprogramadas do que células adultas, resultando em melhor desenvolvimento embrionário quando comparado a outras células usualmente utilizadas na TNCSM de suínos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a concentração e o tempo de incubação para que a PEI seja internalizada em fibroblastos fetais suínos de forma eficiente. Para isso, fibroblastos fetais suínos foram tratados com diferentes concentrações de PEI, sendo: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80µg/mL incubados em 3 diferentes períodos: 30 minutos; 1 e 2 horas. Para verificação da internalização a PEI foi conjugada com o fluoróforo FITC. As células foram avaliadas através de citometria de fluxo (BD AccuriTMC6) para mensuração da taxa de incorporação de PEI/FITC. Os dados foram avaliados utilizando PROC MIXED (SAS®), sendo verificada a interação entre as variáveis tempo e concentração. O teste de Tukey foi usado para comparar as médias sendo os dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens ± EP. Não houve interação entre o tempo de incubação e a concentração da PEI/FITC ($p=0,9890$). A internalização da PEI/FITC não foi afetada pelo tempo que os fibroblastos permaneceram em contato com o polímero ($p=0,6200$), podendo-se assim afirmar que o período 30 minutos de incubação do polímero com as células seja suficiente para a entrada da PEI. Quanto à concentração de PEI-FITC utilizada, foi possível observar que quanto maior a concentração maior de internalização da PEI/FITC ($p<0,0001$). As concentrações de PEI de 0,625; 1,25; 2,5; 5µg/mL proporcionaram baixas taxas de FFS marcados com FITC (2,22%±1,74; 3,62%±1,74; 15,27%±1,74; 45,09%±1,74, respectivamente). Observou-se que somente a partir da concentração de 10µg/mL de PEI foi possível atingir maiores porcentagem de FFS marcados, 72,5%±1,74; 85,16%±1,74; 95,61%±1,74 e 92,06%±1,74, para as concentrações de 10; 20; 40 e 80µg/mL respectivamente. Sugere-se que nas condições estudadas a concentração 40µg/mL de PEI já é suficiente para atingir o máximo de fibroblastos fetais suínos marcados. Conclui-se que a polietilenoimina foi internalizada nos fibroblastos suínos em todas as concentrações avaliadas, mostrando-se um método com grande potencial para realização de transfecção em fibroblasto de forma eficiente e barata, tendo as maiores concentrações proporcionado as maiores internalizações, sem sofrerem efeito do tempo. Mais estudos são necessários para otimizar os demais parâmetros que afetam a eficiência e a citotoxicidade deste polímero para transfecção celular.

Palavras-chave: transfecção, suíno geneticamente modificados, PEI.

Keywords: *transfection, genetically modified swines, PEI.*



Efecto del agregado de L-carnitina y piruvato sobre el congelamiento de semen porcino

Effect of the addition of L-carnitine and pyruvate on boar semen cryopreservation

Caldevilla Mariana*, Pendola Carlos, Ferrante Alejandro, Miragaya Marcelo

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Teriogenología, Argentina.

