



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSO*

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**MARCADORES MOLECULARES NO SÊMEN SUÍNO: IDENTIFICAÇÃO
DE NOVAS PROTEÍNAS NO FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E VARIAÇÃO
SAZONAL DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES SEMINAIS**

Laura Espíndola Argenti

Lajeado, Dezembro de 2016.

Laura Espíndola Argenti

**MARCADORES MOLECULARES NO SÊMEN SUÍNO: IDENTIFICAÇÃO
DE NOVAS PROTEÍNAS NO FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E VARIAÇÃO
SAZONAL DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES SEMINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

Lajeado, Dezembro de 2016.

Laura Espíndola Argenti

**MARCADORES MOLECULARES NO SÊMEN SUÍNO: IDENTIFICAÇÃO
DE NOVAS PROTEÍNAS NO FLUIDO EPIDIDIMÁRIO E VARIAÇÃO
SAZONAL DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES SEMINAIS**

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Produção Primária de Alimentos.

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho - Orientador
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Marcia Ines Goetttert
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Ramatis Birnfeld de Oliveira
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lajeado, Dezembro de 2016.

“Existem três caminhos para o sucesso:
ensinar o que se sabe,
praticar o que se ensina,
perguntar o que se ignora.”

(São Beda – Século VIII)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Centro Universitário UNIVATES pela oportunidade de conhecimento e crescimento pessoal e profissional. Pela bolsa de estudos da CAPES e por todos os mestres que fazem parte do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia desta instituição, ambos compuseram o componente-chave para minha formação como mestre desta casa.

Em segundo lugar, agradeço meu orientador, Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho, professor da casa, um mentor durante as horas mais difíceis destes dois anos de caminhada. Aproveito para agradecer aos membros do grupo de pesquisa do professor Ivan por estarem sempre dispostos a ajudar quando necessário.

Agradeço aos meus colegas da turma de mestrado 4 em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES. Meninas (e Augusto), minha casa estará sempre à disposição para fazermos nossos encontros da turma! Aproveito para fazer um adendo especial ao meu parceiro de orientação e amigo Augusto Weber, levo nossa amizade para sempre no peito e sei que é recíproco. Colegas da turma 5 do mestrado e turma 1 do doutorado, convivemos por pouco tempo, mas o suficiente para darmos boas risadas e cultivarmos boas amizades em aula.

Uma pessoa muito digna de agradecimento é meu parceiro de vida, Antonio H. Nichel. Agradeço pelos mates servidos durante minhas horas de estudo, pelas vezes que fizestes janta para me esperar da aula, pelas vezes que cuidastes dos nossos animais por mim, pois eu estava cansada. Pelo suporte nos momentos mais difíceis e pelas várias vezes que me dissestes: “Passaremos por isso juntos, ok?”. Não sei se um dia conseguirei retribuir tanto zelo.

Agradeço à minha família pela torcida incondicional, mesmo que distante.

Agradeço à Associação dos Criadores de Suínos de Rio Grande do Sul, Cooperativa Languiru e Brasil Foods pelo fornecimento de material e apoio à pesquisa. Estes parceiros são indispensáveis e fundamentais para o desenvolvimento e crescimento do conhecimento em nosso país.

Por fim, agradeço aos membros da banca pela disposição em participar conosco desta jornada.

RESUMO

Durante o trânsito epididimário, os espermatozoides são expostos às secreções do epitélio, formando um ambiente natural essencial para a aquisição de motilidade e capacidade fertilizante pelas células espermáticas. O proteoma do fluido epididimário já vem sendo estudado por grupos de pesquisa há alguns anos e proteínas importantes vêm sendo identificadas no fluido da cauda do epidídimo; no entanto, uma investigação mais profunda da proteômica deste fluido nunca foi feita. No primeiro trabalho apresentado nesta dissertação, a técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT) foi utilizada para identificação de proteínas no fluido da cauda do epidídimo. Um total de 663 proteínas foi identificado, sendo que as proteínas mais abundantes observadas em uma análise semi-quantitativa foram as seguintes (contagens espectrais): *epididymal-specific lipocalin-5* (1465), *beta-hexosaminidase subunit beta precursor* (1346), *phosphatidylethanolamine-binding protein 4 precursor* (367), *lactotransferrin precursor* (226), *brain acid soluble protein 1 isoform 2* (134), *di-N-acetylchitobiase* (115), *epididymis-specific alpha-mannosidase* (114), *epididymal secretory glutathione peroxidase precursor* (112), *reticulocalbin-1 isoform 2* (103) e *alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme* (101). A identificação de 663 proteínas no fluido da cauda do epidídimo de suínos possibilita uma maior compreensão dos processos de armazenamento à que estas células são submetidas neste ambiente e, a partir disso, possibilita o desenvolvimento técnicas de reprodução tanto para a solução de problemas de infertilidade humana quanto de produção animal. Em um segundo experimento, avaliou-se a atividade de proteínas antioxidantes presentes no plasma seminal durante as quatro estações do ano e sua variação estacional, em correlação com parâmetros de qualidade seminal. As enzimas previamente selecionadas para avaliação foram a superóxido-dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx). Os parâmetros seminais avaliados apresentaram-se constantes durante todo o ano, sendo observada diferença entre estações apenas na concentração espermática e motilidade rápida após 5 dias de refrigeração a 17°C. As defesas antioxidantes do plasma seminal, medidas através das atividades de GPx e SOD se mantiveram constantes durante o ano. A avaliação destas enzimas nas células

espermáticas evidenciou um aumento de atividade de SOD no verão e primavera ($P < 0,05$). As atividades das enzimas GPx e SOD apresentaram apenas duas correlações com motilidade total após 5 dias de preservação a 17°C. A atividade de SOD nos espermatozoides apresentou correlação negativa fraca ($R^2 = 0,4517$; $P = 0.0022$). No plasma seminal, a GPx também apresentou correlação negativa ($R^2 = 0,2447$; $P = 0,0369$). Conclui-se que, apesar de variações individuais, não ocorreram variações significativas na qualidade espermática ao longo do ano.

Palavras-Chave: preservação espermática, espectrometria de massa, sazonalidade.

ABSTRACT

During epididymal transit, sperm are exposed to epididymal secretions, which form an essential natural environment for the motility acquisition and fertilizing ability by sperm cells. The epididymal fluid proteome has already been studied by research groups for some years and important proteins have been identified in the cauda epididymal fluid (CEF); however, further investigation of this fluid proteomics was never made. In the first work presented multidimensional protein identification technique (mudPIT) was used to identify CEF proteins. A total of 663 proteins were identified, of which the most abundant proteins observed in a semi-quantitative analysis were as follows (spectral counts): epididymal-specific lipocalin-5 (1465), beta-hexosaminidase subunit precursor beta (1346), phosphatidylethanolamine -binding protein 4 precursor (367), lactotransferrin precursor (226), Brain acid soluble protein 1 isoform 2 (134), di-n-acetylchitobiase, partial (115), alpha-mannosidase epididymis-specific (114), epididymal secretory glutathione peroxidase precursor (112), reticulocalbin 2 isoform-1 (103) and alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme (101). The emergence of new techniques of proteomic analysis provides a better understanding of metabolic pathways and metabolic processes guided by proteins. Identify 663 proteins in the CEF of boars means understand the storage process to which sperm cells undergo and, from that, be able to develop breeding techniques both to solve problems of human infertility as of agricultural production. In a second experiment, the activity of antioxidant proteins present in the seminal plasma during the four seasons of the year and its seasonal variation in correlation with sperm quality parameters were evaluated. The enzymes previously selected for evaluation were superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The evaluated seminal parameters were constant throughout the whole year, with no difference between stations, only in sperm concentration and motility after 5 days after storage at 17 ° C. The antioxidant defenses of the seminal plasma, through measures of GPx and SOD activities remained constant during the year. The evaluation of these enzymes in the sperm showed an increase of SOD activity in spring and summer ($P < 0.05$). The activities of GPx and SOD had only two correlations, total motility after 5 days of preservation at 17 ° C. The SOD activity in the sperm had a weak

negative correlation ($R^2 = -0.4517$, $P = 0.0022$). In seminal plasma, GPx also showed a negative correlation ($R^2 = 0.2447$, $P = 0.0369$).

Key-Words: sperm preservation, mass spectrometry, seasonality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenças quantitativas seminais entre o suíno e outras espécies de animais domésticos.....	23
Tabela 2 - Datas de realização das coletas de amostras de sêmen.....	49
Tabela 3 - Dados de temperatura da região do Vale do Taquari no período de Setembro de 2015 a Agosto de 2016.....	49
Tabela 4 - Protocolo utilizado para preparação das amostras de células espermáticas e plasma seminal.....	51
Tabela 5 - Parâmetros de qualidade seminal avaliados durante o estudo.....	51
Tabela 6 – Dez proteínas mais abundantes identificadas no fluido da cauda do epidídimo de suíno por MudPIT.....	58
Tabela 7 – Diferentes rotas metabólicas envolvendo algumas das proteínas detectadas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos através da técnica e MudPIT.....	59
Tabela 8 - Parâmetros de qualidade seminal avaliados durante as quatro estações do ano e em diferentes tempos de avaliação.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de plasma seminal (PS), estruturas e funções.	20
Figura 2: Aspectos gerais do sistema reprodutivo do cachaço.....	22
Figura 3: Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água.....	29
Figura 4: Reação de dismutação do radical superóxido.....	34
Figura 5: Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em água com concomitante oxidação da glutathione peroxidase reduzida (GSH).....	35
Figura 6: Esquematização do processo de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT).....	44
Figura 7: Proteínas identificadas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos.....	55
Figura 8: Análise da ontologia gênica (GO) das proteínas identificadas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos.....	56
Figura 9 - Atividades de SOD e GPx em espermatozoide e plasma seminal suíno coletado nas diferentes estações do ano.....	63
Figura 10: Análise de correlação das enzimas SOD e GPx e motilidade espermática total após 120 h de conservação a 17°C.....	64
Figura 11: Variação individual das defesas antioxidantes na célula espermática (A e B) e plasma seminal (C e D) dos animais observados durante o experimento nas diferentes estações do ano.....	65
Figura 12: Esquema representando proteínas do fluido da cauda do epidídimo suíno identificadas pela técnica de MudPIT.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Objetivos.....	16
1.2	Justificativa.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	O sêmen suíno.....	18
2.2	Aspectos anatômicos e fisiologia reprodutiva do cachaço.....	21
2.3	Sazonalidade.....	23
2.4	Inseminação Artificial (IA).....	25
2.5	Refrigeração do sêmen suíno.....	27
2.6	Estresse oxidativo.....	29
2.7	Antioxidantes presentes no plasma seminal.....	33
2.7.1	Superóxido Dismutase.....	33
2.7.2	Glutathione Peroxidase.....	35
2.7.3	O epidídimo.....	36
2.7.4	O fluido epididimário como órgão de armazenamento e preservação de espermatozoides.....	38
2.7.5	Análise proteômica de fluidos reprodutivos masculinos.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Comitê de ética.....	45
3.2	Experimento 1 – Proteômica do Fluido epididimário de suínos.....	45
3.2.1	Local, animais e amostras de epidídimos.....	45
3.2.2	Análise proteômica por identificação multidimensional de proteínas (<i>Multidimensional Identification Technology – MudPIT</i>).....	46
3.2.3	Análise de bioinformática.....	48
3.3	Experimento 2 – Variação sazonal de enzimas antioxidantes do sêmen e parâmetros seminais de suínos.....	49
3.3.1	Local, animais e ejaculados.....	49

3.3.2	Coleta de amostra e refrigeração.....	50
3.3.3	Parâmetros seminais.....	51
3.3.4	Análises enzimáticas.....	52
3.3.4.1	Superóxido Dismutase.....	52
3.3.4.2	Glutathione Peroxidase.....	52
3.3.5	Análise estatística.....	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Experimento 1 - Proteômica do fluido epididimário de suínos.....	54
4.2	Experimento 2 - Variação sazonal de enzimas antioxidantes do sêmen e parâmetros seminais de suínos.....	62
5	DISCUSSÃO.....	66
5.1.1	Experimento 1 - Proteômica do fluido epididimário de suínos.....	66
5.1.2	Experimento 2 - Variação sazonal de enzimas antioxidantes do sêmen e parâmetros seminais de suínos.....	74
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2015, segundo dados gerados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil apresenta 1,52 milhões de matrizes em produção. O abate anual por matriz ativa é de 24,65 animais, produzindo assim 3472 mil toneladas de carne suína ao final do ano de 2014 e com projeções de produção de 3524 mil toneladas para o ano de 2015. No mundo, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o ano de 2014 produziu 110606 mil toneladas de carne suína e a projeção para 2015 é que se produza 111845 mil toneladas. O Brasil ocupa quarto lugar em produção mundial de carne suína e quarto lugar na exportação mundial desta proteína (USDA, 2013). Segundo dados publicados pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2011 e veiculados pelo Fundo da População das Nações Unidas, o prognóstico de crescimento da população mundial para 2050 é de 10,6 bilhões de pessoas. Essa população em constante crescimento não deixará de consumir carnes, o que leva a cadeia produtiva a produzir cada vez mais com os recursos finitos de água e terra cultivável. O segmento suinícola deverá crescer 12,2% em todo o mundo até 2023, segundo projeções do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Tomando-se por base estas informações, é evidente que a tecnificação da produção se torna indispensável e a implementação de biotécnicas que auxiliem, acelerem e reduzam custos dos manejos da produção de suínos sejam cada vez mais utilizadas.

A produção de suínos vem sofrendo alterações ao longo dos anos; buscou-se reduzir gastos e produzir com qualidade sem altos custos visando a competitividade do setor. Ao encontro disto, vários manejos diários foram repensados e reformulados, com o intuito de agregar tecnologia e valor ao produto final. Um exemplo clássico dessa tecnificação é a inseminação artificial (IA). Essa biotécnica consolidou seu emprego comercial em várias espécies domésticas ao longo da segunda metade do século XX; já em suínos iniciou-se sua utilização nas décadas de setenta e oitenta, consolidando-se nos anos noventa (BORTOLOZZO e WENTZ, 2005). Somente na última década

houve um aumento de 1.700% no emprego da IA na suinocultura brasileira. Esse aumento se deve ao fato basicamente da realização simples que esta biotécnica possui e as inúmeras vantagens que ela agrega à produção (ABIPECS, 2010).

A IA com sêmen refrigerado é considerada a principal técnica aplicada ao manejo reprodutivo suíno e tem contribuído para o aperfeiçoamento de vários aspectos na produção suinícola (KNOX, 2016). Ao longo dos anos, esta técnica vem sofrendo constantes mudanças a fim de se utilizar cada vez mais e de melhor forma os animais de superior valor genético de um plantel. Sua grande difusão foi devida basicamente à busca pela utilização de animais que agregassem valores de interesse ao produto final, tais como: carne magra, conversão alimentar e rusticidade (BORTOLOZZO et al., 2005). Além disso, outras vantagens como ganho genético do rebanho, melhor utilização das instalações, maior segurança sanitária, cuidados higiênicos no momento da cobertura, avaliação e descarte de ejaculados impróprios para o uso e evolução técnica da equipe que executa todos os processos de inseminação são algumas das vantagens que podem ser listadas com o advento desta biotécnica (WENTZ et al., 2000).

O proteoma do fluido epididimário do suíno foi descrito pela primeira vez por Dacheux e colaboradores, com um total de 146 proteínas identificadas sendo secretadas pelo epidídimo (SYNTIN et al., 1996). A secreção de proteínas nas regiões da cabeça, corpo e cauda representa 83%, 16% e 1% do total de secreção epidídimo, respectivamente (DACHEUX et al., 2005). Apesar do teor de proteína secretada ser baixo, a cauda do epidídimo é mais do que apenas um reservatório do já maduro, embora inativo, espermatozoide. O fluido epididimário desta porção, quando em contato com as células espermáticas, impede a capacitação prematura (ROBERTS et al., 2003), protege contra o estresse oxidativo (HINTON et al., 1995) e mantém a quiescência metabólica (HINTON & PALLADINO, 1995). Além disso, pode-se dizer que existem mecanismos de defesa específicos presentes na cauda do epidídimo, onde ocorre a síntese e secreção de proteínas conhecidas como defensinas, moléculas responsáveis por promover a rápida eliminação de agentes potencialmente nocivos (ROBAIRE & HINTON, 2015).

A composição de proteínas do fluido epididimário está diretamente relacionada com a atividade secretora do seu epitélio, uma vez que quase todas as proteínas testiculares são reabsorvidas no segmento inicial do órgão (DACHUEX et al., 2006). Assim, conhecendo mais profundamente a composição deste fluido, é possível se ter uma melhor compreensão dos problemas de infertilidade e quem sabe levar ao desenvolvimento de técnicas de preservação de espermática mais acuradas. Abordagens baseadas em gel 2-DE demonstraram a secreção de algumas proteínas importantes no lúmen do epidídimo de reprodutores suínos, tais como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, peroxiredoxina, lactoferrina, proteína secretora do epidídimo E1 (HE1) e lipocalina-5 (E-RABP epidídimo-specific) (KYUNGHEE et al., 2012; SYNTIN et al., 1999). No entanto, para uma melhor compreensão das funções das proteínas do epidídimo e as suas potenciais aplicações biotecnológicas é necessário expandir o nosso conhecimento sobre o proteoma do fluido epididimário.

O surgimento de uma nova técnica proteômica baseada em espectrometria de massa acrescentou uma nova dimensão para o campo de pesquisa (SCHIRMMER et al., 2003; BATRUCH et al., 2011; UADHYAY et al., 2013). Neste primeiro trabalho, relatamos o uso de uma técnica de '*Shotgun Proteomics*' através da Tecnologia Multidimensional de Identificação Proteica (MudPIT) para identificar o máximo de proteínas possível no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos. O ejaculado suíno possui diferentes porções que variam na sua composição bioquímica conforme a contribuição dos testículos, epidídimo e glândulas acessórias durante a ejaculação (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009). No entanto, as duas porções mais bem estudadas até então são as porções rica, que contém a maior parte dos espermatozoides do ejaculado; e a porção pobre, detentora da maior parte das proteínas do ejaculado e constituinte de grande parte do volume do mesmo, representando de 70 a 90% do seu total (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009, SANCHO & VILAGRAN, 2013). Da mesma forma, a importância do plasma seminal tanto para as células espermáticas durante seu amadurecimento e armazenamento quanto para desempenhar corretamente suas funções no trato reprodutivo da fêmea estão bem descritos na literatura (XU et al., 1996; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al.,

2005; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009; NOVAK et al., 2010; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Quando se analisa a qualidade seminal, encontram-se na literatura inúmeros fatores influenciando essa característica, tais como a genética, raça, composição do plasma seminal, variabilidade individual e sazonalidade (STREZEZEL et al., 2000; CIERESZKO et al., 2000; MURASE et al., 2007; FLOWERS, 2008; EINARSSON et al., 2008; WYSOKINSKA et al., 2009; ADAMIAK, 2010; KNECHT et al., 2013). No entanto, dentre todos os fatores já descritos, os dois que aparecem como tendo a maior influência na qualidade seminal são a variabilidade individual e a sazonalidade. A análise da qualidade seminal é essencial para um bom funcionamento de centrais de inseminação de suínos (FLOWERS, 2008; WYSOKINKA et al., 2009; ADAMIAK et al., 2010). Entender e remover as fontes de variação nos parâmetros de qualidade seminal torna-se de suma importância para a produção, reduzindo as perdas econômicas com variações sazonais e auxiliando a melhorar as técnicas de preservação seminal e criopreservação. Os efeitos da sazonalidade como um todo ainda não foram elucidados e, com este segundo estudo, espera-se elucidar o comportamento das enzimas antioxidantes no plasma seminal e nas células espermáticas durante as quatro estações do ano, a fim de contribuir para este entendimento.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi descrever a proteômica do fluido epididimário suíno e avaliar a influência sazonal nas defesas antioxidantes do sêmen de reprodutores suínos em uma granja comercial.

Como objetivos específicos:

- Caracterizar as proteínas presentes no fluido da cauda do epidídimo suíno por análise proteômica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT);

- Identificar as variações sazonais da qualidade seminal de suínos reprodutores em uma granja comercial;
- Verificar se as atividades das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase são alteradas durante o ano;
- Correlacionar as atividades antioxidantes enzimáticas mensuradas com as características seminais encontradas.

1.2 Justificativa

A inseminação artificial com sêmen refrigerado é fundamental na cadeia produtiva da carne suína. Com as demandas de aumento de produtividade, diretamente associadas a taxas de fertilidade, compreender os aspectos fisiológicos da produção e preservação espermática é essencial. Assim, o primeiro projeto visa ampliar os conhecimentos sobre o ambiente epididimário, possibilitando o estudo e o desenvolvimento de novas tecnologias de preservação espermática.

O estresse por calor pode resultar em consequentes impactos na qualidade seminal dos animais. No segundo estudo, buscou-se identificar estas variações seminais sazonais, correlacionando-as com alguns dos sistemas enzimáticos de proteção espermática conhecidos. Avaliar e quantificar as defesas antioxidantes enzimáticas do plasma seminal de reprodutores suínos e correlacionar esses dados com as alterações no padrão das características seminais observadas ao longo das estações do ano se torna importante a partir do momento que se pode, a partir disso, lançar mão de manejos na rotina da granja que possam evitar que estas alterações venham a prejudicar a qualidade seminal dos animais e tragam impacto no desempenho reprodutivo das fêmeas que são cobertas com o sêmen destes animais posteriormente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O sêmen suíno

O sêmen suíno é constituído basicamente de células espermáticas e plasma seminal. Os espermatozoides de mamíferos são formados por estruturas conhecidas como cabeça, colo, peça intermediária e cauda e seu comprimento é específico para cada espécie (PESCH & BERGMANN, 2006). O comprimento do espermatozoide suíno fica entre 50 e 60 μm (SCHNORR, 1996), tendo a cabeça 8.5 μm de comprimento e 4.25 μm largura, a peça intermediária 10.0 μm de comprimento e a cauda 30 μm de comprimento (SMOLLICH & MICHEL, 1992).

Quando se observa o plasma seminal, pode se dizer que ele constitui uma mistura complexa de secreções provenientes dos testículos, epidídimos e órgãos acessórios (CABALLERO et al. 2008). Os componentes bioquímicos são secretados na rede testicular, epidídimo e glândulas sexuais acessórias do trato reprodutivo masculino (MANN & LUTWAK-MANN, 1981). As vesículas seminais, próstata, e glândulas bulbouretrais, são chamadas glândulas acessórias, pois contribuem com a maior parte do volume ejaculado, já a secreção da vesícula seminal, constitui a maior parte do plasma seminal (METAFORA et al., 1989), que possui elementos proteicos exclusivos de suma importância, tanto na capacidade de fecundação do espermatozoide quanto na fisiologia reprodutiva da fêmea (STRZEZEK et al., 2005). Pode-se dizer que o plasma seminal é essencial para as funções bioquímicas do ejaculado, possuindo concentrações abundantes de diferentes aminoácidos, peptídeos, lipídeos, ácidos graxos, bem como diferentes proteínas que exercem diversos papéis na função espermática (CAMPANERO-RHODES et al., 2005), desde a ejaculação até a fertilização (KRAUS et al., 2005).

As células espermáticas juntam-se ao plasma seminal durante a ejaculação em uma complexa mistura de secreções originárias do epidídimo e de glândulas

acessórias. Em resumo, o plasma seminal serve como veículo para ejaculação dos espermatozoides (CALVETE et al., 1997), além de estar envolvido em várias atividades do aparelho reprodutor feminino e masculino, garantindo a variabilidade e a capacidade de fertilização do espermatozoide (CAMPANERO-RHODES et al., 2005). Vários componentes do plasma seminal - incluindo proteínas, hormônios sexuais, e prostaglandinas - acompanham os espermatozoides para o trato reprodutor feminino (MATOUŠEK, 1985) e possuem capacidade biológica para proteger os espermatozoides de diferentes patógenos, no trato reprodutivo masculino e posteriormente no feminino (MAEGAWA et al., 2002). O plasma seminal ainda desempenha um papel imunoregulador, que é benéfico para a sobrevivência dos espermatozoides, no trato reprodutor feminino. A figura 1 apresenta um esquema com os principais componentes do plasma seminal.

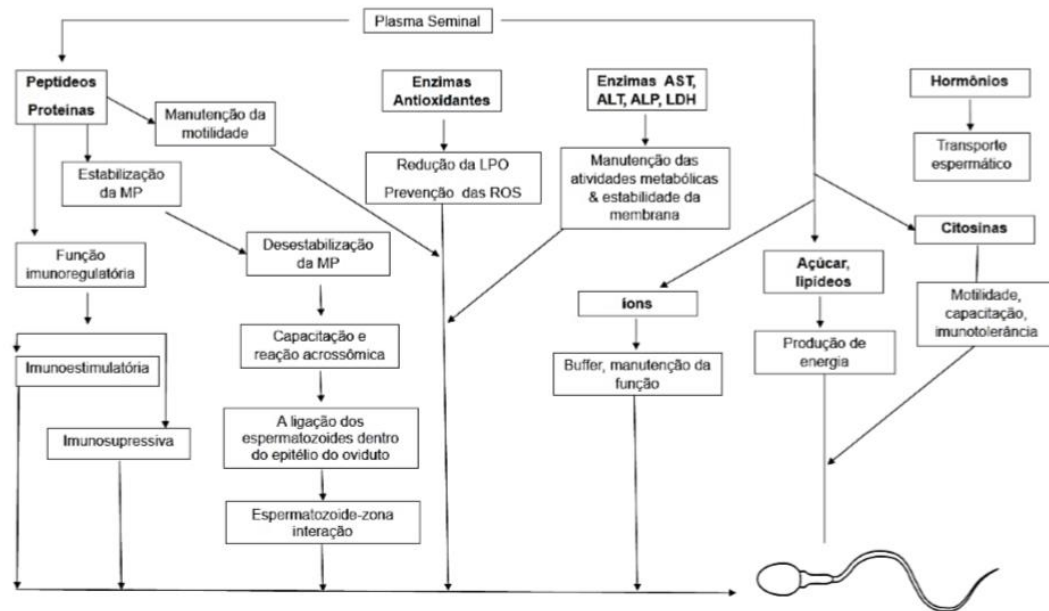


Figura 1: Modelo de plasma seminal, estruturas e funções. No modelo se concentram os principais componentes do plasma seminal e suas funções no espermatozoide. MP - indica membrana plasmática; AST - aspartato aminotransferase; ALT - alanina aminotransferase; ALP - fosfatase alcalina; LDH - desidrogenase láctica; LPO - peroxidação lipídica; ROS - espécies reativas de oxigênio; ET – epitélio. Fonte: LUCCA, 2014, adaptado de JUYENA & STELLETTA, 2012.

No suíno, o volume ejaculado pelos animais geralmente se mantém entre 150 a 300 mL. No entanto, sabe-se que variantes tais como raça, idade, ritmo de coleta, época do ano e até mesmo características individuais de cada reprodutor podem influenciar nestes valores (PRUNEDA et al., 2005a; PRUNEDA et al., 2005b; SMITAL, 2009; YESTE et al., 2010). No ejaculado, as secreções testiculares e epididimárias representam de 2 a 5% do volume total. Já as secreções oriundas das glândulas acessórias se dividem em 15 a 20% das vesículas seminais, 10 a 25% das bulbouretrais e 55 a 75% da próstata (BADIA, 2003). O ejaculado como um todo pode ser dividido em três frações básicas, o que determina estas frações é sua composição: pré-espermática, espermática e pós-espermática (BRIZ, 1994; SANCHO, 2002; YESTE, 2008).

2.2 Aspectos anatômicos e fisiologia reprodutiva do cachaço

O sistema reprodutivo do cachaço é constituído por seis diferentes estruturas: testículos, epidídimo, canais deferentes, uretra, glândulas acessórias e pênis (HAFEZ & HAFEZ, 2000; KNOBIL & NEILL, 2006). Sua função primordial é a produção e expulsão do sêmen no processo de ejaculação, composto basicamente por duas frações, a celular (correspondente aos espermatozoides), e a acelular (correspondente ao plasma seminal) (KNOBIL & NEILL, 2006). Os testículos são as gônadas masculinas e possuem função de produção das células espermáticas, mas podem também ser considerados glândulas endócrinas, uma vez que contribuem para as características sexuais do reprodutor produzindo o hormônio andrógeno testosterona nas células de Leydig e no epitélio dos túbulos seminíferos produzem ativinas e inibinas via células de Sertoli (GARCIA-GIL, 2002). Já os epidídimos transportam, maturam e armazenam as células espermáticas. Este processo realizado pelos epidídimos é de extrema complexidade, onde cada célula espermática adquire motilidade progressiva e habilidade fertilizante. As células maduras são armazenadas na porção mais caudal do epidídimo até o momento da ejaculação - recentes estudos demonstraram *in vitro* que as células espermáticas se mantêm em ligação direta com o epitélio do epidídimo neste local (YESTE et al. 2012). As glândulas acessórias podem ser divididas em vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais e a secreção de todas elas em conjunto forma o plasma seminal. Estas glândulas exócrinas depositam suas secreções diretamente na uretra, sendo que sua secreção é andrógeno-dependente.

As estruturas anatômicas do reprodutor suíno podem ser observadas na figura 2.

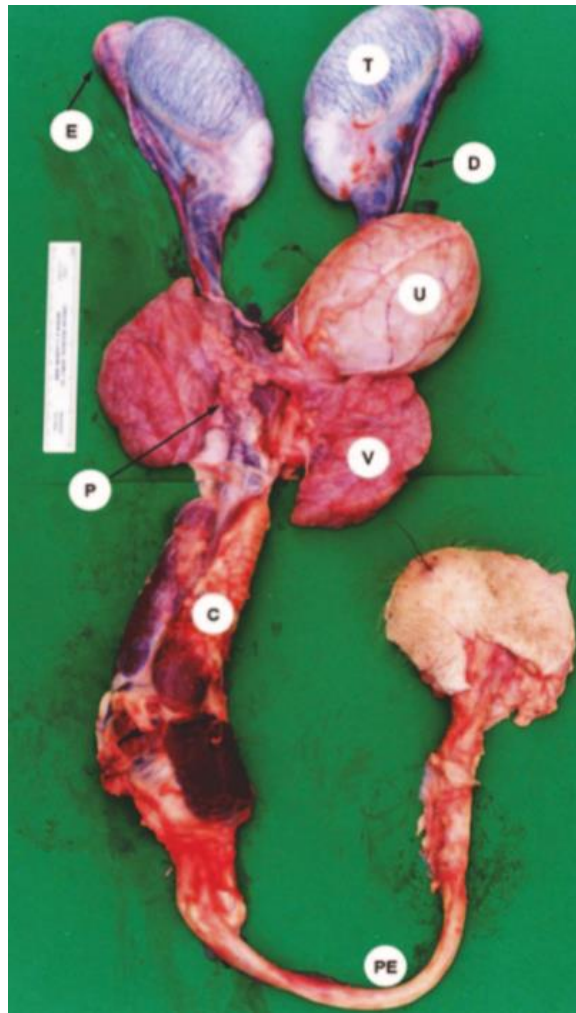


Figura 2: Aspectos gerais do sistema reprodutivo do cachaço. C: glândulas bulbouretrais; D: ducto deferente; E: epidídimo; P: próstata; PE: pênis; U: bexiga; V: vesículas seminais (BONET, et al. 2013).

Como funções fundamentais do sistema reprodutivo do macho, pode-se destacar a função endócrina, realizada pelas células de Leydig (síntese e secreção de testosterona) e células de Sertoli (síntese e secreção de inibina); e a produção, maturação e armazenamento dos espermatozoides com função fertilizante, realizada pelos testículos e epidídimos (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Já a fisiologia reprodutiva, (relacionada ao ciclo estral, reprodução sazonal, características anatomo-fisiológicas dos ovidutos, padrões de monta, etc.) determinam a existência de diferenças anatômicas e funcionais entre os sistemas reprodutivos das diferentes espécies de mamíferos existentes com interesse na produção (suínos,

equinos, bovinos, ovinos, etc.). A tabela 1 enfatiza as diferenças mais notórias entre o suíno e as outras espécies, que são o volume, a concentração e o total de células espermáticas por ejaculado observadas.

Tabela 1 - Diferenças quantitativas seminais entre o suíno e outras espécies de animais domésticos.

Características seminais	Suíno	Equino	Bovino	Ovino	Caprino	Coelho
Volume (mL)	150-300	60-70	5-7	1-1,5	0,8-1	0,6-0,8
Concentração (sptz/mL)	$0,2 \times 10^9$	$0,15 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	3×10^9	$2,4 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$
Células ($\times 10^9$ sptz)	10-100	9	5,5	3	2	0,03

Fonte: Hafez & Hafez, 2000; Knobil & Neill, 2006.

Um aspecto importante a ser ressaltado é o número de ejaculados com qualidade seminal considerado normal para estes reprodutores. Um reprodutor suíno sexualmente maduro pode chegar, por semana, a fornecer até três ejaculados com qualidade seminal, quando acostumado a este ritmo de coletas. No entanto, deve ser considerar que fatores como a idade, a sazonalidade, a nutrição e aspectos individuais de cada animal irão influenciar diretamente neste quesito. Quanto ao tempo de ejaculação do cachaço, pode-se considerar que um animal em ritmo de coleta pode precisar de 10-30 minutos para iniciar e finalizar seu processo de monta, não considerando vícios durante este período (HAFEZ & HAFEZ, 2000; KNOBIL & NEILL, 2006).

2.3 Sazonalidade

A performance reprodutiva dos animais domésticos depende de muitos fatores, tais como potencial genético, idade, raça, sazonalidade, temperatura ambiental, nutrição e práticas de manejo, conforme já mencionado anteriormente (KENNEDY, 1984; KUNAVONGKRIT, 2005; FLOWERS, 2008; PINART, 2013). Falando especificamente de machos reprodutores suínos, tem-se que estes fatores em conjunto chegam a afetar de 25 a 30% da qualidade seminal destes animais ao longo do ano (PINART, 2013). A qualidade seminal depende de fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal. Em relação a fatores extrínsecos, a temperatura ambiental, o fotoperíodo e o

ritmo de coletas de sêmen podem ser citados como tendo uma correlação negativa com a performance reprodutiva de cachacos (CIERESZKO et al., 2000; YESTE et al., 2010; SANCHO et al., 2004; SANCHO et al., 2006); por outro lado, a correta suplementação alimentar, contato social com outros animais da mesma espécie, protocolos corretos de processamento de sêmen e inseminação artificial possuem correlação positiva com a qualidade seminal (PRUNEDA et al., 2005a; YESTE et al., 2010; YESTE et al., 2011; KUNAVONGKRIT et al., 2005). Certamente, divergências destes efeitos podem ser observadas, podendo variar nos animais, atreladas a diversos fatores individuais.

Existem estudos mostrando que esta variação sazonal está atrelada a uma herança ancestral dos suínos selvagens europeus (*Sus scrofa ferus*), cuja estação reprodutiva ocorria no final do inverno e início da primavera, ao passo que no verão e início do outono se tornava reprodutivamente inativo (MAUGET & BOISSIN, 1987; KOZDROWSKI & DUBIEL, 2004). A sazonalidade reprodutiva, geralmente associada a variações de fotoperíodo e temperatura, possui um efeito marcado na qualidade seminal de cachacos. Diversos autores relatam os efeitos negativos das altas temperaturas e da sazonalidade na qualidade seminal (FLOWERS, 2008; PINART et al., 2013; YESTE et al., 2010; PARK, 2002; CIERESZKO, 2000; STRZEZEK et al., 2000; CHEON et al., 2002; SMITAL, 2009; WILCZYNSKA, 2013; KNECHT, 2014; ZASIADCZYK et al., 2015).

Entre os fatores citados, em muitos estudos destacam-se a sazonalidade e a individualidade como os fatores de maior influência na qualidade seminal, conforme já mencionado. Dentre estes estudos, alguns citam variações inclusive na composição do plasma seminal (STRZEZEK, et al., 2000; MURASE et al., 2007; KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011). O decréscimo do fotoperíodo nas estações de outono e inverno possui efeito negativo na qualidade seminal quando comparado com o acréscimo de fotoperíodo nas estações de primavera e verão (CIERESZKO et al., 2000; MURASE et al., 2007; WYSOKINSKA, 2009; ADAMIAK et al., 2010; KNECHT et al., 2013), sendo sugerido por diversos autores que a resposta do sistema reprodutivo de cachacos às oscilações de fotoperíodo é controlado por um mecanismo melatonina-dependente (KNECHT et al., 2013; MAUGET & BOISSIN, 1987; KOZDROWSKI & DUBIEL, 2004; KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011; KUNAVONGKRIT et al., 2005). Quando

observamos o suíno doméstico, as flutuações de fotoperíodo podem influenciar a função de testículos, epidídimos e secreção de glândulas acessórias via modulação e produção de testosterona (MURASE et al., 2007; PARK & YI, 2002). No entanto, sabe-se que condições ambientais estressantes, tais como altas temperaturas, podem elevar a produção de corticosteroides, alterando a função reprodutiva dos animais individualmente (EINARSSON, et al., 2008; KUNAVONGKRIT, et al., 2005).

2.4 Inseminação Artificial (IA)

Os primeiros relatos sobre experimentos com inseminação artificial datam do início do século XX vindos da Rússia (IVANOW, 1907; IVANOW, 1922). Após o início dos estudos sobre a técnica, outros grupos de pesquisadores nos Estados Unidos, Japão e Reino Unido seguiram o exemplo e passaram a explorar a técnica em busca de descoberta e aprimoramento durante a primeira metade do século XX (MCKENZIE, 1931; ANDERSON, 1945; ITO et al., 1948; POLGE, 1956; NIWA, 1958; MAULE, 1962; NISHIKAWA, 1964). Em todos estes casos citados, o sêmen era refrigerado em temperaturas que variavam de 7 a 20°C, sendo que os diluentes eram compostos basicamente de glicose e soluções de potássio de sódio ou sulfato de sódio e peptona, substâncias destinadas a manter uma baixa concentração de eletrólitos (ANDERSON, 1945; POLGE, 1956; MAULE, 1962). No entanto, a técnica de inseminação artificial atingiu seu ápice de utilização na produção em meados dos anos 90, sendo que seu início foi lento e de uso limitado até o final dos anos 80 (SILVEIRA & SCHEID, 2002). Em um levantamento feito por Knox em 2016, o autor cita que a IA é amplamente utilizada pelos plantéis tecnificados, sendo considerada a forma de reprodução eleita atualmente em quase sua totalidade. O sucesso da reprodução via inseminação artificial se deve ao fato principalmente dos índices produtivos alcançados com esta técnica serem considerados superiores à técnica de monta natural. Taxas de fertilidade, eficiência de trabalho, melhoramento genético e dados de produção são alguns dos parâmetros que se pode citar como sendo os pontos-chave de melhoria do processo. Quando se observa as taxas de parição alcançadas com a inseminação artificial, não é incomum encontrar valores próximos de 80-90%, assim como leitegadas atingindo 14 nascidos totais em média (KNOX, 2016).

O desenvolvimento da IA em suínos foi acompanhado pela adoção de estratégias de melhoria na eficiência reprodutiva do plantel, consolidando os ganhos genéticos advindos do uso dessa biotécnica. Nesse sentido, o principal avanço foi obtido pela redução do número de espermatozoides por fêmea inseminada. Essa redução foi possibilitada pela aplicação de protocolos de IA com fins de diminuir o número de doses inseminantes por estro e pelo desenvolvimento da técnica de IA pós-cervical com um número reduzido de espermatozoides (BORTOLOZZO et al., 2015). Para tanto, faz-se necessários programas rigorosos de garantia da qualidade espermática durante todo o processo de produção, distribuição e armazenamento das doses de sêmen, que sejam baseados em conhecimentos científicos recentemente desenvolvidos (RIESENBECK et al., 2015).

As doses inseminantes são preparadas a partir da diluição do sêmen *in natura* em um diluente de conservação, uma solução aquosa que visa manter a integridade e a capacidade fecundante dos espermatozoides por um determinado período de tempo (BUSSALLEU & TORNER, 2013). Para desempenhar essa função, a composição dos diluentes deve garantir funções básicas: manutenção do metabolismo espermático através do fornecimento de glicose; controle de pH por agentes tamponantes como bicarbonato de sódio, citrato de sódio, TRIS e HEPES; regulação da pressão osmótica do meio por sais como NaCl e KCl; e inibição do crescimento microbiano através da adição de antimicrobianos (GADEA, 2003). Além disso, componentes adicionais podem ser incorporados aos diluentes: substâncias quelantes como o EDTA capturam íons metálicos divalentes, principalmente o Ca^{2+} , de modo a prevenir a capacitação espermática e a reação acrossomal prematura (JOHNSON et al., 2000). A BSA possui efeito protetor das membranas e estimulador da motilidade espermática, provavelmente devido à capacidade da BSA de interagir com o colesterol modulando a fluidez da membrana plasmática (BUHR, 1990), de compensar o efeito da diluição das proteínas do plasma seminal e de controlar a peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2015). Antioxidantes como glutathione, extratos de plantas e frutos, flavonoides, própolis e vitaminas, podem compensar a perda da capacidade antioxidante natural dos espermatozoides que ocorre com a diluição do plasma seminal e o armazenamento das doses de sêmen (PETRUSKA et al., 2014).

A adoção da inseminação artificial como uma técnica de rotina não teria sido possível sem o estabelecimento de granjas dedicadas exclusivamente à coleta de sêmen, ou centrais de inseminação artificial de suínos (CIAS). A estes locais é confiada a tarefa de criação e manutenção dos reprodutores selecionados a partir de seu valor genético. O surgimento das CIAS traz consigo duas características muito importantes, a primeira foi o fim da produção *in loco* de doses inseminantes pelos produtores. Esse fato foi importante, uma vez que muitos produtores não estavam prontos para assumir esta responsabilidade e os resultados reprodutivos eram variáveis e irregulares. A segunda característica foi o aumento exponencial da qualidade genética dos reprodutores, com o melhor aproveitamento dos mesmos em comparação com a monta natural.

2.5 Refrigeração do sêmen suíno

A membrana plasmática dos espermatozoides é constituída em sua maior parte por ácidos graxos insaturados, o que proporciona a ela uma consistência fluída (WOLFE et al., 1998). A presença do colesterol e de proteínas integrais influencia na formação do arranjo lamelar de fosfolipídios, sendo responsável pela preservação da bicamada. Quando a relação colesterol : proteínas sofre alterações para uma proporção inferior a 1:2, o método de resfriamento possibilita um rearranjo, no qual os fosfolipídios vão se organizar de forma a adaptar-se ao resfriamento, em virtude da fase de transição do estado líquido para o cristalino (AMANN & PICKETT, 1987). Quanto maior a concentração de colesterol, menor é o dano causado na membrana espermática das espécies ao longo do processo de resfriamento, pois a composição dos fosfolipídeos, os níveis de colesterol, proteínas de membrana e condição de instauração da cadeia acil dos fosfolipídios, estão associados à fluidez da membrana (DARIN-BENNET & WHITE, 1977). Estas características são importantes durante a preservação do espermatozoide, em especial no congelamento, devido a alterações físicas na membrana e trocas de água entre o meio extra e intracelular, mediado por transportadores de membrana. A membrana plasmática do espermatozoide suíno é rica em ácidos graxos poli-insaturados, o que permite que os antioxidantes ajam sobre ela,

ocasionando alterações na característica espermática bem como danos estruturais e proteicos (DAVIES, 1987). Quando comparado a outras espécies, o espermatozoide suíno possui reduzida proporção de moléculas de colesterol, presentes de forma assimétrica na membrana plasmática (com maior acondicionamento na monocamada interna) (WATSON, 1995). Apresenta ainda, alta concentração de ácidos graxos insaturados, além de possuir poucas ligações duplas da configuração *cis* (CEROLINI et al., 2000).

As variações volumétricas, a oxidação de lipídios da membrana dos espermatozoides e os danos aos mecanismos de permeabilidade seletiva, são os fatores de estresse mais importantes do resfriamento e congelamento (PESCH & BERGMANN, 2006). Ainda, os danos ultraestruturais sempre vêm acompanhados por alterações bioquímicas, ou mesmo pela perda dos conteúdos vitais (SALAMON & MAXWELL, 1995). Independentemente do tipo de diluente empregado para a produção das doses de sêmen, os componentes devem prolongar a vida útil celular através da redução da atividade metabólica, a qual é favorecida pelo armazenamento em baixas temperaturas (BUSSALLEU & TORNER, 2013). No entanto, o espermatozoide suíno é extremamente sensível a baixas temperaturas e ao choque térmico pelo frio (PURSEL et al., 1973). A sensibilidade ao choque térmico está relacionada à composição de fosfolipídeos e esteróis na membrana plasmática – conforme mencionado - os quais conferem fluidez e estabilidade à membrana, respectivamente (HOLT, 2000). Em baixas temperaturas, entre 5 a 15°C, ocorre uma transição de fase dos fosfolipídeos da membrana, reduzindo a fluidez da membrana (DROBNIS et al., 1993). Apesar de os esteróis controlarem as transições de fase, os espermatozoides suínos apresentam baixa relação colesterol:fosfolipídeos e distribuição assimétrica de colesterol na membrana, o que os torna mais sensíveis aos danos induzidos pelo resfriamento (DE LEEUW et al., 1990; PARKS & LYNCH, 1992), culminando, portanto, em desestabilização da permeabilidade da membrana e perda da integridade das membranas plasmática e acrossômica (DE LEEUW et al., 1990; WATSON, 2000). Em função dessa sensibilidade do espermatozoide suíno ao resfriamento, a criopreservação do sêmen é utilizada majoritariamente para conservação de material genético por tempo prolongado e transporte a longas distâncias. Enquanto isso, 99%

das doses de sêmen suíno produzidas no mundo são utilizadas no estado líquido e conservadas entre 15 e 20°C (JOHNSON et al., 2000).

Os espermatozoides de mamíferos apresentam alta vulnerabilidade ao estresse oxidativo, devido à sua ultraestrutura e composição bioquímica. Primeiramente, as células espermáticas possuem um citoplasma escasso em comparação à maioria das células, o que enfraquece o sistema intracelular enzimático de defesa antioxidante (AITKEN et al., 2010). Além disso, a membrana plasmática dos espermatozoides apresenta uma alta concentração de ácidos graxos polinsaturados, alvos preferenciais dos radicais livres (PARKS & LYNCH, 1992; CEROLINI et al., 2000; BROWNE et al., 2005). Por fim, os espermatozoides ainda possuem deficiência na enzima catalase, que participa ativamente da defesa antioxidante intracelular (BILODEAU et al., 2000).

2.6 Estresse oxidativo

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular, através da citocromo oxidase mitocondrial, sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (BERGENDI et al., 1999). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a reativos intermediários, tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($OH^{\cdot}$), e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme ilustrado na figura 3.