*E-mail: marianacaldevilla@gmail.com

La fertilidad del semen congelado porcino es significativamente menor a la obtenida con semen refrigerado. Esto hace que actualmente no sea una alternativa que se utilice en la producción porcina, sin embargo es necesario para los bancos de genes y la exportación. El objetivo de este trabajo fue evaluar el congelamiento de semen porcino utilizando dos curvas de descenso de temperatura en presencia de L-carnitina y piruvato. Se utilizaron nueve machos de fertilidad comprobada ($n=9$, $r=2$). El semen se obtuvo mediante la técnica de mano enguantada y se diluyó en glicerol 3%, lactosa, yema de huevo, Equex con el agregado o no de L-carnitina (50 mM) y piruvato (10 mM). Se realizó el congelamiento siguiendo una curva rápida y otra lenta. Curva rápida: las pajuelas fueron colocadas en gobeletes plásticos y sumergidos en una mezcla de etanol-acetona dentro de un canastillo de bronce que fue mantenido dentro del termo de un nitrógeno a 6 cm por encima del nivel del nitrógeno, controlando el descenso de la temperatura con un termómetro digital desde temperatura ambiente hasta -15 °C. Luego se llevó el canastillo hasta el nivel del nitrógeno líquido hasta alcanzar los -120 °C y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido. Curva lenta: el semen diluido se equilibró 2 horas a 17 °C, luego 2 horas a 5 °C y posteriormente se colocaron las pajuelas en una caja de telgopor aislada, a 5 cm de altura de nitrógeno durante 20 minutos. Finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido. El descongelamiento se realizó a 37 °C durante 1 minuto. Se evaluaron los parámetros cinemáticos utilizando un sistema CASA (ISAS v1, Proiser[®], España). Con la finalidad de evaluar simultáneamente el estado acrosomal y la funcionalidad de la membrana espermática, se utilizó una nueva técnica combinando la tinción de azul de Coomassie en muestras descongeladas sometidas previamente a una prueba hipoosmótica. Los patrones observados fueron: AC+H+: espermatozoide sin acrosoma reaccionado y prueba hipoosmótica positiva, AC-H+: espermatozoide con acrosoma reaccionado y prueba hipoosmótica positiva, AC+H-: espermatozoide sin acrosoma reaccionado y prueba hipoosmótica negativa, AC-H-: espermatozoide con acrosoma reaccionado y prueba hipoosmótica negativa. Se realizó un diseño factorial bloqueando por macho y cuando no se pudo comprobar normalidad se realizó un análisis de Kruskal Wallis. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre las curvas de congelamiento rápida y lenta en presencia o ausencia de L-carnitina y piruvato en los parámetros cinéticos observados. En la curva lenta en ausencia o presencia de L-carnitina y piruvato respectivamente los valores obtenidos de movilidad progresiva (%) fueron de 12.6 ± 7.0 vs. 12.3 ± 5.7 y de movilidad total 21.8 ± 12.0 vs. 22.0 ± 4.5 . En la curva rápida en ausencia o presencia de L-carnitina y piruvato respectivamente los valores obtenidos de movilidad progresiva (%) fueron: 12.5 ± 6.6 vs. 11.0 ± 5.6 y de movilidad total 22.3 ± 10.0 vs. 21.8 ± 9.5 . No se observaron diferencias significativas entre las curvas de congelamiento rápida y lenta con el agregado de L-carnitina y piruvato en ninguno de los patrones de azul de Coomassie/HOS. En la curva lenta en ausencia o presencia de L-carnitina y piruvato respectivamente los valores obtenidos fueron: AC+H+: 17.7 ± 7.5 , 20.2 ± 7.4 ; AC-H+: 8.2 ± 4.3 , 7.8 ± 5.6 ; AC+H-: 9.6 ± 4.2 , 10.7 ± 2.6 ; AC-H-: 64.5 ± 8.8 , 61.3 ± 8.4 . En la curva rápida en ausencia o presencia de L-carnitina y piruvato respectivamente los valores obtenidos fueron: AC+H+: 18.8 ± 5.4 , 18.0 ± 5.3 ; AC-H+: 6.6 ± 5.0 , 7.4 ± 6.2 ; AC+H-: 9.2 ± 2.6 , 9.4 ± 3.2 ; AC-H-: 65.4 ± 5.9 , 65.2 ± 5.3 . Una de las ventajas más importantes es que la curva rápida puede realizarse a campo en cualquier granja porcina, sin la necesidad de trasladar las muestras de semen o a los padrillos, ni tampoco contar con equipamiento de alto costo, además este procedimiento dura aproximadamente 10 minutos en total. La adición de L-carnitina (50 mM) asociada al piruvato (10 mM) al medio de congelamiento no evidenció diferencia en la calidad espermática del semen porcino pos-descongelado.

Palabras-clave: porcino, criopreservación, glicerol, L-carnitina, piruvato.

Keywords: porcine, cryopreservation, glycerol, L-carnitine, pyruvate.



Panorama das importações de sêmensuíno entre 2016 e 2018 e do mercado de inseminação em 2018

Panorama of swine semen imports between 2016 and 2018 and the insemination market in 2018

**Carlos Henrique Cabral Viana⁶, Maitê Cardoso Coelho da Silva¹,
Rubens Corrêa Junior², Emanuela Almeida Gricio³, Gediendson Ribeiro de Araujo⁴,
Jean Pierre Simões de Andrade⁵, Pedro Nacib Jorge Neto^{7,*}**

¹PPGCV-FAMEZ/UFMS; ²LAE-FZEA/USP; ³Aluna do DMV-UFLA; ⁴INBIO/UFMS; ⁵Majop; ⁶FMV/PUCMinas,
⁷PPGRA-FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

*E-mail: pepovet@usp.br

A suinocultura é o segmento na produção animal que, após a criação de perus, mais faz uso da inseminação artificial, em relação ao percentual de fêmeas inseminadas. Com ciclo curto de produção e intenso melhoramento genético que contribui para uma eficiência na produtividade, a criopreservação, visando uso a longo prazo, passa a não ser de interesse do produtor. Porém, o sêmen congelado é a forma mais viável para a importação de material genético ao Brasil, devido a maior biossegurança desse processo, especialmente, no momento em que a Peste Suína Africana assombra o mercado asiático. Diferentemente da bovinocultura, não há informações de mercado sobre o volume de sêmen suíno importado ao Brasil, nem como números atuais da quantidade de inseminações realizadas anualmente com sêmen fresco. A divulgação dessas informações permite orientar os suinocultores a tomarem decisões assertivas e também informar os analistas do mercado. Assim, através da tabulação de estatísticas de importações oficiais de sêmen e de cateteres de inseminação disponibilizados para consulta pública pela Receita Federal, através do Portal Siscomex, trabalhou-se os dados visando a obtenção de números totais da importação de sêmen suíno entre os anos de 2016 e 2018 e o volume de cateteres importados entre outubro de 2017 e setembro de 2018, período definido considerando três meses como o tempo médio de estoque praticado pelas empresas que comercializam este insumo. Ainda, no caso dos cateteres, foi levantado o número comercializado pela fabricante brasileira durante o ano de 2018. No ano de 2016, foram importadas 2.603 doses ao custo de U\$59.519,22, oriundas dos Estados Unidos (44,8%), Suíça (44%) e Holanda (11,2%). Em 2017 foram importadas 2.754 doses ao custo de U\$40.472,78, oriundas do Canadá (43,6%), Espanha (43,6%) e da Holanda (16,1%). Em 2018, o total de 2.083 doses foram importadas no montante de U\$98.226,74 e oriundas da Suíça (45,6%), Estados Unidos (20,7%) e da França (13,7%). Em relação aos cateteres, no período selecionado, foram comercializados (importação e fabricação nacional) 12,7 milhões de unidades. Considerando o plantel brasileiro ajustado de 1,802 milhões de matrizes em criações tecnificadas no Brasil em 2018 (1,72 milhões de matrizes em 2015 segundo a ABCS, acrescido do aumento de produção de carne suína de 4,8% entre 2015 e 2018 segundo a ABPA) e considerando 2,5 ciclos (partos por porca por ano) com 3 inseminações realizadas por ciclo, pode-se concluir que 94,2% do plantel brasileiro foi inseminado em 2018. O sêmen congelado, por perder capacidade de fertilização e trazer um número inferior de nascidos, é ideal para a transferência de genética pois não se conta com alto desempenho em relação à fertilidade e prolificidade enquanto em granjas comerciais, necessita-se de grande número de nascidos, obtidos atualmente apenas com o sêmen resfriado. Portanto, com a eficiência de produtividade sêmen resfriado e o resultado satisfatório do sêmen importado, esses índices demonstram ser viável a inseminação artificial com sêmen fresco em rebanhos comerciais, assim como a importação de sêmen congelado para melhoramento genético de linhagens trabalhadas no Brasil.

Palavras-chave: material genético, suinocultura, sêmen, mercado.

Keywords: *genetic material, swine breeding, semen, market.*



Efeito da imunização contra o GnRH na expressão gênica de *Mannosidase alpha class 2B* e *Serotransferrin* no testículo e epidídimo suíno

Effect of GnRH immunization in the gene expression of Mannosidase alpha class 2B e Serotransferrin in swine epididymis

**Ana Paula Binato de Souza^{1,*}, Tainá Naue Lopes¹, Anna Flávia Tischer da Silva¹,
Lucélia Santi², Walter Orlando Beys da Silva², John R. Yates³, Ivan Cunha Bustamante-Filho¹**

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado RS, Brazil; ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ³The Scripps Research Institute, Dpt. of Chemical Physiology, La Jolla, CA 92037.