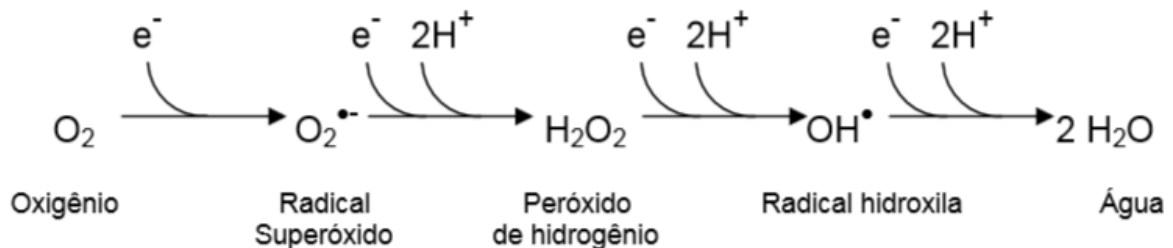


Figura 3 - Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água (BOVERIS, 1998).

Estes reativos intermediários, ou mais normalmente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), compreendem todos os radicais de oxigênio, sendo alguns radicais livres (RL). Estas últimas possuem um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo alta reatividade à molécula (AITKEN et al., 2014). O processo de estresse oxidativo tem início quando há excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor por diferentes origens (CHAMPE et al., 2006), ou então, é consequência de alterações no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante a favor do status oxidante, podendo ser causado pela produção elevada de ROS ou pela redução na quantidade de antioxidantes (SIES, 1985). A cadeia mitocondrial tende a perder de 2% a 5% dos elétrons durante a respiração celular, levando à conversão do oxigênio em ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (BOVERIS & CHANCE, 1973). No sêmen, a principal fonte de ROS são os espermatozoides imaturos (OLLERO et al., 2001) ou com defeitos morfológicos (BALL et al., 2001) e os leucócitos (AITKEN et al., 1996). Na ausência de geradores de ROS, o ejaculado suíno recém-coletado apresenta níveis basais considerados baixos, com menos de 4% dos espermatozoides afetados pela formação de ROS, indicando um controle eficiente do sistema de redução-oxidação (GUTHRIE & WELCH, 2006). As principais ROS produzidas pelos espermatozoides de mamíferos são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GUTHRIE & WELCH, 2012).

O sêmen de suínos é particularmente sensível aos danos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio devido ao alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, fosfolípidos de membrana, além de escasso citoplasma (STUBBS & SNITH, 1984; PARKS & LYNCH, 1992; CEROLINI et al., 2000; BROWNE et al., 2005). Além disso, a enzima catalase se mostra ausente nos reprodutores suínos, sendo seu papel na defesa antioxidante intracelular não desempenhado (BILODEAU et al., 2000).

A peroxidação dos lipídeos dos ácidos graxos pode ser um dos mecanismos responsáveis para as mudanças bioquímicas e fisiológicas negativas durante a estocagem de sêmen (CEROLINI et al., 2000) associadas a baixa capacidade antioxidante do plasma seminal suíno (BREZEZINSKA-SLEVBODZINKA et al., 1995). A membrana plasmática dos espermatozoides está envolvida com a fixação na zona pelúcida, bem com as mudanças importantes que ocorrem durante o processo de

capacitação espermática. As mitocôndrias localizadas na peça intermediária do espermatozoide geram a energia necessária para a movimentação do mesmo e são estas mitocôndrias as principais fontes geradoras de EROS (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007). Muitos autores descrevem os danos causados pelas ROS na membrana espermática e até mesmo no DNA causados pelo acúmulo excessivo de peróxidos (H_2O_2), o produto final do radical superóxido, em espermatozoides humanos (AITKEN & KRAUS, 2001) e bovinos (CHATTERJEE & GAGNON, 2001). Estes dados nos levam a crer que os danos oxidativos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio, principalmente no DNA mitocondrial e arquitetura da membrana podem ser os fatores de maior relevância para diminuição da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (CUMMINS et al., 1994). Complementar a estes estudos, em 1992 Erasmus e colaboradores demonstraram que a perda de motilidade em amostras de sêmen e o aumento de defeitos morfológicos em espermatozoides individualmente analisados das mesmas amostras estava relacionada com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Portanto, a presença de excesso de ROS no sêmen pode ser associada com baixa motilidade e piora na morfologia espermática (AGARWAL et al., 1994).

A suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo acarreta em danos à estrutura e função das células espermáticas uma vez que, sob condições oxidativas extremas, os lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos são alvos potenciais das EROS. O primeiro componente da célula espermática atingido pelas ROS é a membrana plasmática, devido à abundância de substrato para a peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2000). A lipoperoxidação danifica a estrutura dos fosfolipídeos da membrana plasmática, levando à perda da fluidez e da integridade da membrana (AITKEN et al., 1993). Além dos danos peroxidativos na membrana plasmática, as EROS estão relacionadas a danos ao DNA nuclear, sendo considerado uma das principais causas de fragmentação de DNA nos espermatozoides (AITKEN et al., 1998; DE IULIIS et al., 2009). O metabolismo espermático também é afetado pela lipoperoxidação devido à depleção de ATP induzida pelas ROS, culminando em redução da motilidade espermática (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; GUTHRIE et al., 2008). Quando tomadas em conjunto, as consequências do estresse oxidativo nos espermatozoides compreendem desde a perda da função espermática, devido à quebra

da integridade da membrana plasmática, até a morte celular causada por danos ao DNA espermático nuclear (AITKEN et al., 2014).

As EROs estão normalmente associadas a processos patológicos; no entanto, sua presença é importante em uma série de processos fisiológicos da célula espermática. Muitos estudos mostram sua importância na fertilidade masculina, estando envolvidas na capacitação espermática, reação acrossomal do espermatozoide e ligação da célula espermática à zona pelúcida do óvulo quando em concentrações normais no organismo, por exemplo (O'FLAHERTY et al. 1999; AWDA et al., 2009). Estudos sobre preservação seminal normalmente concluem que existe uma geração de ROS durante o período de estocagem das doses inseminantes (BAYLEY et al., 2000); no entanto, em 2004, os autores Aitken e Krausz chamaram a atenção para a importância das espécies reativas de oxigênio para a capacitação e motilidade espermática do espermatozoide com um artigo de revisão bibliográfica. A produção de ROS em baixas quantidades desempenha um papel importante no processo de fecundação, durante a capacitação espermática, hiperativação, integridade acrossômica e fusão com o oócito (AWDA et al., 2009). No entanto, como já comentado anteriormente, a geração excessiva de ROS, além do limite das defesas antioxidantes dos espermatozoides, induz ao estado de estresse oxidativo.

Recentemente, o estresse oxidativo vem sendo tema de diversas pesquisas na reprodução de suínos. O perfil lipídico da membrana dos espermatozoides e o status antioxidante do plasma seminal foram associados a diferenças na motilidade espermática no sêmen *in natura*, classificado como de baixa (< 60%) ou alta (> 60%) motilidade (AM-IN et al., 2011). Já em um estudo sobre os efeitos do armazenamento de doses de sêmen a 18°C, foi constatado que a peroxidação lipídica ocorre durante a preservação do sêmen, e que a mesma afeta negativamente a motilidade, integridade de membrana e de acrossoma (KUMARESAN et al., 2009). Em relação à fertilidade de reprodutores, a identificação de proteínas específicas do plasma seminal através de análise proteômica permitiu diferenciar reprodutores de baixa e alta fertilidade *in vivo*. Dentre essas proteínas, a GPx5 foi relacionada, sugerindo a influência do estresse oxidativo na fertilidade (MAY et al., 2015). Além disso, diversos estudos têm avaliado a suplementação de antioxidantes na dieta de reprodutores (LOVERCAMP et al., 2013;

PETRUJKIĆ et al., 2014; LIU et al., 2015) ou nos diluentes que compõe as doses de sêmen (MENDEZ et al., 2013; LEE & PARK, 2015) e os efeitos que exercem na qualidade espermática.

2.7 Antioxidantes presentes no plasma seminal

Serão tratadas aqui as proteínas que serviram como base para o estudo subsequente, mas cabe ressaltar que o plasma seminal é considerado como principal fonte de antioxidantes, que são substâncias capazes de atuar como cofatores de enzimas antioxidantes ou de agir diretamente na neutralização de radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo (AITKEN, 1995). No sistema antioxidante seminal destacam-se, além das próprias proteínas do plasma seminal discutidas abaixo, os antioxidantes de baixo peso molecular: ácido úrico, albumina, taurina e outros tiois (-SH), vitamina E (α -tocoferol) e vitamina C (ácido ascórbico) (STRZEŻEK et al., 1999).

2.7.1 Superóxido Dismutase

A superóxido-dismutase (SOD) é a principal defesa contra o íon superóxido, um dos principais fatores de toxicidade do O_2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Ela é considerada uma metaloenzima, ou seja, sua forma depende tanto da localização quanto do metal presente em sua estrutura. Por conta disso, diz-se que a SOD compõe uma gama de enzimas, chamada comumente de família, com diferentes grupos proteicos. Apesar destas diferenças, todas as formas de SOD catalisam a mesma reação: aceleram a dismutação do íon superóxido, formando o peróxido de hidrogênio e oxigênio e oxigênio, conforme a figura 4. Seu papel antioxidante se dá pela ação catalisadora desta reação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

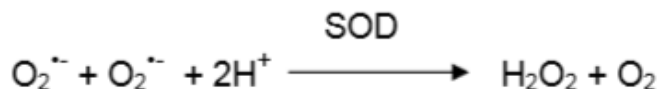


Figura 4: Reação de dismutação do radical superóxido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A SOD conhecidamente compõe as defesas antioxidantes do plasma seminal de reprodutores suínos; ela faz parte de um complexo sistema de defesa que catalisa a dismutação de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio no plasma seminal, como descrito anteriormente. Essa enzima está envolvida tanto nas defesas antioxidantes intra como extracelulares. Sua atividade já pode ser notada desde o início da maturidade sexual dos animais, a partir dos oito meses de idade, sugerindo uma correlação entre a presença desta enzima e a caracterização da maturidade e atividade sexual dos animais, pois além dos animais jovens, animais abaixo de 2 anos de idade também apresentam grades quantidades desta enzima no plasma seminal, segundo estudo feito por Kowalowka e colaboradores em 2008.

Outro aspecto interessante desta enzima é que sua atividade é alterada sazonalmente, sendo significativamente maior no outono e inverno, o que vai ao encontro de estudos já realizados pelo grupo de Strzezek em 2000, onde foi observada uma redução da capacidade antioxidante do plasma seminal em épocas quentes.

É importante deixar claro que a SOD não é uma enzima específica do trato reprodutivo masculino, podendo ser observada em outros tecidos extracelulares tais como os linfonodos. No tecido testicular propriamente dito, as células de Sertoli são responsáveis pela síntese e secreção desta enzima (MRUK et al., 1998).

O papel fisiológico da SOD é manter o equilíbrio entre peróxidos de hidrogênio e ânions de superóxido; sua alta atividade no plasma seminal protege espermatozoides maduros da excessiva dismutação dos ânions superóxido (MRUK, 1998). Por outro lado, quando encontrada em baixas quantidades ou com baixa atividade, provoca uma situação patológica, onde células espermáticas defeituosas podem ser observadas com excesso de citoplasma residual em suas caudas, defeito conhecido como gota citoplasmática distal ou proximal (AITKEN, 1995; AITKEN et. al, 1996).

2.7.2 Glutathione Peroxidase

A glutathione-peroxidase (GPx) é a enzima responsável por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O), concomitantemente com a oxidação da glutathione reduzida (GSH), que age como doador de hidrogênios, à glutathione em sua forma oxidada (GSSG). Sua ação ocorre basicamente em nível de citosol (Figura 5). (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).



Figura 5: Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água com concomitante oxidação da glutathione peroxidase reduzida (GSH) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Esta enzima é conhecidamente uma das proteínas que compõem os mecanismos de defesa contra os ROS. Ela foi descrita por muitos autores como constituinte do plasma seminal de mamíferos (ALVAREZ & STOREY, 1989; OCHSENDORF et al., 1998), e pela primeira vez demonstrada especificamente no plasma seminal de reprodutores suínos por Li, em 1975. Em 2004, Gadea e colaboradores avaliaram as alterações ocorridas com a glutathione-peroxidase antes e depois da criopreservação de doses de sêmen suíno e seus resultados demonstraram que há um decréscimo da atividade desta enzima após o congelamento e descongelamento das doses inseminantes. Ainda, o acréscimo de GPx durante o processo não auxiliou na melhora da qualidade das doses congeladas, porém auxiliou nos parâmetros de habilidade fertilizante quando adicionada ao processo de descongelamento.

2.8 O epidídimo

O termo epidídimo é derivado das palavras gregas *epi* (= sobre) e *didymoi* (= testículos) e refere-se ao órgão que conduz os espermatozoides dos ductos eferentes do testículo para os canais deferentes (COOPER, 1998). O epidídimo do cachaço contém um ducto epididimário com aproximadamente 54 metros de comprimento, firmemente enrolado e incluído em uma matriz de tecido conjuntivo ricamente vascularizado e innervado. O epidídimo é recoberto por uma cápsula fibrosa e pode ser anatomicamente dividido em três regiões principais: *caput* (cabeça, região proximal ou inicial), *corpus* (corpo ou região intermediária) e *cauda* (cauda ou caudal, região distal ou terminal) (COOPER, 1998). A região proximal se apresenta de forma mais achatada que as outras regiões e mantém o ducto epididimário ligado ao testículo através dos ductos eferentes. A região do corpo, mais estreita e alongada, está localizada sobre um lado do testículo e faz a ligação da região proximal com a região caudal. A região caudal é uma das mais proeminentes e contém um ducto epididimário que se comunica diretamente com o canal deferente (PRUNEDA, 2006). Quando o espermatozoide deixa os dutos eferentes e entra no ducto epididimário, ele leva cerca de 12 a 15 dias para viajar todo o seu comprimento (3 dias para a cabeça, 2 dias para o corpo, e de 7 a 10 dias para a cauda). A distância percorrida a cada dia é de, aproximadamente, 5 metros (PRUNEDA, 2006).

As principais funções do epidídimo são: transporte dos espermatozoides dos ductos eferentes para os canais deferentes (COOPER, 1998), maturação dos espermatozoides (para aquisição de motilidade progressiva e capacidade fertilizante) (ROBAIRE & HERMO 1988; HINTON & PALLADINO 1995; COOPER, 1998; DACHEUX et al 1998; JONES, 1998; BASSOLS et al, 2004) e armazenamento dos espermatozoides até sua ejaculação (JONES, 1989; JONES & CLULOW, 1994). Uma observação importante a ser ressaltada é que o transporte das células através do epidídimo é facilitado por contrações do músculo liso presente neste órgão (ROBAIRE & HERMO, 1988; BASSOLS, 2006; PRUNEDA, 2006). Enquanto o processo de maturação ocorre nas regiões proximal e intermediária do epidídimo, a armazenagem dos espermatozoides ocorre na região caudal (HOLTZ & SMIDT, 1976). Nesta última

parte, as concentrações luminais dos íons sódio e bicarbonato são baixos e os de potássio são altos; já a osmolaridade e a concentração de espermatozoides são elevados e a pressão de oxigênio e os substratos de energia são baixos; a secreção de mucoproteínas de viscosidade e fatores de inibição da motilidade são característicos (COSENTINO & COCKETT, 1986). Tais condições físico-químicas mantêm os espermatozoides num estado quiescente (BASSOLS, 2006; FABREGA et al 2011a, b). Após a ejaculação, o número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo é reduzido em cerca de 60% (HUGHES & VARLEY, 1984; STRZEZEK, et al 1995; PRUNEDA, 2006).

Nos mamíferos, o epidídimo é o órgão onde o espermatozoide se torna maduro e fica estocado pré-ejaculação. A maturação espermática é o resultado de numerosas interações com fatores externos ao espermatozoide, basicamente compostos de proteínas, presentes no lúmen dos túbulos epididimários. Estas proteínas possuem diferentes origens, mas principalmente uma série delas são produzidas e sequencialmente sintetizadas pelo próprio epitélio do epidídimo (HINTON & PALLADINO, 1995). Diversos estudos correlacionam as diferentes funções destas proteínas epididimárias com a manutenção e proteção espermática, bem como sua relação com as funções desempenhadas pela célula espermática após a ejaculação, tais como composição de membrana, viabilidade celular e motilidade (BASSOLS et al. 2004). Essa modificação celular desde o testículo, de células espermáticas imaturas e imóveis até células extremamente diferenciadas e totalmente móveis e com capacidade fertilizante é um processo extenso e requer inúmeras diferenciações celulares (ABOU-HAILA & TULSIANI, 2000). Este processo de maturação envolve a célula espermática em uma viagem através do trato genital masculino, em especial no epidídimo, onde estas células são expostas, devido a estas inúmeras transformações, a diferentes formas de estresse oxidativo (SANOCKA & KURPISZ, 2004; VERNET et al., 2004). As espécies reativas de oxigênio podem ter atividades que beneficiam a maturação espermática, mas também podem prejudicar seu metabolismo, dependendo de suas concentrações (TREMELLEN, 2008; ESPINO et al., 2010; AWDA et al., 2009; De LAMIRANDE & LAMOTHE, 2009). Assim, visando prevenir os danos que o excesso de espécies reativas de oxigênio possa vir a causar às células espermáticas que estão em

trânsito no epidídimo ou àquelas armazenadas pré-ejaculação, o fluido epididimário possui mecanismos de defesa antioxidante. Em 2012, Park e colaboradores quantificaram a presença de três enzimas com atividade antioxidante durante o trânsito epididimário de reprodutores suínos: superóxido dismutase, glutathione peroxidase e peroxiredoxina. Como resultado, visualizaram um aumento de quantidade e atividade destas enzimas em direção à cauda do epidídimo, concluindo que diversas proteínas antioxidantes aumentam sua quantidade e atividade durante o trânsito do epidídimo de reprodutores suínos, contribuindo desta forma para a maturação e sobrevivência espermática.

2.8.1 O fluido epididimário como órgão de armazenamento e preservação de espermatozoides

Quando se analisa a maturação espermática no epidídimo, considera-se que ela representa um passo fundamental na produção de gametas viáveis. Durante o trânsito através do epidídimo, os espermatozoides são expostos a diferentes tipos de secreções, que constituem um ambiente natural essencial para a aquisição de motilidade e capacitação para fecundação destas células (MAÑÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ et al., 2015). Esse microambiente é protegido pela barreira hemato-testicular, que assegura uma proteção a estes gametas e regula a funcionalidade e integridade epididimária (DACHEUX et al., 2005). É importante ressaltar que a maturação dos espermatozoides no epidídimo não faz parte do processo de divisão celular e diferenciação destas células. Essencialmente, é uma consequência da interação entre o espermatozoide com o líquido do epidídimo e proteínas secretadas.

Nos testículos, as células de Sertoli secretam o fluido testicular que transporta os espermatozoides em direção ao ducto eferente e a cabeça do epidídimo, onde então a maior parte do fluido testicular é reabsorvido (SETCHELL, 1967; SETCHELL, 1969; TUCK et al, 1970; CHEUNG et al., 1977; COOPER, 1998). Diferentes processos - transporte de água e eletrólitos através do epitélio do epidídimo, secreção e reabsorção de substâncias e atividade metabólica de espermatozoide - ocorrem ao longo das

diferentes regiões do epidídimo, modificando a composição do fluido epididimário continuamente (BASSOLS, 2006). O fenômeno mais influente na composição do fluido do epidídimo é a secreção e reabsorção de substâncias realizada pelo epitélio do ducto do epidídimo. Esta troca de fluidos varia ao longo do curso epididimário, de modo que a composição deste fluido é tanto qualitativamente quanto quantitativamente diferente, dependendo da região do epidídimo em que é observado. Os processos de secreção e reabsorção ocorrem principalmente nos ductos eferentes da região proximal, diminuindo progressivamente em direção às regiões intermediária e caudal. Portanto, na cauda do epidídimo, a reabsorção e secreção atingem os valores mínimos e são equilibrados.

Vários fatores podem influenciar a atividade de secreção e absorção do epitélio do epidídimo - estresse, dieta, temperatura, frequência de coletas, etc. - levando a um processo de maturação celular incompleto (BRIZ et al., 1996) e, conseqüentemente, à perda de motilidade progressiva de espermatozoides e capacidade fertilizante. Por exemplo, um ritmo elevado de coletas seminais por semana implica em uma mudança no padrão de reabsorção e secreção do fluido epididimário e, como resultado, observa-se uma diminuição na taxa de reabsorção de fluido na porção proximal do epidídimo e uma tentativa de equilíbrio na reabsorção líquida da porção intermediária. Cachaços submetidos a um ritmo de coleta excessivo durante quatro dias já apresentavam alterações de motilidade, na migração da gota citoplasmática, em tamanho e forma da cabeça do espermatozoide, e na estabilidade da peça intermediária (PRUNEDA et al. 2005a, b; PRUNEDA, 2006).

A composição do fluido epididimário difere da composição do plasma sanguíneo. O primeiro é hipertônico no que diz respeito a este último (COOPER, 1998) e a barreira hemato-epididimária, a qual é formada por junções apertadas entre as células principais do epidídimo, impede a semelhança de fluidos a partir de ambos os compartimentos. O transporte de água no epidídimo é muito importante, afetando tanto a concentração de diferentes metabolitos quanto a concentração de espermatozoides. Na cabeça do epidídimo, a concentração de espermatozoides aumenta significativamente como resultado da grande quantidade de água reabsorvida (WONG, 1986). Uma concentração elevada de espermatozoides facilita a interação entre eles, os metabolitos luminiais e a superfície das células epiteliais do epidídimo. No fluido epididimário, íons

(Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , PO_4^{3-}), moléculas de baixo peso molecular (glicerofosfocolina, ácido siálico, carnitina, glicerol, inositol, etc.), lipídeos, proteínas (clusterina, imobilina, angiotensina, etc.), e enzimas (fosfatase alcalina, fosfatase ácida, alfa-glicosidase, N-acetilglucosaminidase, etc.) já foram descritos (ROBAIRE & HERMO, 1988; SYNTIN et al., 1996). Algumas moléculas de baixo peso molecular como, por exemplo, a água, podem atravessar a barreira hemato-testicular; no entanto, grandes moléculas de alto peso molecular, tais como a glicose, precisam ser transportadas através do epitélio do epidídimo (HINTON & HOWARDS 1982; TURNER & HOWARDS 1985). O transporte de algumas moléculas pode ocorrer por difusão facilitada, (BROOKS et al, 1974; HINTON & HOWARDS 1982) ou de forma ativa, mediada por hormônios andrógenos (JAMES et al . 1981).

Uma série de estudos vem analisando os componentes do fluido do epidídimo e sua correlação com as células espermáticas. A L-carnitina tem sido relacionada com o movimento progressivo destas células (JEULIN E LEWIN, 1996) e sua concentração no fluido aumenta ao longo do epidídimo (CASILLAS 1973; HINTON et al 1979; JEULIN et al 1994), sendo na porção distal do corpo do epidídimo e proximal da cauda onde atinge os seus valores mais elevados. No entanto, o teor de L-carnitina dos espermatozoides em si não varia ao longo do ducto epididimário (PRUNEDA et al., 2007). A concentração de mioinositol no líquido epididimário diminui ao longo do ducto; da mesma forma, o conteúdo de mioinositol nos espermatozoides diminui a partir da porção distal da cabeça. A concentração de glutamato no fluido aumenta ao longo do ducto, principalmente na porção distal do corpo e proximal da cauda do epidídimo; quando se observa o teor de glutamato no espermatozoide, o mesmo diminui a partir da cabeça do epidídimo e aumentos no corpo e cauda do epidídimo (PRUNEDA et al. 2006; PRUNEDA, 2007). Outros substratos de energia, tais como a glicose ou frutose, também apresentam um padrão de concentração distinta ao longo do ducto do epidídimo. A glicose aumenta progressivamente no fluido do epidídimo já a partir da porção distal da cabeça até a porção proximal da cauda, onde atinge os valores mais elevados, sendo curioso dizer que se torna virtualmente indetectável na porção distal da cauda (JONES & MONTAGUE, 1991; PRUNEDA et al., 2006). A frutose é indetectável no fluido do epidídimo da porção proximal da cabeça, mas aumenta gradualmente a

partir da sua porção distal até a porção proximal da cauda, sendo que neste local a concentração de frutose cai novamente (JONES & MONTAGUE, 1991; PRUNEDA et al., 2006). Por outro lado, a concentração de sorbitol do fluido epididimário é 10 vezes maior do que a glicose e a frutose em todas as regiões. O sorbitol, além de um substrato energético, é um agente osmótico que determina a regulação do volume de espermatozoide. Em suínos, a via do poliol tem sido observada no ducto epididimário. Nesta via, a glicose que entra no lúmen do ducto epididimário proveniente dos testículos ou do sangue é reduzida a sorbitol pela enzima aldose-redutase, ficando o sorbitol resultante acumulado no fluido epididimário e sendo subsequentemente transformado em frutose pela enzima sorbitol-desidrogenase (KINOSHITA & NISHIMURA, 1988; PRUNEDA et al., 2006).

Mais de 125 diferentes proteínas e enzimas já foram descritas no plasma seminal do suíno (SYNTIN et al., 1996). A concentração de proteínas totais é de aproximadamente 35 mg/ml na cabeça e cerca de 20 mg/ml no corpo e cauda do epidídimo. As proteínas sintetizadas e secretadas em uma dada região do epidídimo são reabsorvidas, metabolizadas, ou modificadas em uma mesma região ou em regiões posteriores. Assim, por exemplo, a maior parte da síntese e secreção de GPx é realizada na região proximal da cabeça do epidídimo, bem como a síntese da proteína de ligação do ácido retinóico (E-RABP); na porção distal da cabeça ocorre uma intensa secreção de clusterina e lactoferrina. A porção distal do corpo do epidídimo apresenta caracteristicamente duas proteínas ainda não identificadas descritas na literatura. Finalmente, na cauda do epidídimo tanto a quantidade como a tipologia das suas proteínas particulares são muito baixas com os estudos que se tem até então (SYNTIN et al., 1999). Muitas substâncias sintetizadas e secretadas pelas células epiteliais do epidídimo são, subsequentemente, expressas sobre a superfície do espermatozoide. Estas substâncias são transferidas a partir do fluido para a membrana desta célula, onde se ligam covalentemente, graças à ação de enzimas tais como as transferases ou por troca direta mediada por lipídeos, tais como glicosilfosfatidilinositol.

Portanto, as células espermáticas ficam suspensas neste líquido, conhecido como plasma seminal, o qual é composto pelas várias secreções originadas dos testículos, epidídimo e as diferentes glândulas acessórias (STRZEŻEK, 2002; RODRÍGUEZ-

MARTÍNEZ, 2009, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2011; JUYENA, 2012). Além disso, o plasma seminal possui uma enorme variedade de outros componentes bioquímicos que estão envolvidos com os processos de fertilização (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2011; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013; STRZEŻEK, 1999; KORDAN, 2003; GARCIA, 2006; KOZIOROWSKA-GILUN, 2011; CABALLERO, 2012; FLOWERS, 2013; GONZÁLEZ-CADAVID, 2014). Muitas evidências demonstradas em trabalhos anteriores nos levam a crer que existe correlação entre a ação de determinadas proteínas do plasma seminal e a qualidade espermática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009, GARCIA et al., 2006; CABALLERO et al., 2012; FRASER et al., 2007; VADNAIS et al., 2010) e seus efeitos são positivos na sobrevivência dos espermatozoides durante a estocagem de doses inseminantes nas diferentes épocas do ano (PARK et al., 2002; CHEON et al., 2002; FRASER et al., 2003; MURASE et al., 2007). Além disso, um estudo mais recente demonstrou que espermatozoides de ejaculados coletados durante o verão são mais suscetíveis a problemas de criopreservação (BARRANCO et al., 2013). Estes relatos sugerem que a função espermática é mais vulnerável quando correlacionada com a sazonalidade e a qualidade espermática do que à atividade das glândulas acessórias em si. Outro estudo relatou os efeitos sazonais na qualidade espermática e nas características do proteoma do plasma seminal em ejaculados fracionados de animais individualizados (ZASIADCZYK et al., 2015).

2.9 Análise proteômica de fluidos reprodutivos masculinos

A proteômica clássica utiliza técnicas de separação de proteínas de um complexo as quais, posteriormente, são identificadas por espectrometria de massas. Uma técnica de separação de proteínas amplamente utilizada é a eletroforese bidimensional (2D-GE), descrita por O'Farrell em 1975. No entanto, outros métodos mais acurados de separação de misturas proteicas complexas vêm emergindo nos últimos anos, tais como a separação por coluna cromatográfica, aprimorando essa etapa da pesquisa proteômica (MOTOYAMA & YATES, 2008). Após a digestão das proteínas presentes na amostra, a identificação das mesmas é realizada por espectrometria de massas, a qual

utiliza a análise de massas para caracterização das proteínas identificadas. Para tal, a utilização de diferentes tipos de ionizadores, analisadores de massas, fragmentadores de íons e, por conseguinte, programas computacionais de análises de dados são variamente empregados, visando a obtenção do mais representativo proteoma da amostra analisada, (HAN et al., 2008; YATES et al., 2009).

Quando se avalia a técnica de identificação multidimensional de proteínas (*Multidimensional Identification Technology* – MudPIT), observa-se que uma mistura complexa de peptídeos, originados da clivagem proteolítica da amostra, é carregada dentro de uma coluna (microcapilar) consistindo de uma resina de trocas catiônicas fortes e de fase reversa (LINK et al., 1999; WASHBURN et al., 2001; WOLTERS et al., 2001). Após a separação em duas dimensões, os peptídeos são injetados por eletrospray no espectrômetro de massas em tandem (MS/MS) (WASHBURN et al., 2001; WOLTERS et al., 2001).

Todos os dados gerados são submetidos a algoritmos específicos, neste caso o usado foi o ProLuCID (<http://fields.scripps.edu/downloads.php>), os quais interpretam os espectros de massas em tandem (MS/MS) gerados e identificam a sequência de peptídeos que melhor descreve o espectro MS/MS do qual ele foi gerado (ENG et al., 1994). Os resultados dessa busca são então posteriormente processados por filtros estatísticos, os quais determinam as identificações confiáveis e, assim, o conteúdo de proteínas da amostra original.

A principal vantagem da técnica de MudPIT é resolução de separação dos peptídeos. A separação cromatográfica bidimensional permite a técnica obter um intervalo dinâmico de quantificação superior ao da eletroforese bidimensional. Tem sido demonstrado que esta técnica possibilita uma maior detecção de proteínas de baixo peso molecular, as quais são praticamente indetectáveis utilizando-se a técnica de 2D-GE, possibilitando-se, assim, uma maior representação do proteoma da amostra de interesse (CHOE et al., 2005).

A figura 6 esquematiza o sistema de identificação multidimensional de proteínas em seu processo.

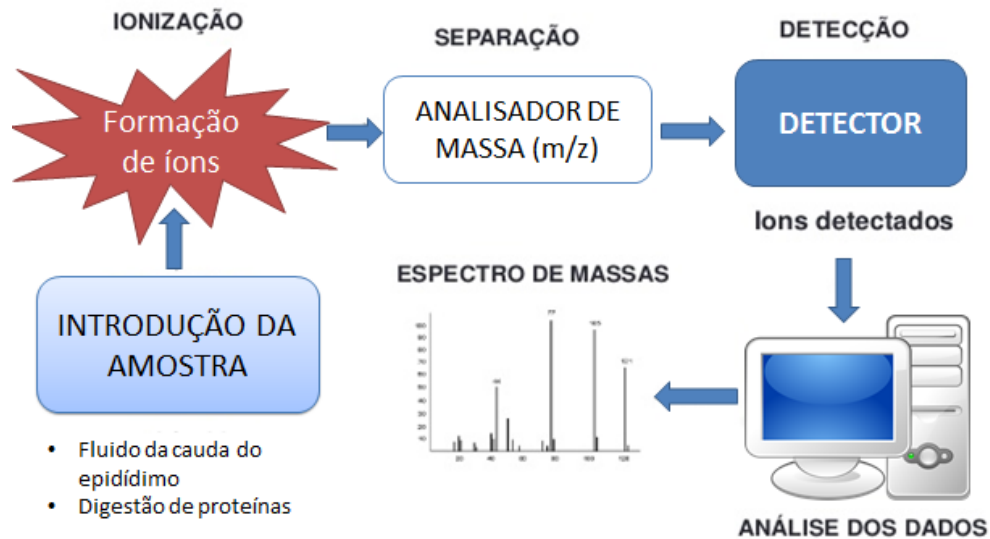


Figura 6: Esquematização do processo de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT).

A proteômica de uma forma geral vem contribuindo expressivamente para desvendar diferentes mecanismos biológicos. A influência da proteômica do plasma seminal durante o processo de congelamento em suínos foi avaliada por Rodríguez-Martínez e colaboradores utilizando técnicas de espectrometria de massa em 2008. González-Cadavid e colaboradores descreveram 120 proteínas presentes no plasma seminal suíno e observaram diferentes correlações entre as proteínas encontradas com parâmetros de qualidade seminal através da mesma técnica. Entender a composição do plasma seminal e o ambiente epididimário de manutenção das células espermáticas pré-ejaculação é fundamental tanto para a cadeia produtiva animal, quanto para estudos envolvendo a reprodução animal e humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, serão descritos os procedimentos adotados nos dois experimentos realizados para a realização desta dissertação.

3.1 Comitê de ética

Para os presentes experimentos não se fez necessária a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, pois não foram executadas quaisquer manipulações ou intervenções além das já exercidas com os animais em práticas agropecuárias usuais, conforme o parágrafo terceiro do artigo 1º da lei que regulamenta a experimentação animal no Brasil (Lei 11.794 de 2008), abaixo citado:

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – Estabelecimentos de ensino superior;

II – Estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

3.2 Experimento 1 - Proteômica do fluido epididimário de suínos

3.2.1 Local, animais e preparo de amostras de fluido de epidídimo:

Dez reprodutores suínos saudáveis e sexualmente maduros (Large White, Duroc e Landrace), rotineiramente utilizados como dadores de sêmen para IA foram designados para o estudo. Os animais ficavam alojados em gaiolas de uma CIAS da

região do Vale do Taquari, Rio grande do Sul e foram alimentados com uma dieta específica para reprodutores suínos e de acordo com as diretrizes de exigência nutricional para machos adultos.

Os animais selecionados para o experimento foram cirurgicamente castrados e os epidídimos foram imediatamente dissecados para obtenção das amostras de fluidos correspondentes à região 9, correspondendo à cauda do referido órgão (DACHEUX et al., 2005). O fluido epididimário (com espermatozoides) foi coletado em tubos de 2 mL, sendo após centrifugados (800 x g por 10 min) para separação de células e fluido. O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado (12.000 x g durante 1 h a 4 ° C) para remover o restante dos espermatozoides e detritos celulares. O sobrenadante, composto de fluido epididimário límpido, foi armazenado a -80°C após a adição de inibidores de protease (Cocktail de Inibidor de Protease, Sigma, EUA). O teor total de proteína foi determinado pelo método BCA utilizando BSA como padrão (Pierce, EUA).

Foi realizado um pool de amostras de fluido epididimário (n = 10), as mesmas foram aliquotadas em quantidades iguais (300 µg de proteína total por amostra) e depois suspensas em tampão de digestão (ureia 8M, 100 mM tris-HCl pH 8,5). As proteínas foram reduzidas com tris-2-carboxietilfosfina 5 mM (TCEP) durante 20 min à TA seguido de alquilação com iodoacetamida 10 mM à TA no escuro durante 15 min. Após a adição de 1 mM CaCl₂ (concentração final), a digestão das proteínas foi realizada utilizando 2 µg de tripsina (Promega, Madison, WI) por incubação a 37 ° C durante 16 h. A proteólise foi parada por adição de ácido fórmico até uma concentração final de 5%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 20 min, e o sobrenadante foi armazenado a -80 ° C.

3.2.2 Análise proteômica por identificação multidimensional de proteínas (*Multidimensional Identification Technology – MudPIT*)

A análise proteômica das amostras pela técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT) foi realizada em parceria com o Yates Laboratory, San Diego/CA (EUA), gentilmente supervisionado pelos professores Dra. Lucélia Santi, Dr. Walter Orlando Beys e pelo Dr. John R. Yates III.

A digestão de proteínas foi carregada sob pressão para um capilar embalado de 250 μm . com 2,5 cm de permutador catiônico de Luna de 5 μm (SCX) (Whatman, EUA), seguido por um Aqua C18 (RP) (Phenomenex, EUA) de 2 cm com 3 μm de fase reversa de 1 μm de sílica. A coluna foi lavada com tampão contendo 95% de água, 5% de acetonitrilo e 0,1% de ácido fórmico. Após lavagem, um de capilar 100 μm . com uma ponta de 5 μm embalada com 11 cm de resina Aqua C18 de 3 μm (Phenomenex, EUA) foi ligado através de uma união. Colocou-se a coluna inteira em linha com uma HPLC quaternária Agilent 1100 e analisou-se utilizando uma separação modificada em 12 passos (WASHBURN et al., 2001; SANTI et al., 2014). As soluções tampão utilizadas foram 5% de acetonitrila / 0,1% (Tampão A), acetonitrila a 80% / ácido fórmico a 0,1% (Tampão B) e acetato de amônio 500 mM, acetonitrila a 5% e ácido fórmico a 0,1% (Tampão C). O Passo 1 consistiu num gradiente de 70 min de tampão B 0-100% (v / v). As etapas 2-10 tinham um perfil semelhante com as seguintes alterações: 3 min em tampão A a 100% (v / v), 3 min em X% (v / v) de tampão C, 4 min de gradiente de 0 a 10% (v / v) de tampão B e 101 min de gradiente de 10-100% (v / v) de tampão B. As percentagens de tampão C de 3 min (X) foram 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (v / v). Uma etapa adicional contendo 3 min em tampão A a 100% (v / v), 3 min em tampão C a 90% (v / v) e tampão B a 10% (v / v) e gradiente de 110 min de 10-100% V / v) tampão B foi realizada. Três repetições técnicas foram analisadas para o fluido da cauda de epidídimo.

Os peptídeos eluídos na coluna microcapilar foram diretamente injetados via *electrospray* em um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) com a aplicação de uma tensão de pulverização distal de 2,5 kV. Um ciclo consistiu em uma análise completa da gama de massas (MS) (400-2000 m / z, resolução de 60 000) seguida por cinco espectros MS / MS de dissociação induzida por colisão (CID) dependentes de dados no LTQ. A exclusão dinâmica foi ativada com uma contagem de repetição de 1, uma duração de repetição de 30s, um tamanho de lista de exclusão de 150 e uma duração de exclusão de 180s. A janela de massa para a seleção de íons precursores foi ajustada para 400-1600 - não atribuída – a carga 1 foi rejeitada e a energia de colisão normalizada para CID foi de 35. As funções de varrimento do espectrômetro de massa e os gradientes de solvente de HPLC foram

controlados através do sistema de dados XCalibur. Todos os espectros MS / MS foram analisados utilizando o seguinte protocolo de análise de software, tal como proposto por SANTI et al. (2014). Resumidamente, a identificação e quantificação de proteínas foram feitas com o Integrated Proteomics Pipeline (www.integratedproteomics.com/). Os espectros de massa em tandem foram extraídos em arquivos .ms2 de arquivos brutos usando RawExtract 1.9.9 (McDONALD et al., 2004) e foram pesquisados usando o algoritmo ProLuCID como descrito por Xu et al. (2006) contra a base de dados de sequência de referência de *Sus scrofa* de NCBI, acessada em Julho de 2015. A tolerância de pesquisa de massa peptídica foi ajustada para 3Da e a carboximetilação (+57.02146 Da) de cisteína foi considerada como uma modificação estatística. Os resultados de ProLuCID foram reunidos e filtrados utilizando o programa DTASelect (TADD et al., 2002) resultando num conjunto de dados com uma taxa de falsa descoberta de 1% para a proteína.

3.2.3 Análise de bioinformática

A análise de MudPIT gerou uma tabela de dados brutos com as proteínas identificadas e seus respectivos “*Acession Numbers*”, o número de acesso para busca de dados referentes à esta proteína no banco de dados do NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*). Entre estes dados, a tradução em formato FASTA foi utilizada para que posteriores análises de bioinformática fossem feitas.

A ferramenta Blast2GO 3.3 (CONESA et al., 2005) foi utilizada para categorizar as proteínas detectadas pela anotação de *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al., 2000) de acordo com o processo biológico e a função molecular. Além disso, as vias metabólicas foram avaliadas usando o módulo de mapas da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) de Quioto. Outras ferramentas de bioinformática foram utilizadas para determinar a localização subcelular (TargetP 1.0 cutoff> 0,9) (EMMANUELSON et al., 2000) e para prever a topologia de proteínas transmembranas com um modelo de Markov oculto (TMHMM 2.0, KROGH et al., 2001). SignalP 4.1 foi usado para a predição de proteínas segregadas (usinf cutoff default)

(PETERSEN et al., 2011). Os programas TargetP, TMHMM e SignalP estão disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services>.

3.3 Experimento 2 – Variação sazonal de enzimas antioxidantes do sêmen e parâmetros seminais de suínos

3.3.1 Local, animais e ejaculados:

As amostras foram coletadas em uma CIAs comercial da região do Vale do Taquari, no Rio Grande do Sul. Os animais ficavam alojados em galpões de gaiolas com controle de temperatura a 18°C pelo sistema de ventilação forçada. O manejo com os animais seguia as normas de bem estar animal. As datas de coleta de amostras dos animais estão descritas na tabela 2 e as variações meteorológicas do período de coleta de amostras estão descritas na tabela 3.

Tabela 2 - Datas de realização das coletas de amostras de sêmen.

Primavera		Verão		Outono		Inverno	
Coleta A	Coleta B	Coleta A	Coleta B	Coleta A	Coleta B	Coleta A	Coleta B
23/11/15	7/12/15	22/02/16	29/02/16	25/05/16	16/06/16	18/07/16	26/07/16

Tabela 3 - Dados de temperatura da região do Vale do Taquari no período de Setembro de 2015 a Agosto de 2016.

Ano	Mês	Temperatura (°C)			Estação do Ano
		Média	Máxima	Mínima	
2015	Set	17,8	30	4,5	Primavera (22/09/2015-21/12/2016)
	Out	19,4	35	9	
	Nov	21,4	32,4	12,5	
	Dez	24,2	35,6	14,5	
2016	Jan	26,3	38,7	18,7	Verão (21/12/2016-20/03/2016)
	Fev	26,2	36,4	17,2	
	Mar	22,8	36,4	16,9	Outono (20/03/2016-20/06/2016)
	Abr	22,5	36,9	6,3	
	Mai	15,2	24,8	5,9	
	Jun	12,3	23,1	1,6	
	Jul	14,8	28,5	3,6	Inverno 21/06/2016-22/09/16
	Ago	17,8	33,7	5,3	

Fonte: Centro de Informações Hidrometeorológicas Univates.

Os animais que participaram do estudo eram submetidos à suplementação vitamínica intramuscular de 2mL de VitADE® a cada 30 dias, além de arraçoamento específico para reprodutores suínos. A ração fornecida aos animais, composta em base de farelo de soja e milho, além de premix de vitaminas e minerais específico para reprodutores suínos. A ração ainda era acrescida de adsorventes visando o controle de possíveis micotoxinas em sua composição.

Inicialmente, 15 animais constituíam o grupo de amostragem. No entanto, ao longo do ano, os animais foram sendo descartados do experimento por diferentes razões, sendo as mais frequentes a renovação genética do plantel e morte; sendo assim, ao final do experimento, restaram 9 animais para avaliação. Estes animais tiveram o sêmen avaliado durante as 4 estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) para diferentes parâmetros de qualidade seminal, com duas coletas avaliadas em cada estação do ano, totalizando 72 coletas.

3.3.2 Coleta de amostra e refrigeração

Todas as amostras coletadas eram trazidas para o laboratório de Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, onde eram imediatamente processadas para posterior análise. Durante este processamento, o fluido epididimário era separado das células espermáticas conforme a tabela 4.

Tabela 4 - Protocolo utilizado para preparação das amostras de células espermáticas e plasma seminal.

ALÍQUOTA DE SÊMEN PURO	
Centrifugação a 800g por 10 minutos a 4°C	
CÉLULAS ESPERMÁTICAS	PLASMA SEMINAL
Adição de 1000 µL de PBS	Centrifugação a 12000g por 1h a 4°C
Centrifugação a 800g por 10 min	Retirada do plasma seminal
	Descarte de resíduos celulares
	Adição de inibidor de protease
Adição de 1000 µL de PBS	Acondicionamento a -80°C
Centrifugação a 800g por 10 min	
Adição de 1000 µL de PBS	
Centrifugação a 800g por 10 min	
Descarte de todo sobrenadante	
Adição de inibidor de protease	
Acondicionamento a -80°C	

3.3.3 Parâmetros seminais

Os parâmetros de qualidade seminal avaliados estão descritos na tabela 5, conforme a rotina da CIAS onde o experimento foi realizado.

Tabela 5 - Parâmetros de qualidade seminal avaliados durante o estudo.

0h	120h
Motilidade total (%)	Motilidade total (%)
Motilidade Rápida (%)	Motilidade Progressiva (%)
Volume (mL)	Motilidade Rápida (%)
Concentração (10 ⁶ /mL)	Motilidade Lenta (%)
Morfologia	Motilidade Local (%)
Enzimas Antioxidantes	Imóveis (%)

Entende-se por 0h o momento da coleta do ejaculado e 120h o momento de avaliação 5 dias após a diluição do ejaculado, ou seja, avaliação de parâmetros pós estocagem. Estas amostras avaliadas nas 120h eram armazenadas em conservadores de

sêmen com temperatura de 17°C e no momento da avaliação eram previamente aquecidos por 15 minutos a 36°C.

A fim de reduzir a subjetividade, sistemas automáticos de análise seminal foram utilizados para avaliar os dados de motilidade das amostras, conhecido como sistema CASA (*computer-assisted sperm analysis*), esse sistema é altamente confiável e permite eliminar a avaliação empírica feita em microscópio de contraste de fase (AMANN E KATZ, 2004).

3.3.4 Análises enzimáticas

3.3.4.1 Superóxido Dismutase

A atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) foi determinada segundo o método descrito por Marklund em 1985 e padronizado para plasma seminal por Bustamante-Filho et al (2009). Resumidamente, o método baseia-se na capacidade de autooxidação do pirogalol, processo este altamente dependente de $O_2^{\cdot-}$. A inibição da autooxidação deste composto se dá quando na presença de SOD, cuja atividade é medida em 420nm utilizando-se o equipamento SpectraMax® I3 Multi-Mode Microplate Detection Platform.

3.3.4.2 Glutathione Peroxidase

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi medida de acordo com a metodologia descrita por Wendel (1961) adaptada para plasma seminal por Bustamante-Filho et al. (2009). O substrato desta reação é o *tert*-butil-hidroperóxido. A degradação do NADPH da amostra é monitorado em 340nm utilizando-se o equipamento SpectraMax® I3 Multi-Mode Microplate Detection Platform. Uma unidade de GPx é definida como um μ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é representada como unidades/mg de proteína.