*E-mail: anapaulabinato@gmail.com

A maturação dos espermatozoides no epidídimo representa um passo fundamental na produção de gametas viáveis. Durante o trânsito pelo epidídimo, os espermatozoides são expostos a secreções epididimárias, oferecendo um ambiente essencial para a aquisição de motilidade e competência fertilizante. O fluido epididimário (FE) da região da cauda em contato com os espermatozoides impede a capacitação prematura, protege contra o estresse oxidativo e mantém a quiescência metabólica. Estudos de proteômica do FE conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa identificaram aumento quantitativo e qualitativo de proteínas em animais imunizados contra o GnRH. Tal procedimento induz a degeneração e disfunção testicular e epididimária por comprometer o eixo hipotálamo-hipofise-gonadas, inibindo a produção de testosterona e estradiol. Dentre as proteínas alteradas, selecionamos a *Serotransferrin precursor* (TF) e *Mannosidase alpha class 2B* (MAN2B2) para validar os dados da proteômica por meio de PCR quantitativo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da imunização contra GnRH na expressão gênica de TF e MAN2B2 nas diferentes regiões epididimárias e testículo de suínos. Foram utilizadas amostras de tecidos reprodutivos de cachaços, sendo o grupo controle formado por tecidos de animais castrados cirurgicamente (n = 8) e o grupo tratamento composto de tecidos reprodutivos de suínos abatidos após dois meses de aplicação da vacina Vivax® (Pfizer) (n = 11). Foi realizada a qPCR a partir de RNA total extraído (kit GE Healthcare Illustra Spin®) de três regiões do epidídimo (cabeça, corpo, cauda). O gene TF apresentou maior expressão na cabeça e corpo do epidídimo dos animais de ambos os grupos (p < 0,01). Foi observada um aumento na expressão deste gene na região do corpo do epidídimo nos animais imunocastrados (p < 0,01). Diferentemente, o gene MAN2B2 não apresentou diferença de expressão entre as regiões do epidídimo avaliadas nos animais controle. Contudo, a imunização contra GnRH induziu a um aumento significativo do número de transcritos na cauda (p < 0,001). Estes resultados corroboram os dados da proteômica confirmando o aumento da expressão das proteínas *Mannosidase alpha class 2B* e *Serotransferrin* no epidídimo, mas não no testículo, de cachaços com degeneração testicular induzida por imunização contra o GnRH.

Palavras-chave: testículo, epidídimo; suíno, GnRH, expressão gênica.

Keywords: testis, epididymis, swine, GnRH, gene expression.



Armazenamento de sêmen suíno líquido a 5°C e criopreservação alteram o mecanismo de influxo de Ca²⁺ espermático

Liquid storage of boar semen at 5°C and cryopreservation alter sperm Ca²⁺ influx mechanism

Maria Júlia Biolchi Canello, José Francisco Manta Bragança, Paulo Eduardo Bennemann, Sérgio Abreu Machado*

Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal, Laboratório de Biologia Molecular, Medicina Veterinária, Unoesc, Xanxerê, SC, Brasil.
*E-mail:sergio.machado@unoesc.edu.br

O sêmen líquido a 15-18°C é a única forma atualmente aceitável de armazenamento e comercialização para a prática da inseminação artificial (IA) em suínos. Apesar da complexidade técnica no desenvolvimento de protocolos para criopreservação e resfriamento a 5°C, estas alternativas são promissoras para a conservação mais eficiente de sêmen suíno. Nesta espécie, contudo, baixas temperaturas podem causar importantes transtornos na homeostase do Ca²⁺ espermático, promovendo disfunção no processo de capacitação. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da criopreservação e resfriamento a 5°C sobre o influxo de Ca²⁺ em espermatozoides suínos. O sêmen coletado de cinco machos adultos foi utilizado em heterospermia (dois a três machos). Os grupos experimentais foram compostos por: a) sêmen resfriado a 15-18°C, avaliado 6h após a coleta (R0); b) sêmen resfriado a 5°C, avaliado 24 h após a coleta (R5); c) sêmen resfriado a 15-18°C, avaliado 24 h após a coleta (R15) e; d) sêmen criopreservado (Cryo), analisado oportunamente. Os ejaculados foram diluídos e processados para resfriamento e congelamento conforme protocolos comerciais (Minitub). Citometria de fluxo foi usada para a análise de viabilidade celular (iodeto de propídio (PI)), potencial de membrana mitocondrial (Rodamina123), concentração intracelular de Ca²⁺ (Fluo-4AM) e atividade de canais CatSper (NNC-55-0396, um antagonista de canais de Ca²⁺ tipo T). Todas amostras foram incubadas a 37°C em meio capacitante (CAP) por uma hora antes da preparação para citometria. A incubação em CAP é necessária para ativar o influxo de Ca²⁺ e outros eventos fisiológicos que resultam na capacitação. Os experimentos foram repetidos cinco vezes, analisando 10.000 espermatozoides por ensaio. Fluorescência >10 vezes à intensidade da fluorescência de células não marcadas foi considerada sinal positivo. Análise de motilidade (%) e vigor (escala de 0-5) de todas as amostras precedeu a avaliação citométrica e diferenças significativas foram consideradas se p<0,05. Os valores percentuais foram calculados computando o número de células com sinal positivo sobre o total de células contadas. O sêmen descongelado (Cryo) teve motilidade média de 55%, diferindo dos grupos R0, R5 e R15 (86,7%, 81,6% e 83,3%, respectivamente). O vigor espermático dos grupos R0 (3,8), R5 (3,7) e R15 (3,8) foi superior ao do grupo Cryo (3,0). Células positivas para PI nos grupos R0, R5 e R15 (8,2, 5,3 e 9,4%, respectivamente) tiveram mesmo desempenho, entretanto foram diferentes do grupo Cryo, com 29,9% de células PI-positivas. A atividade mitocondrial nos grupos R0 (98,4%) e R15 (93,9%) diferiu do grupo R5 (71,5%), mas não foi diferente do grupo Cryo (85,3%). Entretanto, o grupo Cryo teve atividade mitocondrial igual ao grupo R5. O influxo de Ca²⁺ (em meio com EGTA) no grupo R5 (58,8%) foi menor quando comparado aos demais grupos (98% para R0, 96,2% para R15 e 83,6% para Cryo). O inibidor de CatSper (único canal de cálcio sabidamente essencial para o desenvolvimento da fertilidade espermática) não teve efeito no influxo de Ca²⁺ nos grupos R0 (91,3%), R5 (53,1%) e R15 (89,7%), entretanto reduziu a entrada deste íon quando o sêmen sofreu criopreservação e descongelamento (60%). Estes resultados sugerem que, apesar de não ser claro como o congelamento altera a sensibilidade destes canais a um inibidor, o resfriamento a 5°C e criopreservação limitam o influxo de Ca²⁺ em espermatozoides suínos, podendo ser uma importante causa de sua baixa fertilidade quando armazenado nestas condições.

Palavras-chave: espermatozoide suíno, armazenamento de sêmen, Ca²⁺.

Keywords: boar sperm, semen storage, Ca²⁺.

Marcadores proteicos espermáticos em um modelo de degeneração testicular em suínos: validação de dados proteômicos por PCR quantitativa

Sperm protein markers in a testicular degeneration model in swine: validation of proteomic data by quantitative PCR

Ana Paula Binato de Souza^{1,*}, Tayná Naue Lopes¹, Anna Flávia Tischer da Silva¹, Lucélia Santi², Walter Orlando Beys da Silva², John R. Yates³, Ivan Cunha Bustamante-Filho¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Rua Avelino Tallini, Lajeado RS, Brazil; ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ³The Scripps Research Institute, Dpt. of Chemical Physiology, La Jolla, CA 92037.

*E-mail: anapaulabinato@gmail.com

As características reprodutivas constituem um dos principais critérios de seleção utilizado nos atuais sistemas de produção animal. Apesar dos parâmetros estabelecidos para classificar a qualidade do sêmen ser amplamente aplicados, não levam em conta aspectos moleculares que contribuem na capacidade de fertilização. Assim, a busca por marcadores que permitam uma avaliação mais sensível do status tecidual e celular que podem viabilizar novos métodos de análise seminal. Recentemente, identificamos proteínas altamente expressas em espermatozoides da cauda de epidídimo de cachorros com degeneração testicular induzida pela imunização contra GnRH (imunocastração). Para validar os resultados de proteômica, realizamos a análise da expressão gênica das proteínas lipocalina epidídimo-específica (LCN5), calreticulina (CALR) e prostaglandina-H2 D-isomerase (PTGDS) no testículo e nas diferentes regiões epididimárias de suínos sadios e imunocastrados. Foram coletadas amostras de tecidos reprodutivos de suínos machos, sendo o grupo controle formado por tecidos de animais adultos sadios castrados cirurgicamente (n=8) e o grupo tratamento composto de tecidos reprodutivos de suínos adultos abatidos após dois meses de aplicação da vacina Vivax® (Pfizer) (n=11). Foi realizada a qPCR a partir de RNA total extraído (kit GE Healthcare Illustra Spin®) de três regiões do epidídimo (cabeça, corpo, cauda) e do testículo. A expressão dos genes CALR e PTGDS no epidídimo não apresentou diferença em relação ao grupo controle e os animais imunizados. Diferentemente, a imunização contra GnRH reduziu a expressão da LCN5 no corpo e na cauda do epidídimo (p<0,01). Conclui-se com estes resultados que a imunização contra o GnRH afeta a expressão de LCN5 no epidídimo, mas não altera a expressão de CALR e PTGDS. A maior presença dessas proteínas no espermatozoide da cauda do epidídimo de animais imunocastrados pode ser explicado por alterações de rotas de degradação proteica, como ubiquitinação. Experimentos estão sendo desenvolvidos para confirmar estes achados.

Palavras-chave: proteômica, suíno, epidídimo, expressão gênica, degeneração testicular.

Keywords: proteomics, swine, epididymis, gene expression, testicular degeneration.