3.3.5 Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram testados para normalidade pelo teste de Shpiro-Wilk. Resultados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em triplicata e a mediana foi utilizada para os cálculos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de teste Bonferroni para comparação entre médias, quando aplicável. As diferenças entre as estações foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. A análise de correlação de Pearson foi utilizada para identificar a associação entre as atividades enzimáticas e os parâmetros seminais avaliados. Os cálculos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1 - Proteômica do fluido epididimário de suínos

Este trabalho utilizou uma abordagem de identificação multidimensional de proteínas para identificar e quantificar o teor de proteína do fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos. Um total de 663 proteínas foram identificadas, em um total de três replicatas técnicas de MudPIT. Com base na contagem espectral, proteínas com maior abundância (>100) contabilizaram 6,3% (42) de todas as proteínas encontradas no fluido da cauda do epidídimo. Por outro lado, 75,4% (500) de todas as proteínas identificadas tinham uma contagem espectral abaixo de 10, demonstrando a elevada complexidade do conteúdo da cauda do epidídimo luminal (Figura 7A), com um número significativo de proteínas encontrado pela primeira vez no epidídimo suíno.

Epididimal specific lipocalin-5 e *beta-hexosaminidase precursor subunit beta* são as proteínas mais abundantes encontradas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos. Com 1465 e 1346 contagens espectrais respectivamente, ambas têm 3 vezes mais contagens espectrais do que a terceira mais abundante, a proteína de ligação *fosfatidiletanolamin 4 precursor*. As proteínas com as contagens espectrais mais elevadas são descritas na Tabela 6. Os resultados das três repetições foram analisados (Figura 7). De todas as proteínas encontradas, 247 proteínas foram identificadas em todas as três corridas, 176 proteínas foram identificadas em 2 corridas e 240 proteínas foram detectadas em apenas uma corrida. O número total de proteínas identificadas por corrida foi 506, 445 e 382 para corridas 1, 2 e 3, respectivamente, dados ilustrados na figura 4 B.

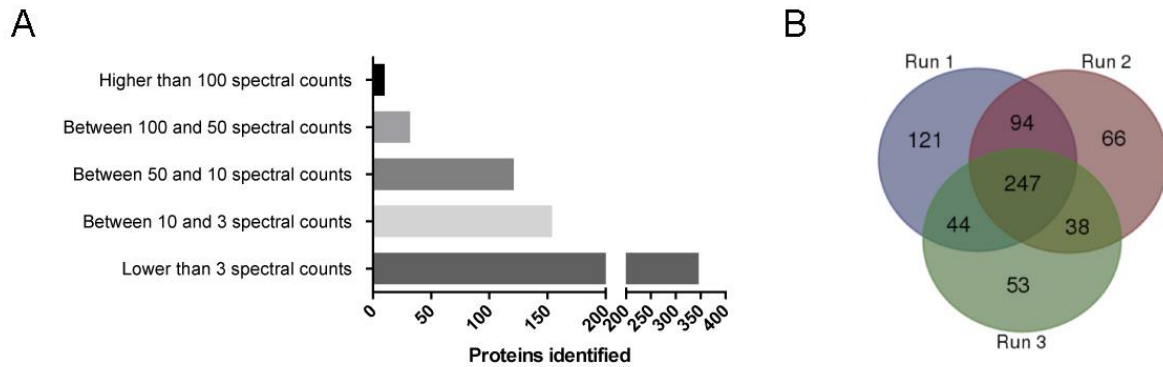


Figura 7 - Proteínas identificadas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos. (A) Distribuição das proteínas baseado em suas contagens espectrais. (B) Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificada em cada replicata da técnica de MudPIT.

A análise da ontologia gênica (*gene ontology*, GO) realizada com o software Blast2GO mostrou que as proteínas encontradas no fluido da cauda do epidídimo suíno estão associadas com numerosos processos biológicos, tais como metabolismo celular, regulação biológica, reprodução e processo de desenvolvimento celular. Várias funções moleculares foram descritas para as proteínas identificadas, envolvendo principalmente a ligação a diferentes moléculas como as proteínas, os íons, compostos cíclicos orgânicos e complexos macromoleculares. Funções específicas, tais como atividades de hidrolases e transferases e reguladores de enzimas também são descritos. As distribuições de GO estão apresentadas na figura 9.

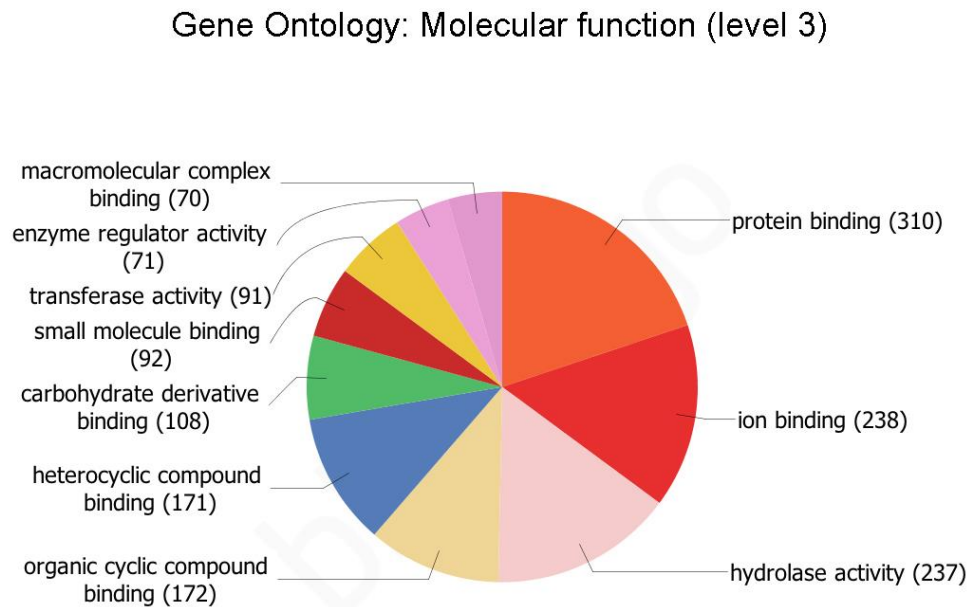
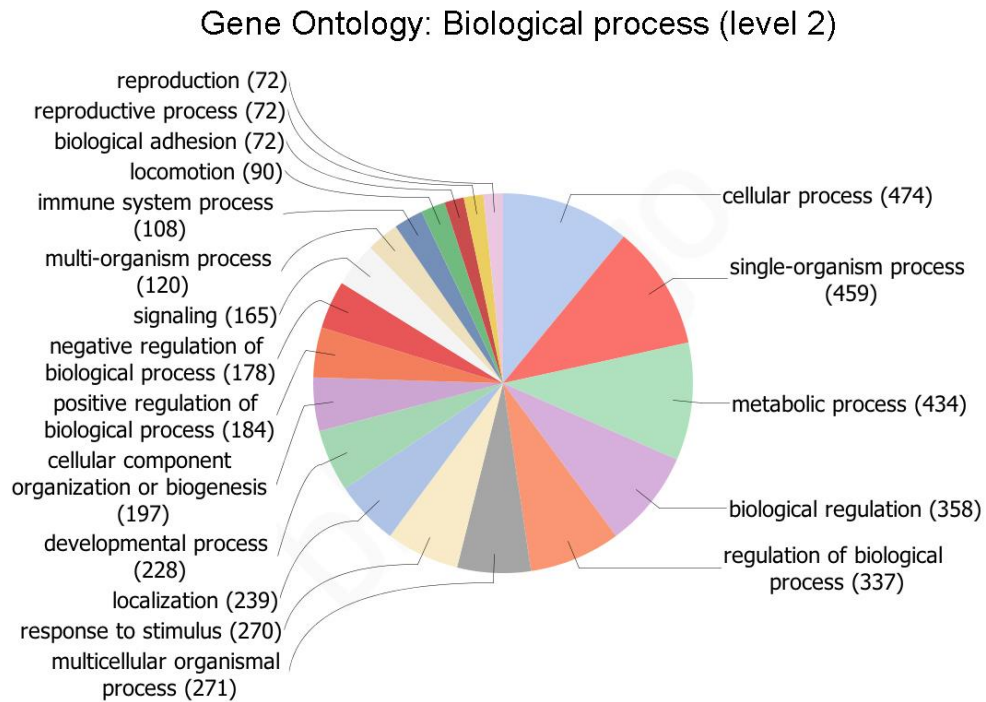


Figura 8 - Análise da ontologia gênica das proteínas identificadas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos.

A análise KEGG foi utilizada para categorizar em que vias as proteínas identificadas no fluido da cauda do epidídimo suíno estão envolvidos. Trinta e três caminhos diferentes foram associados com estas proteínas, sendo que as seguintes vias e enzimas apresentaram maiores valores: metabolismo da glutatona (9 proteínas, 6 enzimas), degradação de glicosaminoglicanos (6 proteínas, 5 enzimas), metabolismo do ácido araquidônico (5 proteínas, 2 enzimas), outra degradação de glicanos (5 proteínas, enzimas 4) e glicólise / gliconeogênese (4 proteínas, enzimas 4). Estas vias estão diretamente relacionadas com a proteção do espermatozoide, composição da membrana plasmática e controle do metabolismo, tarefas essenciais para a preservação destas células antes do momento da ejaculação. Mais especificamente, pode-se observar a presença destas proteínas e suas isoformas na tabela 7.

É interessante ressaltar que na tabela 8 é possível observar, além da grande quantidade de isoformas da mesma proteína, o grande número de proteínas com o mesmo peso molecular, ou com pesos muito similares. Da mesma forma, proteínas de baixo peso molecular também puderam ser detectadas através da técnica de MudPIT. Estas observações mais uma vez sugerem o elevado grau de detecção desta técnica e a colocam em posição de destaque nos estudos da proteômica de diferentes tecidos, além da complexidade do ambiente epididimário em que as células espermáticas estão inseridas.

Além disso, uma relação das enzimas mais abundantes a partir das suas contagens espectrais foi realizada. O resultado pode ser observado na tabela 6. Nesta tabela, além do número de acesso no banco de dados do NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) pode-se observar o tamanho de cada proteína (kDA), seu signalP e seu targetP. O signalP de uma proteína indica uma predição do local de clivagem, ou seja, a presença ou não de um peptídeo sinal que indica o local de clivagem para esta proteína. Já o targetP indica a presença de proteínas transmembrana. Pode-se observar a indicação de vias de secreção no targetP de todas as proteínas descritas, uma vez que todas se encontram no plasma seminal. Outra informação interessante mostrada na tabela é a ontologia gênica associada às proteínas encontradas, ou seja, termos associados à proteína encontrados em rotas que foram descritas para as mesmas.

Tabela 6 – Dez proteínas mais abundantes identificadas no fluido da cauda do epidídimo de suíno por MudPIT.

NCBI Accession number	Spectral Counts	Protein ID [<i>Sus scrofa</i>]	Length (kDa)	SignalP	TargetP (RC)*
XP_003122377.1	1465	<i>Epididymal-specific lipocalin-5</i>	181	Yes	Secretory pathway (1)
		GO: Lipid metabolic process; small molecule binding; response to hormone; extracellular region; transport.			
NP_999086.1	1346	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta precursor</i>	531	No	-
		GO: Male courtship behavior; oligosaccharide catabolic process; beta-N-acetylhexosaminidase activity; penetration of zona pellucida; phospholipid biosynthetic process; cellular protein metabolic process; oogenesis; membrane.			
NP_001156360.1	367	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 precursor</i>	222	Yes	Secretory pathway (1)
		GO: Extracellular exosome; protein binding.			
NP_999527.1	226	<i>Lactotransferrin precursor</i>	686	Yes	Secretory pathway (1)
		GO: Iron ion homeostasis; positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; ion transport; iron ion binding; protein serine/threonine kinase activator activity; negative regulation of ATPase activity; positive regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway; serine-type endopeptidase activity; protein complex; negative regulation of apoptotic process; proteolysis;; positive regulation of protein serine/threonine kinase activity; negative regulation of lipopolysaccharide-mediated signaling pathway.			
XP_003483854.1	134	<i>Brain acid soluble protein 1 isoform 2</i>	228	No	-
		GO: Cytoplasm; transcription corepressor activity; nuclear speck; transcription regulatory region DNA binding; plasma membrane.			
XP_003356466.3	115	<i>Di-N-acetylchitobiase, partial</i>	235	Yes	Secretory pathway (2)
		GO: Chitinase activity; carbohydrate metabolic process; extracellular space; extracellular exosome; chitin catabolic process.			
NP_999014.1	114	<i>Epididymis-specific alpha-mannosidase precursor</i>	1006	Yes	Secretory pathway (3)
		GO: Protein deglycosylation; alpha-mannosidase activity; zinc ion binding; extracellular exosome; mannose metabolic process; carbohydrate binding.			
NP_999051.1	112	<i>Epididymal secretory glutathione peroxidase precursor</i>	219	Yes	Secretory pathway (1)
		GO: Extracellular space; glutathione peroxidase activity; sperm plasma membrane; cellular oxidant detoxification; cellular response to oxidative stress; oxidation-reduction process.			
XP_003353965.2	103	<i>Reticulocalbin-1 isoform 2</i>	406	No	-
		GO: In utero embryonic development; calcium ion binding; endoplasmic reticulum.			

XP_005658515.1	101	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	637	No	-
GO: Membrane; extracellular membrane-bounded organelle; response to organic cyclic compound; dephosphorylation; alkaline phosphatase activity.					

* RC: Reliability class, from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction. The 5 reliability classes, defined as follows: 1 : diff > 0.800; 2 : 0.800

> diff > 0.600; 3 : 0.600 > diff > 0.400; 4 : 0.400 > diff > 0.200; 5 : 0.200 > diff

Tabela 7 – Diferentes rotas metabólicas envolvendo algumas das proteínas detectadas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos através da técnica e MudPIT.

Metabolic Pathway	NCBI Accession number	Spectral Counts	Protein ID [<i>Sus scrofa</i>]	Length (kDa)
Pyruvate Metabolism	NP_999039.1	2	malate dehydrogenase, cytoplasmic	334
	XP_005658591.2	2	malate cytoplasmic	334
	XP_005662575.1	2	malate dehydrogenase, cytoplasmic-like	167
	XP_003484293.1	2	malate dehydrogenase, cytoplasmic-like isoform X1	289
	NP_001230517.1	1	fumarate hydratase	512
	XP_005661147.1	2	L-lactate dehydrogenase A chain isoform X1	361
	NP_001165834.1	2	L-lactate dehydrogenase A chain	332
	NP_001106758.1	5	L-lactate dehydrogenase B chain	334
	XP_005655720.1	5	L-lactate dehydrogenase B chain-like, partial	310
	XP_005666235.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X4	1138
	XP_005666240.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X9	616
	XP_005666246.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X15	531
	XP_005666234.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X3	1138
	XP_005666241.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X10	603
	XP_005666236.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X5	1138
	XP_005666243.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X12	582
	XP_005666238.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X7	1117
	XP_005666237.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X6	1118
	XP_001929104.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X1	531
	XP_005666233.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X2	1138
	XP_005666245.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X14	531
	XP_005666239.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X8	732
	XP_005666244.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X13	531
	XP_005666242.1	2	poly [ADP-ribose] polymerase 6 isoform X11	596
Cysteine and methionine metabolism	NP_999039.1	2	malate dehydrogenase, cytoplasmic	334

	XP_005658591.2	2	malate cytoplasmic	334
	XP_005662575.1	2	malate dehydrogenase, cytoplasmic-like	167
	XP_003484293.1	2	malate dehydrogenase, cytoplasmic-like isoform X1	289
	XP_005655046.1	8	glutaredoxin-1 isoform X1	106
	NP_999398.1	8	glutaredoxin-1	106
	XP_003132759.1	7	glutaredoxin-1-like	106
	NP_999092.1	4	aspartate aminotransferase, cytoplasmic	413
	XP_005661147.1	2	L-lactate dehydrogenase A chain isoform X1	361
	NP_001165834.1	2	L-lactate dehydrogenase A chain	332
	NP_001106758.1	5	L-lactate dehydrogenase B chain [Sus scrofa]	334
	XP_005655720.1	5	L-lactate dehydrogenase B chain-like, partial	310
	XP_001924694.5	1	angiotensinogen	223
Galactose Metabolism	XP_005658086.1	2	phosphoglucomutase-2-like	
	XP_003128958.1	2	phosphoglucomutase-2	
	XP_005668651.1	2	lysosomal alpha-glucosidase isoform X2	
	XP_003482990.1	2	lysosomal alpha-glucosidase isoform X1	
	XP_001928410.1	2	galactosidase, beta 1-like	
	XP_003130139.3	7	galactosidase, beta 1-like 3 isoform X1	
	XP_005667580.1	7	galactosidase, beta 1-like 3 isoform X2	
	XP_005667581.1	3	galactosidase, beta 1-like 2 isoform X2	
	XP_003130137.1	3	galactosidase, beta 1-like 2 isoform X1	
	NP_001001539.1	2	aldose reductase	
Glycolysis/gluconeogenesis	XP_005652645.1	2	triosephosphate isomerase isoform X1	368
	NP_999495.1	6	glucose-6-phosphate isomerase	558
	XP_003483583.1	2	phosphoglycerate mutase 1	254
	NP_001128440.1	16	phosphoglycerate mutase 2	253
	XP_005658086.1	2	phosphoglucomutase-2-like	472
	XP_003128958.1	2	phosphoglucomutase-2	624
	XP_003483583.1	2	phosphoglycerate mutase 1	254
	NP_001128440.1	16	phosphoglycerate mutase 2	253
	NP_001193288.1	2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	333
	XP_005665031.2	2	alpha-enolase isoform x1	434
	XP_005652652.1	4	gamma-enolase	434
	NP_001037992.1	1	beta-enolase isoform X1	434
	XP_005669213.1	4	beta-enolase isoform X4	434
	XP_005669210.1	4	beta-enolase isoform X1	440
	XP_005669211.1	4	beta-enolase isoform X2	434
	XP_005669212.1	4	beta-enolase isoform X3	434

XP_005665032.1

13

alpha-enolase isoform X2

354

4.2 Experimento 2 - Variação sazonal de enzimas antioxidantes do sêmen e parâmetros seminais de suínos

As variações nos parâmetros de qualidade seminal observadas ao longo do período de quatro estações no grupo de animais selecionado para teste estão descritas na tabela 8. Os parâmetros seminais avaliados apresentaram-se constantes durante todo o ano, sendo observada diferença entre estações apenas na concentração espermática e motilidade rápida após 5 dias de refrigeração a 17°C.

Tabela 8: Parâmetros de qualidade seminal avaliados durante as quatro estações do ano e em diferentes tempos de avaliação. 0h corresponde ao momento da coleta e 120h corresponde a cinco dias de armazenamento.

Parâmetros de Qualidade Seminal	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Parâmetros 0h				
Motilidade total (%)	91,53 ± 6,96	92,08 ± 5,74	94,25 ± 2,34	92,06 ± 5,99
Motilidade Rápida (%)	69,68 ± 17,5	74,65 ± 17,68	70,98 ± 14,03	73,05 ± 15,56
Volume	297,5 ± 91,63	317,22 ± 86,46	292,61 ± 77,78	289,06 ± 66,51
Concentração (10⁶/ml)	222,60 ± 81,82 ^b	204,19 ± 64,90 ^b	311,94 ± 138,64 ^a	262,45 ± 91,44 ^{ab}
Morfologia Total (%)	2,39 ± 3,63	4,17 ± 7,92	5,78 ± 13,84	3,56 ± 7,17
Acrossoma	0,06 ± 0,24	0,28 ± 0,75	0,22 ± 0,73	0,11 ± 0,32
Cabeça	0,50 ± 0,79	0,78 ± 1,40	0,83 ± 1,15	0,67 ± 0,91
Peça Intermediária	0,17 ± 0,71	0,17 ± 0,51	0,00	0,00
Colo	0,28 ± 0,67	0,28 ± 0,83	0,61 ± 1,88	0,00
Gota Proximal	0,06 ± 0,24	0,94 ± 1,98	0,29 ± 0,85	0,56 ± 1,89
Gota Distal	0,61 ± 0,98	1,11 ± 2,00	2,17 ± 6,11	1,11 ± 1,81
Cauda Enrolada	0,56 ± 1,10	0,06 ± 0,24	0,11 ± 0,47	0,17 ± 0,71
Cauda Dobrada	0,17 ± 0,51	0,33 ± 0,84	1,65 ± 4,62	0,89 ± 2,61
Formas Teratológicas	0,00	0,22 ± 0,94	0,00	0,06 ± 0,24
Parâmetros 120h				
Motilidade total (%)	74,98 ± 10,64	86,12 ± 6,41	83,90 ± 10,90	76,01 ± 28,13
Motilidade Progressiva (%)	68,31 ± 12,08	82,71 ± 6,83	67,11 ± 22,32	71,54 ± 27,83
Motilidade Rápida (%)	35,46 ± 16,24 ^{ab}	44,05 ± 17,30 ^a	26,51 ± 13,45 ^b	31,89 ± 19,41 ^{ab}
Motilidade Lenta (%)	32,85 ± 10,98	15,36	40,60 ± 15,64	39,65 ± 23,88
Motilidade Local (%)	6,67 ± 2,89	3,27 ± 1,95	4,87 ± 2,95	4,47 ± 3,34
Imóveis (%)	25,02 ± 10,64	13,88 ± 6,41	28,03 ± 22,57	23,99 ± 28,13

a, b e ab indicam diferença estatística significativa (P<0,05).

De forma semelhante, as defesas antioxidantes não apresentaram grandes variações ao longo do ano. As defesas antioxidantes do plasma seminal, medidas através das atividades de GPx e SOD se mantiveram

constantes durante o ano. A avaliação destas enzimas nos espermatozoides evidenciou um aumento de atividade de SOD no verão e primavera ($P < 0,05$), conforme figura 9.

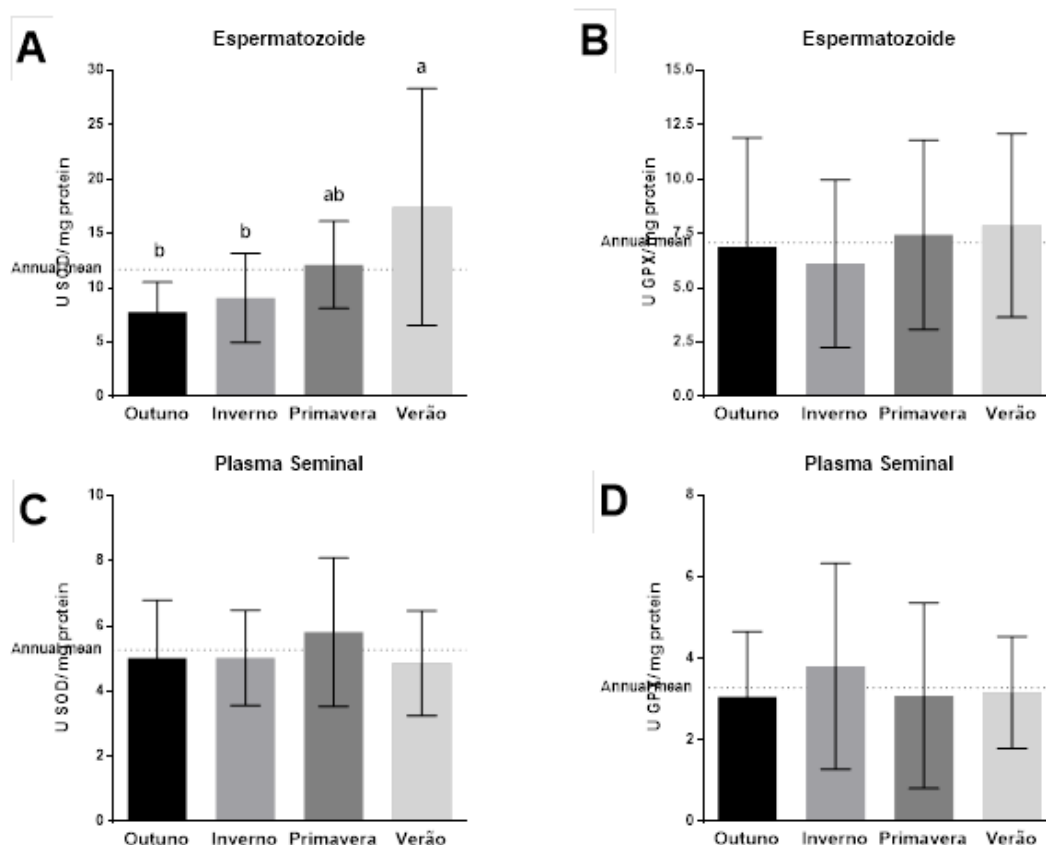


Figura 9 - Atividades de SOD (A e C) e GPx (B e D) em espermatozoide (A e B) e plasma seminal (C e D) suíno coletado nas diferentes estações do ano. Valores expressos em média e desvio padrão. A linha pontilhada indica a média anual da atividade enzimática. As letras acima da barra indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

As atividades das enzimas GPx e SOD apresentaram apenas duas correlações com motilidade total após 5 dias de preservação a 17°C. A atividade de SOD nos espermatozoides apresentou correlação negativa fraca ($R^2 = 0,4517$; $P = 0,0022$). No plasma seminal, a GPx também apresentou correlação negativa ($R^2 = 0,2447$; $P = 0,0369$), como pode-se observar na figura 10.

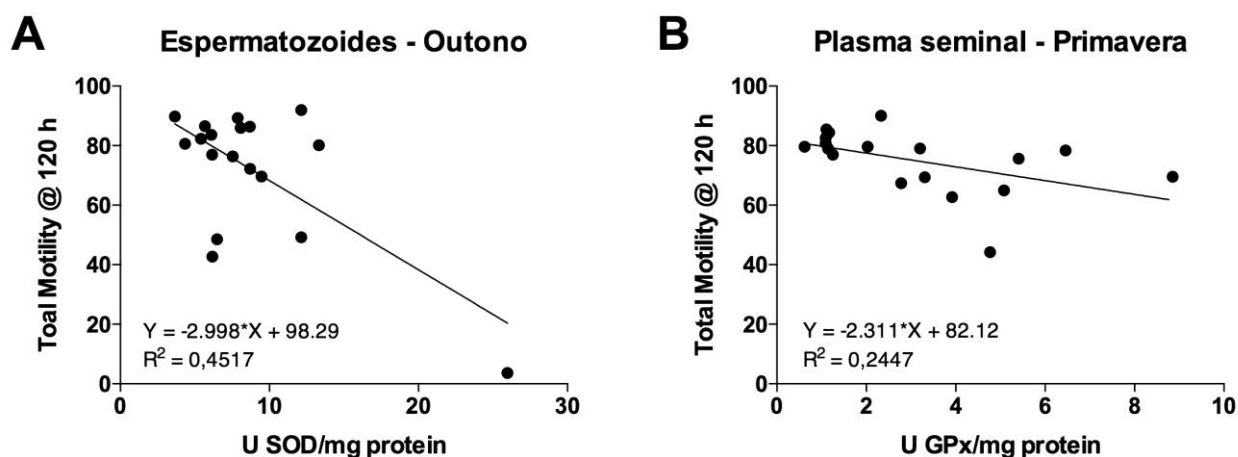


Figura 10: Análise de correlação das enzimas SOD e GPx e motilidade espermática total após 120 h de conservação a 17°C.

Ainda sobre as atividades de SOD e GPx, destaca-se o comportamento individual destas defesas antioxidantes animal por animal, conforme estabelecido na figura 11. Os gráficos A e B referem-se às defesas antioxidantes medidas na célula espermáticas e C e D referem-se ao plasma seminal.

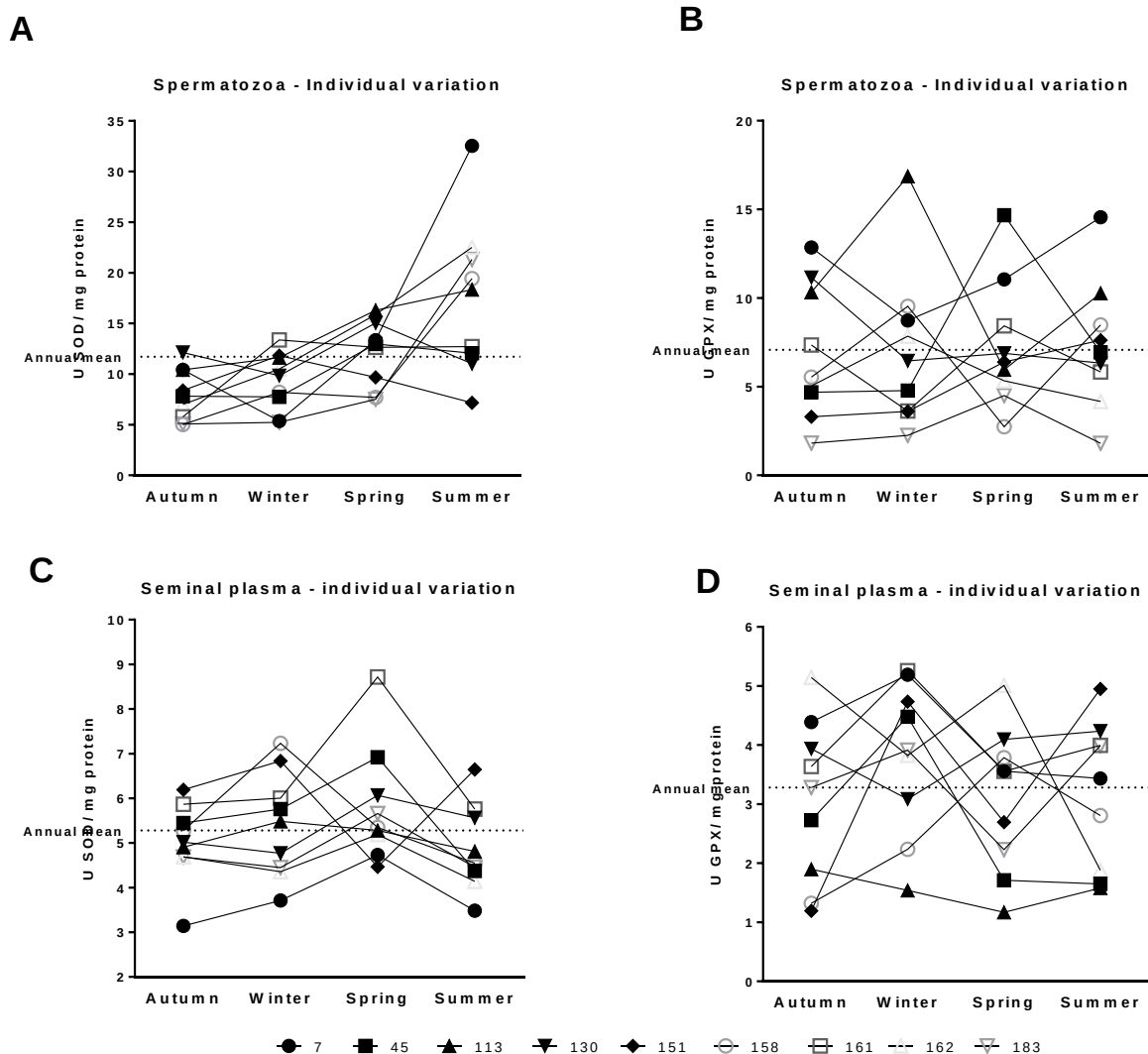


Figura 11 - Variação individual das defesas antioxidantes na célula espermática (A e B) e plasma seminal (C e D) dos animais observados durante o experimento nas diferentes estações do ano. Os pontos na linha indicam a média da estação para cada um dos 9 animais avaliados, identificados na parte inferior da figura.

5. DISCUSSÃO

5.1.1 Proteômica do fluido epididimário de suínos

O objetivo deste estudo foi expandir a compreensão da composição de proteínas do fluido da cauda do epidídimo nos reprodutores suínos usando a técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT). Esta região específica do epidídimo é responsável pelo armazenamento de espermatozoides já maduros, sendo assim um ambiente ótimo para a conservação destas células antes da ejaculação. A preservação eficaz dos espermatozoides está diretamente ligada com o sucesso da reprodução, tanto em animais quanto em humanos.

A utilização da técnica de MudPIT para estudar o proteoma do fluido da cauda do epidídimo de suínos identificou mais de 600 proteínas, um número notavelmente maior em comparação com ensaios anteriores usando técnicas à base de gel (SYNTIN et al., 1996). Assim, a composição de proteínas luminais mostrou ser muito mais complexa, devido a uma elevada proporção de proteínas de baixa abundância e baixo peso molecular. A técnica de identificação multidimensional de proteínas é uma estratégia em grande escala para a identificação de proteínas em misturas biológicas complexas e compreende a pré-digestão de proteínas intactas, seguido de separação de peptídeos, fragmentação em um espectrômetro de massa, e a pesquisa do banco de dados (CARVALHO et al., 2008). No presente trabalho, a estimativa da quantidade de proteína baseou-se em contagens espectrais, este tipo de medida em abundância para análise quantitativa de dados de proteômica têm se tornado cada vez mais popular nos últimos anos devido à sua relativa facilidade de utilização e aplicabilidade geral para uma ampla gama de estudos de proteômica (LUNDGREN et al., 2010). Além disso, o uso de estratégias de normalização como o PatternLab software melhora a quantificação semi-

relativa de proteína em dados de identificação multidimensional de proteínas (CARVALHO et al., 2008).

No fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos, 10 proteínas foram consideradas mais abundantes com base nas contagens espectrais, representando 6,3% do total de proteínas identificadas (superior a 100). Resultados anteriores demonstravam que cerca de 15 a 20 proteínas compunham mais de 60-80% da concentração de proteína total de fluido do epidídimo na maior parte dos animais. As proteínas mais comuns citadas até então eram a *lactoferrin*, *procathepsin D*, NCP2 (HE1, CTP, proteína de transferência de colesterol), GPx (glutathione peroxidase), *beta-N-acetylhexosaminidase*, *mannosidase*, *galactosidase*, PGDS (prostaglandin D2 sintase), *clusterin*, CRISP (*cysteine-rich secretory protein*) e e-RAPB (*epididymal acid-binding protein I*) (DACHEUX et al., 2009).

De acordo com Dacheux (2005), a porção proximal da cabeça do epidídimo é caracterizada pela síntese e secreção das proteínas glutathione peroxidase (GPX), hexosaminidase (HEX) e RNase-Train A (Train A), e a porção intermediária responsável por uma intensa secreção de clusterina, catepsina G, lactoferrina e NCP2 / CTP / HE1. A secreção de alfa-mannosidase, E-RABP e uma train E ainda não identificada caracterizam a porção distal da cabeça e corpo proximal. Apenas uma proteína é específica para o corpo distal, a train H (36-40 kDa), enquanto que apenas duas proteínas menores aparecem na cauda. No entanto, no presente estudo observou-se que o fluido epididimal caudal apresenta inúmeras proteínas, sendo que as dez mais abundantes foram as seguintes: *lipocalin-5*, *beta-hexosaminidase*, *phosphatidylethanolamine-binding protein 4*, *lactotransferrin precursor*, *brain acid soluble protein 1*, *di-N-acetylchitinase*, *epididymis-specific alpha-mannosidase precursor*, *epididymal secretory glutathione peroxidase precursor*, *reticulocalbin-1*. Na figura 12 é apresentado um esquema relacionando proteínas identificadas do fluido da cauda do epidídimo suíno e os papéis que desempenham na fisiologia espermática de acordo com a análise de ontologia gênica e revisão bibliográfica. Em virtude do elevado número de proteínas identificadas, serão discutidas as proteínas mais abundantes e suas funções correlatas à maturação epididimária e fertilidade.

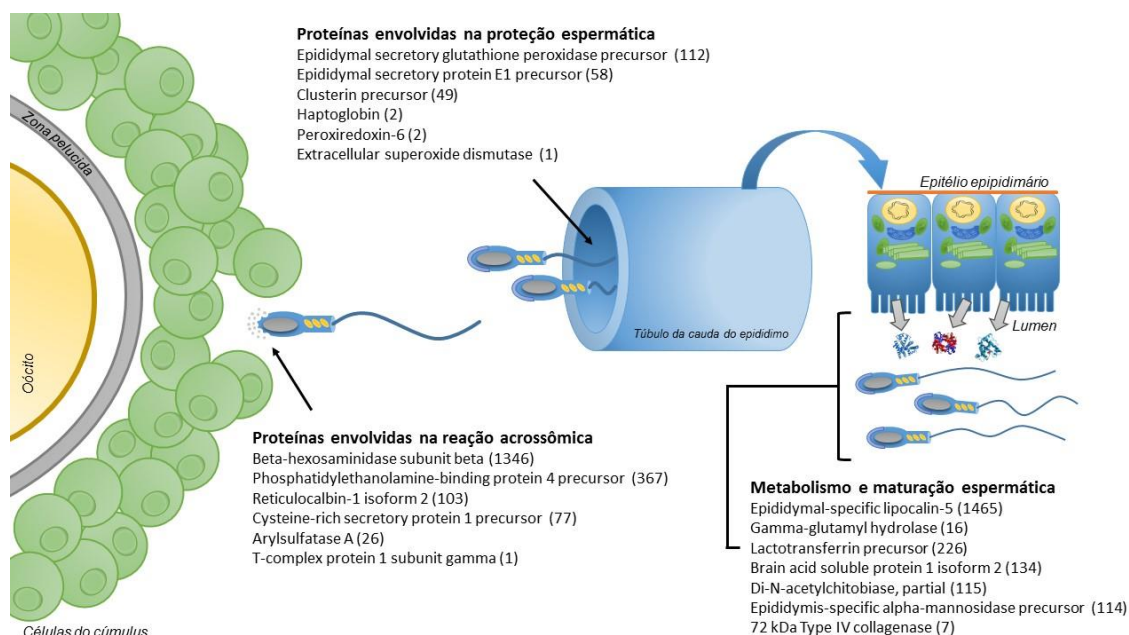


Figura 12 – Esquema representando proteínas do fluido da cauda do epidídimo suíno identificadas pela técnica de MudPIT. Estão representadas as algumas das proteínas envolvidas com a proteção espermática, modulação do metabolismo e maturação dos espermatozoides e regulação da reação acrossômica.

A *lipocalin*, vulgarmente chamada de proteína de ligação do ácido retinóico (ERAB-P), é uma importante proteína secretada no lúmen do epidídimo. Neste trabalho identificamos uma lipocalina específica, chamada de *epididymal-specific lipocalin-5* (LCN-5), que foi descrita anteriormente por Guyonnet e colaboradores (2009). Lipocalinas estão envolvidas no transporte ou armazenamento de compostos orgânicos hidrofóbicos e quimicamente sensíveis, especialmente lipídeos, vitaminas, esteroides e outros metabolitos secundários (SALIER et al., 2004). No epidídimo, outras lipocalinas têm sido descritas e estudos têm mostrado a sua expressão regional, mas seu papel individual e sua função no epidídimo ainda são incertos. Especificamente, a LCN5 foi descrita na cabeça do epidídimo (GUYONNET et al., 2009), no presente estudo, pudemos observar a sua presença no fluido caudal do epidídimo.

Vries e Colenbrander (1989) correlacionaram a presença de beta-hexosaminidases com gotas citoplasmáticas e sugeriram que o ácido alfa-glucosidase, alfa-manosidase e gama-galactosidase estão situados no

acrossoma enquanto que o ácido beta-hexosaminidase está localizado predominantemente na gota citoplasmática dos espermatozoides de reprodutores suínos. No entanto, um estudo de 2015, observou a partir de amostras de um grupo de dez machos suínos, a presença e atividade desta proteína em amostras de plasma seminal e espermatozoides (WY SOCKY et al., 2015). A isoforma predominante da B-hexosaminidase (HEX-B) é a forma B, que é encontrado em acrossomas e é liberada durante a reação acrossomal (WY SOCKY et al., 2015). No presente estudo, pudemos observar que a subunidade *B-hexosaminidase beta* foi encontrada como uma das mais representativas no fluido da cauda epidídimo também. Hipoteticamente, a HEX-B poderia permitir que os espermatozoides penetrassem no oócito através da remoção de células do mesmo ou mascarando resíduos de N-acetilglucosamina em glicoproteínas da zona pelúcida (MILLER et al., 1993). Provavelmente estas B-HEX venham associadas ao espermatozoide através do líquido epididimário.

Fosfatidiletanolaminas de associação e ligação (PEBPs) são encontradas em vários organismos, incluindo mamíferos, e têm múltiplas funções (SCHOENTHEN & JOLLES, 1995). Esta proteína é expressa em vários tecidos, incluindo os testículos (SEDDIQI et al., 1994; HICKOX et al., 2002). A PEBP-4 foi estudada em suínos e classificada como sPEBP-4, sendo que estes resultados sugerem que é secretada pelo epidídimo. A análise funcional desta proteína demonstrou neste mesmo estudo sua capacidade para estimular a motilidade do espermatozoide; no entanto, o mecanismo molecular que estimula a esta mobilidade não foi investigada (ANN et al., 2012). De acordo com os autores, eles especulam que sPEBP4 podem estar associadas a moléculas localizadas na superfície da membrana dos espermatozoides, e esta associação pode ativar e sinalizar caminhos que melhoram a motilidade do espermatozoide.

Glicosaminoglicanos, especialmente a heparina, desempenham um papel crucial na capacitação espermática, na reação acrossômica, e na penetração espermatozoide-ovócito, mediadas por proteínas de ligação à heparina (HBPS), que são os principais constituintes do plasma seminal já descritos em humanos. Entre estas HBPs, proteínas estruturais, tais como semenogelina I, semenogelina II e a fibronectina são abundantes no plasma

seminal e seu papel é aprisionar os espermatozoides em um gel, como forma de protegê-los de danos físicos. A mais abundante das HBPs é a lactoferrina, que parece ser o principal antígeno de superfície da membrana de espermatozoide e atua como um agente antimicrobiano e imunoprotetor para o espermatozoide no trato reprodutor feminino (KUMMAR et al., 2009). A lactotransferrina (80 kDa) ou lactoferrina é uma glicoproteína de superfície que reveste o espermatozoide e sua função primordial é agir como um antígeno com propriedades antimicrobianas. Ela também serve como um antioxidante à quelatos de ferro para impedir a peroxidação lipídica (HAMADA et al., 2013). Esta proteína geralmente se mostra aumentada em amostras que não apresentam estresse oxidativo (HAMADA et al., 2013). Um estudo recente envolvendo a observação da lactotransferrina isolada a partir das secreções *in vitro* de tecido de oviduto humano relatou que ela pode ser responsável por inibir a interação espermatozóide-oócito de um modo dose-dependente (ZUMOFFEN et al., 2013). Este estudo demonstrou também que as concentrações de lactotransferrina aumentaram durante os processos inflamatórios, o que pode indicar o seu papel em certas desordens reprodutivas que são de natureza inflamatória (ZUMOFFEN et al., 2013). A lactotransferrina foi detectado em vários fluidos biológicos de mamíferos (LÉVAY & VOLJOEN, 1995), incluindo leite, fluido amniótico, lágrimas e plasma seminal de várias espécies como o homem (THALER et al., 1990), cão (KIKUCHI et al., 2003), cachacos (PÉROLA & ROSER, 2008), rato (YU & CHEN, 1993), e garanhão (KIKUCHI et al., 2003). Embora ainda esteja em processo de determinação em elefantes, a síntese de lactotransferrina já havia sido relatada no epidídimo de camundongos (YU E CHEN, 1993), suínos (PÉROLA & ROSER, 2008), e garanhão (De FOUCHECOURT et al., 2000) e ainda na próstata e vesículas seminais de homem (WICHMANN et al., 1989).

As proteínas conhecidas como *brain acid soluble protein 1* (BASP1) foram recentemente caracterizadas como fatores pró-apoptóticos intracelulares que atuam na apoptose induzida pela glicose nas células tubulares proximais renais (SANCHEZ-NINO et al., 2010). A BASP1 é uma proteína de 23-kDa miristoilada originalmente isolada a partir de extratos de cérebro (MAEKAWA et al., 1993; IINO et al., 2004) que partilha 70% de homologia entre humanos e ratos (MOSEVITSKY et al., 1997). Estudos de cultura celular renal em

pacientes diabéticos humanos identificaram uma alta concentração de glicose como indutor da expressão da proteína e apoptose dependente de BASP1 (LI et al., 2010; OHSE et al., 2006). Outro grupo de pesquisadores coordenado por Sanchez-Niño realizou um estudo em 2015 que mostrou que a BASP1 é um mediador intracelular de morte celular tubular induzida por albumina. Além disso, a BASP1 foi recentemente caracterizada como um promotor de morte em células tubulares expostas a concentrações elevadas de glicose, mas não em casos de apoptose induzida por uma combinação de citocinas pró-inflamatórias (SANCHEZ-NINO et al., 2010). No presente estudo, foi possível observar pela primeira vez BASP1 no plasma seminal, o que foi uma surpresa biológica para o grupo quando consideramos estudos prévios sobre a mesma; no entanto, podemos inferir que esta proteína possa ter uma ligação com o metabolismo da glicólise, considerando estudos preliminares.

Outra proteína observada foi a *di-N-acetylchitobiase*; estudos sobre esta proteína são escassos, mas relatam que ela é uma glicosidase lisossomal. Seu papel na quebra ordenada de glicoproteínas ligadas à asparagina foi estabelecido por Kuranda e Aronson em 1986. No entanto, existe um grande conjunto de evidências que esta glicosidase é espécie-específica. A ideia de que a *di-N-acetylchitobiase* pode ser específica da espécie inicialmente baseou-se na estrutura variável de degradação intermediária que se acumula nos tecidos de seres humanos e animais, devido a doenças de armazenamento lisossomais herdadas ou em tratamentos experimentais de animais com inibidores da hidrolase lisossomal (ABRAHAM et al., 1983; TULSIANI, 1988). Nestes estudos, foram descritos como não possuidoras da *di-N-acetylchitobiase* as espécies: bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Por outro lado, cães, gatos, humanos, coelhos e ratos foram descritas como espécies que expressam esta proteína. Kuranda e Aronson estenderam a lista de espécies que expressam a *di-N-acetylchitobiase* em 1986 quando descreveram sua atividade em frangos.

Em 1995, um estudo cita *alpha-mannosidase* específica de epidídimo como sendo secretada pelo epidídimo de suínos e que sua atuação estaria envolvida com a maturação espermática. Segundo este estudo, a expressão desta proteína era específica para esta espécie animal e foi localizada em partes muito bem determinadas do epidídimo: cabeça e corpo do epidídimo

(OKAMURA et al., 1995). Esta proteína é segregada a partir de células epiteliais do epidídimo e, em seguida, liga-se ao segmento equatorial da cabeça do espermatozoide como um fragmento de 27 kDa. Durante a maturação no epidídimo, o fragmento migra na superfície do espermatozoide, localizando-se logo atrás do acrossoma e ao aro apical da cabeça de espermatozoide (OKAMURA et al., 1992). Nesta superfície do espermatozoide, a *alpha-mannosidase* atua como um receptor para oligossacarídeos localizados na zona pelúcida que possuam manose em sua composição (TULSIANI et al., 1993). Esta proteína já é bem descrita pela literatura e foi possível novamente sua observação neste estudo como uma proteína importante para a reprodução.

Várias proteínas foram descritas no fluido da cauda do epidídimo, em especial com funções de proteção, e algumas proteínas têm sido associadas às funções desempenhadas pela cauda do epidídimo, tais como glutathione peroxidase. A glutathione peroxidase (GPx), uma proteína independente de selênio e eliminadora de radicais livres segregada para o lúmen do epidídimo a partir da região da cabeça (DREVET, 2006; NOBLANC et al., 2011), associa-se à membrana plasmática do espermatozoide e acompanha estas células no seu trânsito epididimal e armazenamento no lúmen da cauda, protegendo as células contra os efeitos nocivos dos peróxidos (VILAGRAM et al., 2016; CHABORY et al., 2009; NOBLANC et al., 2011). Em suínos, a GPx em ejaculados foi descrita com positiva correlação com a taxa de parto (NOVAK et al., 2010). Já outro estudo sugere que esta proteína é enzimaticamente quiescente no fluido epididimal porcino; ele mostrou, através de um ensaio imuno-histoquímico, que esta proteína foi encontrada ligada à região de acrossoma do espermatozoide no epidídimo e posteriormente desaparece durante a reação acrossomal. Além disso, esta proteína retardou significativamente a reação de acrossoma induzida *in vitro*. As possibilidades de que a GPx protege a célula espermática da reação acrossômica prematura e mantém a sua capacidade de fertilização no epidídimo são as mais prováveis (OKAMURA et al., 2007). Um estudo realizado em 2016 mostrou a importância da GPx para a reprodução, comparando diferentes ejaculados e analisando alguns parâmetros de qualidade seminal. Nele, cachorros com altas concentrações de GPx no plasma seminal apresentaram maior motilidade

espermática de doses inseminantes após armazenamento, taxas de parto mais elevadas e tamanhos de leitegada maiores do que cachaaos com baixas concentrações de GPx no plasma seminal (BARRANCO et al., 2016). Este último estudo reforça a importância desta enzima oxidante para os processos de maturação de espermatozoides e, conseqüentemente, a reprodução como um todo. No estudo apresentado, a GPx observada foi a isoforma 5. Com um número de contagens espectrais de 112, foi a oitava proteína mais observada no plasma seminal dos suínos.

A *reticulocalbin-1* foi outra proteína observada neste estudo. Esta proteína vem sendo estudada e descrita como uma proteína da família CREC, que consiste em uma família de múltiplas proteínas (em torno de sete) que participam de vias secretoras de células de mamíferos, participando - reguladas pelo Ca^{2+} - de atividades patológicas celulares como transformações malignas, mediações de efeitos tóxicos e até mesmo participação na formação amiloide (STRYNADKA & JAMES, 1989). O Ca^{2+} desempenha alguns papéis fundamentais na célula como um mensageiro secundário, estando envolvido na regulação de muitos processos, tais como a exocitose, transdução de sinais, contração celular e expressão de genes. As proteínas envolvidas nos processos de regulação do Ca^{2+} no citosol geralmente são proteínas de alta afinidade com o Ca^{2+} , conhecidas como *Ca²⁺-binding proteins*. A primeira proteína descrita desta família foi a *reticulocalbin* em ratos (OZAWA & MURAMATSU, 1993), localizada estritamente no retículo endoplasmático. Atualmente já existem descritas outras proteínas desta família, como já mencionado; no entanto, é a primeira vez que a *reticulocalbin* é descrita no plasma seminal suíno. Por ser uma proteína descrita exclusivamente presente em retículos endoplasmáticos, ser encontrada no plasma seminal vai contra o que a literatura apresenta até então. Devido à sua quantidade expressiva, não se pode inferir que esteja presente por simples rompimentos celulares, mas sim possivelmente possui função ligada à atividade do cálcio na manutenção e capacitação espermática.

A composição proteica pode mudar ao longo do ducto epididimário e a concentração das proteínas também pode variar entre espécies. Dacheux e colaboradores (2009) dizem que a lactoferrina, a alfa-manosidase, a prostaglandina D2 sintase (PGDS) e a albumina estão presentes em

concentrações elevadas no garanhão, cachacos, carneiro e humano, respectivamente. De outra forma, GPx e PGDS estão ausentes em seres humanos e cachacos, respectivamente. Neste trabalho pudemos observar que existem no plasma seminal de cachacos as alfa-manosidades específicas de epidídimo, com 114 contagens espectrais. Outra observação importante deste trabalho é o elevado número de isoformas de proteínas. A catepsina L1, por exemplo, tem duas isoformas, X1 e X2. A maioria das proteínas do epidídimo é caracterizada pelas suas numerosas isoformas que resultam do seu elevado grau de glicosilação, de acordo com Dacheux (2009).

Quase todas as proteínas testiculares que adentram o epidídimo são absorvidas na primeira parte deste órgão. A composição das proteínas no lúmen do epidídimo está ligada principalmente à atividade secretora específica que caracteriza cada uma de suas regiões: cabeça, corpo e cauda. Então, proteínas encontradas no fluido epididimário são basicamente secretadas por este órgão. A atividade secretora do epidídimo se mostra em um nível elevado e apresenta, pelo menos, várias centenas de proteínas secretadas. No cachaco, em torno de 100 proteínas secretadas pelo epidídimo já haviam sido relatadas (SYNTHIN et al., 1996). Assim, a contribuição desta dissertação está na ampliação significativa no número de proteínas epididimárias identificadas, com a citação de 663 proteínas oriundas do fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos.

5.1.2 Variação sazonal de enzimas antioxidantes do sêmen e parâmetros seminais de suínos

No presente trabalho observamos que a sazonalidade teve pouca influência nos principais traços seminais associados à fertilidade, bem como nas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). De fato, uma maior atividade de SOD foi identificada durante a Primavera e o Verão, mas apenas nos espermatozoides. A associação entre o estresse oxidativo e a qualidade espermática tem sido amplamente investigada nas duas últimas décadas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2009; GARCIA et al., 2006; CABALLERO et al., 2012; FRASER et al., 2007; VADNAIS et al. Al., 2010) e é bem aceito que as espécies reativas de oxigênio

(EROs) provocam perdas na integridade de membrana das células espermáticas, danos ao DNA, inativação de proteínas e redução da função mitocondrial (De LAMIRANDE & GAGNON, 1992; GITHRIE et al., 2008; IULIIS et al., 2009; AITKEN et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está diretamente relacionado à infertilidade, especialmente nos homens (GHARAGOZOLOO & AITKEN, 2011). Estes estudos tentaram mitigar o dano causado pelas EROs nos espermatozoides utilizando diferentes abordagens, como a nutrição (NRC, 2012) e a suplementação farmacológica (GONZÁLEZ-CADAVID, 2010). Na reprodução de animais domésticos, essa associação também é verdadeira, mas a pressão de seleção em reprodutores pode tornar o problema do estresse oxidativo não tão pertinente como na andrologia humana. No entanto, para maximizar e manter uma produção constante de doses de inseminantes ao longo do ano, a compreensão de como a sazonalidade afeta a qualidade do sêmen é relevante para a indústria suína.

As centrais de inseminação artificial de suínos (CIAs) precisam prestar especial atenção à temperatura ambiente, porque é considerado o parâmetro ambiental mais importante que afeta a qualidade seminal, se mostrando um problema para a indústria de produção e suínos (FLOWERS, 2008). As temperaturas mais baixas não parecem afetar a qualidade seminal, enquanto altas temperaturas (acima de 29 ° C) não só diminuem a função testicular, mas também levam a uma queda de até 35% na concentração de espermatozoides, redução da motilidade espermática, induzem a distúrbios no processo de espermatogênese (SONDERMAN & LUEBBE, 2008; WOLF & SMITAL, 2009) e reduzem o número de células normais (JOSEPH et al., 2005). Além disso, há uma redução na esteroidogênese, causando baixos níveis de testosterona e diminuição da libido (HEMSWORTH & TILBROOK, 2007; HUANG et al., 2010). No entanto, o efeito adverso das altas temperaturas no comportamento sexual é geralmente apenas temporário (HEMSWORTH & TILBROOK, 2007). Além disso, as taxas de gestação e sobrevivência embrionária são drasticamente reduzidas em fêmeas inseminadas com sêmen de cachacos submetidos ao estresse térmico (TRUDEAU & SANFORD, 1986). Para garantir a boa qualidade do sêmen, as orientações gerais de alojamento para os animais na CIAs são de temperatura inferior a 22 ° C (HUANG et al., 2010). Neste

experimento, os animais foram alojados em um galpão com ventilação forçada, mantendo a temperatura interna a 18 ° C - a ventilação do galpão era mantida constantemente.

Os únicos parâmetros que diferiram entre as estações foram a concentração espermática e motilidade rápida após a preservação a 17 ° C por 120h. Os nove reprodutores utilizados neste estudo foram de um cruzamento industrial (75% de Pietrain e 25% de Duroc). Segundo Park e Yi (2002), a sazonalidade não possui efeito sobre a concentração de espermatozoides das raças Yorkshire e Duroc. Por outro lado, reprodutores Large White e Pietrain apresentaram picos de concentração espermática na primavera e valores mais baixos durante o outono e inverno (CIERESZKO et al., 2000). Algumas linhagens experimentam uma diminuição modesta na produção de espermatozoides durante os meses de verão, enquanto outras conseguem se recuperar mais rapidamente, indicando que um componente genético pode estar regendo o mecanismo homeostático de adaptação ao estresse de calor (FLOWERS, 2008). A qualidade do sêmen de reprodutores suínos pode diferir ao longo do ano - indicando significativas interações raça-sazonalidade - especialmente na produção de espermatozoides; raças do norte da Europa têm menor tolerância ao estresse térmico, quando comparadas às raças desenvolvidas ao longo do equador (SONDERMAN & LUEBBE, 2008). Ainda segundo Trudeau e Sanford (1986), em climas temperados, a diminuição da produção de espermatozoides durante os meses de verão ocorre concomitantemente com uma diminuição no tamanho testicular. Portanto, a exploração dessas linhas genéticas pode conseguir levar ao desenvolvimento de reprodutores tolerantes ao calor (FLOWERS, 2008).

Os efeitos da sazonalidade na motilidade espermática são controversos, uma vez que foram observadas diferenças entre as raças (BORG et al., 1993, PARK & YI., 2002, BORG et al., 1993). Na verdade, a única diferença observada neste trabalho foi um maior valor de motilidade rápida no sêmen arefrigerado durante o no verão. Trudeau e Sanford (1986) relataram que, apesar da aparente falta de efeito sazonal na motilidade espermática, o tipo de movimento celular varia consideravelmente ao longo do ano. Esta variabilidade tem sido atribuída a alterações qualitativas no metabolismo celular ou atividade flagelar. Os efeitos da sazonalidade sobre a motilidade dos espermatozoides

são controversos. Alguns autores relatam que a motilidade dos espermatozoides não é alterada durante as diferentes estações do ano quando se estuda as raças Duroc (BORG et al, 1993; PARK & YI, 2002), e Yorkshire (PARK & YI, 2002). Já em raças como a Meishan, observa-se menor motilidade espermática no outono do que nas outras estações do ano (BORG et al., 1993).

É plausível considerar que a pequena variação anual da atividade antioxidante no sêmen nos animais estudados está associada com a consistência na qualidade seminal. A SOD nos espermatozoides apresentou diferentes atividades médias entre as estações, mas não no plasma seminal. Kowalowka e colaboradores (2008) mostraram que a SOD participa como o agente antioxidante mais ativo do plasma seminal de suínos e que seus níveis variam ao longo das estações, sendo mais acentuados nos períodos de primavera e outono. No entanto, estudos sobre a capacitação espermática, a adição de enzimas SOD ao meio de conservação espermática pode bloquear este processo (O'FLAHERTY et al., 1999), sugerindo que o excesso desta enzima pode ser prejudicial. A SOD apresentou correlação negativa ($R^2 = 0,4517$; $P = 0.0022$) com a motilidade total aos 5 dias de estocagem, ou seja, animais que possuíam maiores valores de SOD apresentam valores de motilidade menores aos 5 dias de estocagem; esta correlação pode ser explicada pelo mecanismo que a SOD atua na capacitação espermática, onde a presença desta enzima é parte fundamental do mecanismo. A adição de SOD ao meio de conservação espermática pode bloquear o processo de capacitação (O'FLAHERTY, et al., 1999), uma vez que a produção do radical superóxido é um dos primeiros eventos deste mecanismo (BALDI et al., 2002; De LARAMIDE & O'FLAHERTY, 2008).

A GPx no plasma seminal foi previamente correlacionada com altas taxas de parição (NOVAK et al., 2010), entretanto, recentemente, um papel importante desta enzima na criopreservação do sêmen suíno foi descartado por Vilagran et al (2016). Os autores observaram que a GPx5 não foi capaz de prever a congelabilidade do ejaculado de suínos e seus níveis não foram correlacionados com a análise do componente principal do sêmen congelado-descongelado. Os dados citados neste último estudo vêm ao encontro da correlação observada no plasma seminal ($R^2 = 0,2447$; $P = 0,0369$), onde a

motilidade ao quinto dia de armazenamento se correlaciona negativamente com a presença de GPx. Segundo Vilagram e colaboradores (2016), a razão para esta observação seria a de que machos com baixa qualidade seminal, consequentemente mais susceptíveis ao estresse oxidativo, teriam maiores quantidades de GPx na tentativa de compensar os possíveis danos celulares.

Os resultados apresentados ainda evidenciam uma individualidade dos animais observados ao longo das estações do ano. Dentre os fatores sazonalidade, raça e composição do plasma seminal, a individualidade é citada por muitos autores como ponto chave na variação da grande maioria dos fatores quantitativos e qualitativos do sêmen de reprodutores suínos (STREZEZEK et al., 2000; CIERESZKO, et al., 2000; MURASE et al., 2007; FLOWERS, 2008; EINARSSON et al., 2008; WYSOKINSKA et al., 2009; ADAMIAK et al., 2010; KNECHT et al., 2013). Mesmo sob as mesmas condições de temperatura, nutrição e manejo, observa-se que cada animal possui um padrão de qualidade seminal e diferentes padrões de variação ao longo do ano (Figura 8). Dessa forma, é importante salientar que quem trabalha com reprodutores deve conhecer a característica individual de seus animais disponíveis e estar atento sempre a qualquer mudança que se apresentar.

A boa gestão de uma central de inseminação de suínos pode explicar os resultados deste estudo. Juntamente com uma rotina correta de coleta de sêmen, práticas de bem-estar animal, controle do estresse térmico pelo calor e nutrição equilibrada, a administração de suplementação vitamínica durante todo o período de experimento poderia ter contribuído para a ausência de efeito marcante da estação nos parâmetros avaliados. Brzezinska-Slebozinska et al. (1995) relataram aumentos na concentração de espermatozoides após suplementação de vitamina E via ração. Além disso, a suplementação de quantidades extras de vitaminas solúveis (colina, ácido pantotênico, riboflavina, ácido fólico, niacina, tiamina, piridoxina, vitamina B12 e biotina) ou vitaminas não-solúveis (vitamina A, vitamina D3 e vitamina E) aumentou o número de espermatozoides ejaculados, mesmo em rotinas intensas de coleta de sêmen (AUDET et al., 2004). No entanto, há pouca informação sobre os efeitos da aplicação intramuscular das vitaminas sobre os parâmetros espermáticos. González-Cadavid (2010) avaliou o efeito da administração intramuscular de vitaminas e minerais em cachacos e observou melhora das características do

sêmen *in natura* (motilidade, vigor, morfologia, integridade de membrana, integridade acrossomal e criotolerância). Sabe-se que o α -tocoferol e seus derivados são antioxidantes lipossolúveis que protegem as células de radicais livres *in vivo* e *in vitro*. Este potente antioxidante parece ser o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades em membranas celulares de mamíferos e plasma seminal. Romano e Martinez (2001) consideram que a vitamina A está envolvida no crescimento, formação e manutenção do tecido epitelial e sua deficiência resulta em problemas reprodutivos. Os reprodutores que consomem doses abaixo de 1000 UI apresentaram anormalidades espermáticas quando comparados ao grupo que consome 31.000 UI (WEMHEUER et al., 1996).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foram identificadas 663 proteínas no fluido da cauda do epidídimo de reprodutores suínos através da técnica de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT). Este valor é próximo a 3 vezes maior do que o valor até então descrito na literatura por Syntin e colaboradores, que identificaram 146 proteínas secretadas pelo epidídimo (1996). Dentre as 663 proteínas observadas, as 10 proteínas discutidas neste trabalho representam 40% das contagens espectrais obtidas pela técnica de MudPIT, demonstrando sua relevância no plasma seminal suíno e no processo reprodutivo da espécie, além da complexidade do ambiente de preservação espermática pré-ejaculação, uma vez que os outros 60% são representados por 653 proteínas. Este trabalho serve como base para estudos posteriores na área de proteômica reprodutiva e compreensão dos processos que ocorrem na cauda do epidídimo e envolvem a maturação e capacitação da célula espermática.

O segundo estudo observou baixa correlação das defesas antioxidantes ao longo do ano no plasma seminal e células espermáticas de reprodutores suínos com os parâmetros de qualidade seminal avaliados. A variação da qualidade seminal geral durante este período também não mostrou diferenças significativas importantes. A literatura se mostra muito controversa sobre a qualidade seminal durante as diferentes estações do ano; no entanto, é comum encontrar observações de problemas qualitativos e quantitativos no sêmen suíno em épocas críticas de produção. A partir deste estudo e do levantamento bibliográfico, infere-se que um bom manejo com os animais, a fim de reduzir todas as possíveis causas que possam vir a afetar a qualidade seminal são de extrema importância e refletem diretamente no produto final que se busca em uma central de inseminação de suínos. Nenhum esforço deve ser poupado para que se tenham animais em condições ambientais adequadas de temperatura, de nutrição, de suplementação vitamínica e mineral e de manejo correto de coletas. Infelizmente ainda se discute pouco o manejo destes

animais frente à importância que eles têm no manejo reprodutivo como um todo, e estudos mais aprofundados, que envolvam técnicas mais avançadas são necessários.

A partir destas duas observações, entende-se a dimensão do universo que a proteômica ainda nos expõe a estudar. O epidídimo se mostra como local perfeito de armazenamento de células espermáticas pré-ejaculação; entender este ambiente e conseguir reproduzi-lo significa a chave para problemas tanto dentro da indústria da produção de carnes, quanto problemas de infertilidade humana. Quando se fala em estresse oxidativo celular, entender este mecanismo e conseguir combatê-lo no ambiente seminal é vital para as células espermáticas, uma vez que os danos que as mesmas sofrem vão desde alterações em seu DNA até sua morte, ambos refletindo diretamente nas coberturas posteriores que venham a ser realizadas com estas células danificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D.R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. **Arch Biochem Biophys.** v. 379, p. 173-182. 2000.

ABRAHAM, D., BLAKEMORE, W. F., JOLLY, R. D., SIDEBHOTHAM, R., AND WINCHESTER, B. **Biochem. J.** v. 215, p. 573-579.1983.

ADAMIAK, A.; KONDRACKI, S.; WYSOKINSKA, A. Influence of season of the year on physical properties of ejaculates from Polish Large White and Polish Landrace boars. **Scientific Ann Polish Soc Reprod.** v. 37, p.159-67. 2010.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 121-126. 1984.

AGARWAL, A., IKEMOTO, I., LUOGHLIN, K.R. Relationship of sperm parameter with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **J Urol,** v. 152, p. 107-10. 1994.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction. Fertility and Development,** v.7, n.4, p.659–668. 1995.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility,** v. 97, p. 41-50. 1993.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, K.; BRINDLE, J. On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. **American Journal of Reproductive Immunology,** v.35, p.541-551. 1996.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology**

of Reproduction, v. 59, p.1037-1046. 1998.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, n.4, p.497-506. 2001.

AITKEN, R.J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of sperm physiology - Oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p.17–27. 2014.

ALVAREZ, J.G. & STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Res**, v.23, n.1, p.77-90. 1989.

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325. 2004.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J Equine Vet Sci**, n.7, p.145-173. 1987.

ANN, L.P.; MAEDA, T.; SAKAUE, T.; TAKEUCHI, K.; YAMANE, T.; DU, P.G.; OHKUBO, I.; OGITA, H. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma. **Biochemical and biophysical research communications**, v.423, n.4, p.690-696. 2012.

ANDERSON, J. The semen of animals and its use for artificial insemination. **Imperial Bureau of Animal Breeding and Genetics**, Edinburgh, 1945.

AM-IN, N.; KIRKWOOD, R.N.; TECHAKUMPHU, M.; TANTASUPARUK, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v.75, p.897-903. 2011.

AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M.M. Reactive Oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, v.81, p.553-561. 2009.

AUDET, I.; LAFOREST, J. P.; MARTINEAU, G. P.; MATTE, J. J. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance , vitamin status, and semen quality in boars. **Journal of Animal Science**, v.82, n.2, p.626-633, 2004.

BADIA, E. Estudi Estructural, Ultraestructural I Histoquímic de les Glàndules Sexuals Accessòries del Mascle Reproductor Porcí. **Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona**, 2003.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.508-515. 2001.

BARRANCO, I.; ORTEGA, M.D.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.M.; ROCA, J. Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. **Cryobiology**, p.67, p.299-304. 2013.

BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATIÑO, C.; VICENTE-CARRILLO, A.; PARRILLA, I.; CERON, J.J.; MARTINEZ, E.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. Glutathione Peroxidase 5 Is Expressed by the Entire Pig Male Genital Tract and Once in the Seminal Plasma Contributes to Sperm Survival and In Vivo Fertility. **PLoS One**, v.11, n.9. 2016.

BASSOLS, J. Cultiu de les Cèl.lules Epiteliales Epididimàries de *Sus domesticus*: Anàlisi Estructural, Funcional i Proteòmic. **Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona**, 2006.

BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. In vitro culture of epithelial cells from caput, corpus and cauda epididymis of *sus domesticus*. **Theriogenology**, v.62, p.929–942, 2004.

BATRUCH, I.; LECKER, I.; KAGEDAN, D.; SMITH, C.R.; MULLEN, B.J.; GROBER, E.; LO, K.C.; DIAMANDIS, E.P.; JARVI, K.A. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. **J Proteome Res**, v.10, n.3, p.941-53. 2011.

BAYLEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, n.1, p1-7. 2000.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**. Berkeley, v.65,

p.1865-1874. 1999.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.282-288. 2000.

BONET, S.; GARCIA, E.; SEPÚLVEDA, L. The boar reproductive system. In: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M, editors. **Boar reproduction**. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. v.65, n.108. 2013.

BORTOLOZZO, F.P.; MENEGAT, M.B.; MELLAGI, A.P.G.; BERNARDI, M.L.; WENTZ, I. New artificial insemination technologies for swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n. 2, p.80-84. 2015.

BORTOLOZZO FP, WENTZ I, DALLANORA D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Sci Vet**, v.33, n.1, p.17-32. 2005.

BORG, K.E.; LUNSTRA, D.D.; CHRISTENSON, R.K. Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature Duroc, Meishan, Fengjing, and Minshu boars. **Biol Reprod**, v.49, p.515–521. 1993.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**. Buenos Aires. v.58, p.350-356. 1998.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v.134, p.707–716. 1973.

BRIZ, M. Anàlisi Microscòpica de l'Esperma Ejaculada i de la Maduració Epididimària dels Espermatozoides de *Sus domesticus*. **Doctoral Thesis**. Ed Universitat de Girona, 1994.

BROOKS, D.E.; HAMILTON, D.W.; MALLEK, A.H. Carnitine and glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rats. **J Reprod Fertil**, v.36, n.1, p.141–160. 1974.

BROWNE, J.; SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after free-thawing. **Theriogenology**, v.63, p.458–469. 2005.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biol Trace Elem Res**, v.47, p.69–74.

1995.

BUHR, M.M. Preservation of boar sperm alters membrane molecular dynamics.

Reproduction in Domestic Animals, n.1, p.81–93. 1990.

BUSSALEU, E.; TORNER, E. Quality improvement of boar seminal doses. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. (Eds). Boar Reproduction – Fundamentals and New Biotechnological Trends. **Berlin: Springer**, p.517-550. 2013.

BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, Â.M.; GREGORY, R.M. DUTRA-FILHO, C.S. JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. **Animal Reproduction**, v.6, p.392-399. 2009.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GARCÍA, E.M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; MARTÍNEZ, E.A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa.

Theriogenology, v.70, p.1352-1355. 2008.

CABALLERO, I.; PARRILLA, I.; ALMIÑANA, C.; DEL OLMO, D.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.A. Seminal Plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. **Reprod Domest Anim**, v.47, n.3, p.12–21. 2012

CALVETE, J.J.; ENSSLIN, M.; MBURU, J.; IBORRA, A.; MARTÍNEZ, P.; ADERMANN, K.; WABERSKI, D.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WEITZE, K.F.; EINARSSON, S.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. **Biol Reprod**. v.57, p.735-742. 1997.

CAMPANERO-RHODES, M. A.; MENÉNDEZ, M.; SÁIZ, J. L.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; SOLÍS, D. Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer. **FEBS Journal**, v.272, n.21, p.5663-5670. 2005.

CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.; CHEN, E.I.; YATES, J.R.; BARBOSA, V.C. PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. **BMC bioinformatics**, v.9, n.1, p.1. 2008.

CASILLAS, E.R. Accumulation of carnitine by bovine spermatozoa during

- maturation in the epididymis. **J Biol Chem**, v.248, p.8227–8232. 1973.
- CEROLINI, S.; SURAI, P.; MANGIAGALLI, G.; GAVALCHINI, L.G. Effect of n-3 and n-6 fatty acid supplemented diets and vitamin E level on semen quality in cockerels. **British Poultry Science**, v.41, n.1, p.8-10. 2000.
- CIERESZKO, A.; OTTOBRE, J.S.; GLOGOWSKI, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and sêmen quality of boars. **Anim Reprod Sci**, v.64, p.89-96. 2000.
- CHABORY, E.; DAMON, C.; LENOIR, A.; KAUSELMANN, G.; KERN H.; ZEVIK, B.; GARREL, C.; SAEZ, F.; CADET, R.; HENRY-BERGER, J.; SCHOOR, M.; GOTTWALD, U.; HABENICHT, U.; DREVET, J.R.; VERNET, P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, p.2074-2085. 2009.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 544.
- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reative oxym species by sperm undergoing cooling, freezing and thawing. **Mol Reprod Dev**, v.59, p.451-8. 2001.
- CHEON, Y.M.; KIM, H.K.; YANG, C.B.; YI, Y.J.; PARK, S.C. Effect of season influencing semen characteristics, frozen-thawed sperm viability and testosterone concentration in Duroc boars. **Asian-Aust J Anim Sci**, v.15, p. 500-3. 2002.
- CHEUNG, Y.M.; HWANG, J.C.; WONG, P.Y. In vitro measurement of rate of fluid secretion in rat isolated seminiferous tubules: effects of metabolic inhibitors and ions. **J Physiol**, v.269, n.1, p.1-15. 1977.
- CHOE, L.H.; AGGARWAL, K.; FRANCK, Z.; LEE, K.H. A comparison of the consistency of proteome quantitation using two-dimensional electrophoresis and shotgun isobaric tagging in Escherichia coli cells. **Electrophoresis**, v.26, p.2437-49. 2005.
- COSENTINO, M.J.; COCKETT, A.T. Structure and function of the epididymis. **Urol Res**, v.14, p.229–240. 1986.
- COOPER, T.G. Epididymis. In: Neill JD, Knobil E (eds) **Encyclopedia of**

Reproduction, Academic Press, San Diego, 1998.

CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M.; KAN, R. Molecular biology of the human male in infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Mol Reprod Dev**, v.37, p.345-62. 1994.

DACHEUX, J.L.; BELLEANNÉE, C.; JONES, R.; LABAS, V.; BELGHAZI, M.; GUYONNET, B.; DRUART, X.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Mammalian epididymal proteome. **Mol Cell Endocr**, v.306, p.45–50. 2009.

DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v.63, p.319-341. 2005.

DACHEUX, J.L.; DRUART, X.; FOUCHECOURT, S.; SYNTIN, P.; GATTI, J.L.; OKAMURA, N.; DACHEUX, F. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. **J Reprod Fertil Suppl**, v.53, p.99-107. 1998.

DACHEUX, J. L. et al. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 250, n. 1, p. 36-42, 2006.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, n. 4, p.466-470. 1977.

DAVIES KJ. Proteins damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. **J Chem Biol**, v.262, n.20, p.9895-9990. 1987.

DE IULIIS, G.N.; THOMSON, L.K.; MITCHELL, L.A.; FINNIE, J.M.; KOPPERS, A.J.; HEDGES, A.; NIXON, B.; AITKEN, R.J. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress.

Biology of Reproduction, v.81, p.517–24. 2009.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II: Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v.13, p.379–386. 1992.

DE LAMIRANDE, E.; LAMOTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radic Biol Med**, v.46, p.502-510. 2009.

- DE LEEUW, F.E.; CHEN, H.C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Cold induced ultra structural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-83. 1990.
- DE VRIES, A.C.J.; COLENBRANDER, B. Isolation and characterization of boar spermatozoa with and without a cytoplasmic droplet. **International Journal of Biochemistry**, v.22, n.5, p.519-524. 1990.
- D.M. KRETZER. Male Infertility. **Lancet**, v.349, p.787-790. 1997.
- DREVET, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.250, p.36-42. 2006.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **The Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.432-437. 1993.
- ECROYD, H.; BELGHAZI, M.; DACHEUX, J.L.; MIYAZAKI, M.; YAMASHITA, T.; GATTI, J.L. An epididymal form of cauxin, a carboxylesterase-like enzyme, is present and active in mammalian male reproductive fluids. **Biology of Reproduction**, v.74, p.439-447. 2006.
- EINARSSON, S.; BRANDT, Y.; LUNDEHEIM, N.; MADEJ, A. Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. **Acta Vet Scand**, v.50, p.1-8. 2008.
- ENG, J.; McCORMACK, A.; YATES, J.R. 3rd. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.5, p.976-989. 1994.
- ERASMUS, E.L.; OETTLE, E.E.; FRANKEN, D.R.; KRUGER, T.F.; OEHNINGER, S.C. Analysis of association between reactive oxygen species and semen quality. **J. Androl.** (abstract), v.18, p.3. 1992.
- ESPINO, J.; BEJARANO, I.; ORTIZ, A.; LOZANO, G.M.; GARCIA, J.F.; PARIENTE, J.A.; RODRIGUEZ, A.B. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. **Fert Steril**, v.94, p.1915-1917. 2010.
- FÀBREGA, A.; GUYONNET, B.; DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L.; PUIGMULÉ, M.; BONET, S.; PINART, E. Expression, immunolocalization and processing of fertilins ADAM-1 and ADAM-2 in the boar (*sus domesticus*) spermatozoa during

- epididymal maturation. **Reprod Biol Endocrinol**, v.9, p.96-109. 2011a.
- FÀBREGA, A.; PUIGMULÉ, M.; YESTE, M.; CASAS, I.; BRIZ, M.; BONET, S.; PINART, E. Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.76, n.7, p.1356-1366. 2011b.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-8. 1997.
- FLOWERS, W.L. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. **Theriogenology**, v.70, p.1297-303. 2008.
- FLOWERS, W.L.; STEWART, K.R.; GALL, T.; NOVAK, S.; DYCK, M.K.; KIRKWOOD, R.N. Boar seminal plasma proteins and their relevance to reproductive technologies. Rodríguez-Martínez H, Soede NM, Flowers WL, Editors, **Control of pig reproduction IX**, edited by Context Products Ltd, Leicestershire, UK. Soc Reprod Fertil, v.68, p.33–45. 2013
- FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biol Reprod**, v.62, p.1790-1803. 2000.
- FRASER, L.; DZIEKOŃSKA, A.; STRZEŻEK, R.; STRZEŻEK, J. Dialysis of boar semen prior to freezing thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. **Theriogenology**, v.67, p. 994-1003. 2007.
- FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; LECEWICZ, M.; STRZEŻEK, J. Age-related changes and seasonal variation in boar sperm metabolism during liquid storage at 5° and 16°C. **J Anim Feed Sci**, v.12, p.803-11. 2003.
- FUNDERBURKE, D.; SHIPP, T. Sperm, reactive oxygen species (ROS) and anti-oxidants, 2007.
- GADEA, J. Review: Semen extenders used in artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, p.17-27. 2003.
- GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**. v.62, p.690-701. 2004.

GARCIA-GIL, N. Estructura I Ultraestructura Testicular del Mascle Reproductor Porcí. **Doctoral Thesis. Ed Universitat de Girona.** 2002.

GARCÍA, E.M.; VÁZQUEZ, J.M.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.; PARRILLA, I. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSPI/PSP-II on boar sperm functionality. **J Androl.** v.27, p.434-43. 2006.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction,** v.26, n.7, p.1628-1640. 2011.

GONZALEZ-CADAVID, V. Efeito da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a criopreservação do sêmen de cachorros. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia.** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2010.

GONZÁLEZ-CADAVID, V.; MARTINS, J.A.; MORENO, F.B.; ANDRADE, T.S.; SANTOS, A.C.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C., MOREIRA, R.A.; MOURA, A.A. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. **Theriogenology,** v.82, n.5, p.697-707. 2014.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science,** v.84, p.2089-2100. 2006.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology,** v.78, p.1700-1708. 2012.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R.; LONG, J.A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology,** v.70, p.1209-1215. 2008.

GUYONNET, B.; MAROT, G.; DACHEUX, J.L. The adult boar testicular and epididymal transcriptomes. **BMC Genomics,** v.10, p.369. 2009.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. **Reproduction in farm animals.** Wiley, USA. Lippincott Williams & Wilkins Eds, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free Radicals In Biology and Medicine.** 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HAMADA, A.; SHARMA, R.; DU PLESSIS, S.S.; WILLARD, B.; YADAV, S.P.;

- SABANEH, E.; AGARWAL, A. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. **Fertil. Steril**, v.99, p.1216–1226. 2013.
- HAN, X.; ASLANIAN, A. & YATES, J.R. 3rd. (2008). Mass spectrometry for proteomics. In: **Curr Opin Chem Biol**. England, p. 483.
- HEMSWORTH, P.H.; TILBROOK, A.J. Sexual behaviour of male pigs. **Horm Behav**, v.52, p.39-44. 2007.
- HICKOX, D.M.; GIBBS, G.; MORRISON, J.R.; SEBIRE, K.; EDGAR, K.; KEAH, H.H.; ALTER, K.; LOVELAND, K.L.; HEARN, M.T.; DE KRETZER, D.M.; O'BRYAN, M.K. Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. **Biol. Reprod.** v.67, p.917-927. 2002.
- HINTON, B.T.; HOWARDS, S.S. Rat testis and epididymis can transport [3H] 3-Omethyl-Dglucose, [3H] inositol and [3H] alpha-aminoisobutyric acid across it epithelia in vivo. **Biol Reprod.** v.27, n.5, p.1181-1189. 1982.
- HINTON, B.T.; PALLADINO, M.A. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. **Microsc Res Tech.** v.30, p.67-81. 1995.
- HINTON, B.T.; PALLADINO, M.A.; RUDOLPH, D.; LABUS, J.C. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reprod Fertil Dev.** v.7, p.731-745. 1995.
- HINTON, B.T.; SNOSWELL, A.M.; SETCHELL, B.P. The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testis and epididymis of the rat and some other mammals. **J Reprod Fertil.** v.56, n.1, p.105–111. 1979.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3–22. 2000.
- HOLTZ, W.; SMIDT, D. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. **J Reprod Fertil**, v.46, p.227-229. 1976.
- Huang, Y.H.; Lo, L.L.; Liu, S.H.; Yang, T.S. Age-related changes in semen quality characteristics and expectations of reproductive longevity in Duroc boars. **Anim Sci J**, v.81, p.432-437. 2010.
- HUGHES, P.E.; VARLEY, M.A. **Reproducción del Cerdo**. Acribia, Zaragoza. 1984.
- IINO, S.; TAGUCHI, K.; MAEKAWA, S.; NOJYO, Y. Motor, sensory and

- autonomic nerve terminals containing NAP-22 immunoreactivity in the rat muscle. **Brain Res**, v.1002, p.142-150. 2004.
- IVANOW, E.I. De la fécondation artificielle chez les mammifères. **Arch Sci Biol**. v.12, p.377-511. 1907.
- IVANOW, E.I. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. **J Agric Sci** v.12, p.244-256. 1922.
- Ito, T.; Niwa, T.; Kudo, A. Studies on artificial insemination in swine. **Zootech Exp Sta Res Bull** v.55, p.1-74. 1948.
- JAMES, M.J.; BROOKS, D.E.; SNOSWELL, A.M. Kinetics of carnitine uptake by rat epididymal cells. Androgen-dependence and lack of stereospecificity. **FEBS Lett** v.126, p.53-56. 1981.
- JEULIN, C.; DACHEUX, J.L.; SOUFIR, J.C. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. **J Reprod Fertil**, v.100, p.263-271. 1994.
- JEULIN, C.; LEWIN, L.M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. **Hum Reprod Update**, v.2, p.87-102. 1996.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172. 2000.
- JONES, R. Membrane remodeling during sperm maturation in the epididymis. In: **Oxford reviews of reproductive biology**. Oxford University Press, Oxford. 1989.
- JONES, R.C.; CLULOW, J. Interactions of sperm and the reproductive ducts of the male tammar wallaby, *Macropus eugenii* (Macropodidae: Marsupialia). **Reprod Fertil Dev**, v.6, p.437-444. 1994.
- JONES, A.R.; MONTAGUE, M.D. Metabolism of fructose-1,6-bisphosphate by mature boar spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v.3, p.609-613. 1991.
- JOSEPH, A.; OKERE, C.; EZEKWE, M. Seasonal and genotype variations in libido, semen production and quality in artificial insemination boars. **J Anim Vet Adv**, v.4, p.885-888. 2005.
- JUYENA, N.; STELLETA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **J Androl**, v.33, p.536-51. 2012.
- KATOH, Y.; TAKEBAYASHI, K.; KIKUCHI, A.; IKI, A.; KIKUCHI, K.; TAMBA,

- M.; KAWASHIMA, A.; MATSUDA, M.; OKAMURA, N. Porcine sperm capacitation involves tyrosine phosphorylation and activation of aldose reductase. **Reproduction Research**, v.148, p.389-401. 2014.
- KENNEDY, B.W.; WILKINS, J.N. Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. **Can J Anim Sci**, v.64, p.833-43. 1984.
- KIKUCHI, M.; TAKAO, Y.; TOKUDA, N.; OHNAMI, Y.; ORINO, K. Relationship between seminal plasma lactoferrin and gonadal function in horses. **J Vet Med Sci**, v.65, p.1273-1274. 2003.
- KINOSHITA, J.H.; NISHIMURA, C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. **Diabetes Metab Rev**, v.4, p.323-337. 1988.
- KNECHT, D.; ŚRODOŃ, S.; DUZIŃSKI, K. The influence of boar breed and season on semen parameters. **South Afr J Anim Sci**, v.1, p.1–9. 2014.
- KNECHT, D.; SRODON, S.; SZULC, K.; DUZINSKI, K. The effect of photoperiod on selected parameters of boar semen. **Livest Sci**, v.157, p.364-71. 2013.
- KNOBIL, E.; NEILL, J. **Physiology of Reproduction**, 3rd ed. Academic, Waltham, 2006.
- KNOX, R.V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, v. 85, p. 83-93. 2016.
- KORDAN, W.; STRZEŻEK, J.; FRASER, L. Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review. **Pol J Vet Sci**, v.6, p.55-60. 2003.
- KOWALOWKA, M.; WYSOCKI, P.; FRASER, L.; STRZEZEK, J. Extracellular Superoxide Dismutase of Boar Seminal Plasma. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43. 490-496. 2008.
- KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOZIOROWSKI, M.; STRZEŻEK, J.; FRASER, L. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of boar reproductive tract. **Reprod Biol**, v.11, p.37-47. 2011.
- KUMAR, V.; HASSAN, M.I.; TOMAR, A.K.; KASHAV, T.; NAUTIYAL, J.; SINGH, S. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. **J Biosci**, v.34, p.899-908. 2009.

- KUNAVONGKRIT, A.; SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; HEARD, T.; EINARSSON, S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v.63, p.657-667. 2005.
- KUMARESAN, A.; KADIRVEL, G.; BUJARBARUAH, K.M.; BARDOLOI, R.K.; DAS, A.; KUMAR, S.; NASAR, S. Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.162-171. 2009.
- KURANDA, M.J.; ARONSON JR., N.N.J. **Biol. Chem**, v.261, p.5803-5809. 1986.
- KOZDROWSKI, R.; DUBIEL, A. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. **Anim Reprod Sci**, v.80, p.281-289. 2004.
- KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOZIOROWSKI, M.; STRZEZEK, J.; FRASER, L. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of boar reproductive tract. **Reprod Biol**, v.11, p.37-47. 2011.
- KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELENÁ, B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **J. Reprod. Immunol**, v.65, p.3346. 2005.
- KUNAVONGKRIT, A.; SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; HEARD, T.W.; EINARSSON, S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v.63, p.657-667. 2005.
- LASOTA, B.; BLASZCZYK, B.; SEREMAK, B.; UDALA, J.; SERAFIN A. Se-dependent GSH-Px activity in semen of boars at different season of the year. **Folia Universitatis Aglicultuare Stetinensis**, v.236, p.39-46. 2004.
- LEE, S.H.; PARK, C.K. Antioxidative effects of magnetized extender containing bovine serum albumin on sperm oxidative stress during long-term liquid preservation of boar semen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, p. 467–472. 2015.
- LEVAY, P.F.; VILJOEN, M. Lactoferrin: a general review. **Haematologica**, v.80, p.252-267. 1995.
- LI, T. K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biol. Reprod**, v.12, p.641-646. 1975.
- LI, X.; PABLA, N.; WEI, Q.; DONG, G.; MESSING, R.O.; WANG, C.Y.I. PKC-delta promotes renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria. **J Am**

Soc Nephrol v.21, p.1115-1124. 2010.

LINK, A.; ENG, J.; SCHIELTZ, D.; CARMACK, E.; MIZE, G.; MORRIS, D.; GARVIK, B.; YATES, J.R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat Biotechnol**, v.7, p.676-682. 1999.

LOVERCAMP, K.W.; STEWART, K.R.; LIN, X.; FLOWERS, W.L. Effect of dietary selenium on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 268–275. 2013.

LUCCA, F. Proteômica do plasma seminal de cachorros de alta e baixa resistência à refrigeração seminal a 17°C. **Dissertação de Mestrado**. Centro Universitário UNIVATES. 2014.

LUNDGREN, D.H.; HWANG, S.I.; WU, L.; HAN, D.K. Role of spectral counting in quantitative proteomics. **Expert Rev Proteomics**, v.7, p.39–53. 2010.

MAEKAWA S, MAEKAWA M, HATTORI S, NAKAMURA S. Purification and molecular cloning of a novel acidic calmodulin binding protein from rat brain. **J Biol Chem**, v.268, p.13703-13709. 1993.

MAÑÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ, P.; COZLOVÁ, N.; DOROSH, A.; SULC. M.; GUIONNET, B.; JONÁKOVÁ, V. Acrosin inhibitor detection along the boar epididymis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.82, p.733-739. 2015.

MANN, THADDEUS, AND CECILIA LUTWAK-MANN. **Male reproductive function and semen**. Springer-Verlag. 1981.

MARKLUND, S. 1985. In: **Handbook of Oxygen Radical Research**. Boca Raton: CRC Press. p.243-247.

MATOUŠEK J. Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals. **Anim.Reprod. Sci.**, v.8, p.1–40. 1985.

MAY, N.; PATTERSON, J.L.; PINILLA, J.C.; CARPENTER, A.; TRIEMERT, E.; HOLDEN, N.; FOXCROFT, G. R.; DIXON, W.T.; WERNER, T.; DYCK, M.K. Seminal plasma proteins associated with boar fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50 (Suppl. 2), p. 110–118. 2015.

MCDONALD, W.H.; TABB, D.L.; SADYGOV, R.G.; MACCOSS, M.J.; VENABLE, J.; GRAUMANN, J.; JOHNSON, J.R.; COCIORVA, D.; YATES, J.R. 3rd. MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. **Rapid**

Commun Mass Spectrom, v.18, p.2162-2168. 2004.

MCKENZIE, E.E. A method for collection boar semen. **J Am Vet Assoc**, v.78 (News series 31), p.244–246. 1931.

MENEGAT, M. B. Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

METAFORA, S.; PELUSO, G.; PERSICO, P.; RAVAGNAN, G.; ESPOSITO, C.; PORTA, R. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. **Biochemical Pharmacology**, v.38, n.1, p.121-131. 1989.

MAUGET, R.; BOISSIN, J. Seasonal changes in testis weight and testosterone concentration in European Wild Boar (*Sus scrofa L.*). **Anim Reprod Sci**, v.13, p.67-74. 1987.

MENDEZ, M.F.B.; ZANGERONIMO, M.G.; ROCHA, L.G.P.; FARIA, B.G.; PEREIRA, B.A.; FERNANDES, C.D.; CHAVES, B.R.; MURGAS, L.D.S.; SOUSA, R.V. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. **Animal**, v. 7, p. 793-798. 2013.

MILLER, D.J.; GONG, X.; SHUR, B.D. Sperm require B-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida.

Development, v.118, p.1279-1289. 1993.

MOSEVITSKY, M.I.; CAPONY, J.P.; SKLADCHIKOVA, G.; NOVITSKAYA, V.A.; PLEKHANOV, A.Y.; ZAKHAROV, V.V. The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties. **Biochimie**, v.79, p.373-384. 1997.

MOTOYAMA, A.; YATES J.R., 3rd. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Anal Chem**, v.80, p.7187-7193. 2008.

MRUK, D.D.; CHENG, C.H.; CHENG, Y.H.; MO, M.Y.; GRIMA, J.; SILVESTRI, B.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution and regulation.

Biology of Reproduction, v.59, p.298-308. 1998.

MAULE, J.P. **The semen of animals and artificial insemination**.

Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K, 1962.

- MURAMATSU, T.; OZAWA, M. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca (2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. **J. Biol. Chem**, v.268, p.699-705. 1993.
- MURASE, T. IMAEDA, N.; YAMADA H.; MIYAZAWA,K. Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in Large White boars. **J Reprod Dev**, v.53, p.853-65. 2007.
- NISHIKAWA, Y. History and development of artificial insemination in the world. In: **Proceedings of the 5th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Trento, Italy, v.7, p.163-259. 1964.
- NIWA, T. Artificial insemination with swine in Japan. **Natl Inst Agric Sci**, Chiba-shi, Japan. 1958.
- NOBLANC, A.; KOCER, A.; CHABORY, E.; VERNET, P.; SAEZ, F.; CADET, R.; CONRAD, M.; DREVET, J.R. Glutathione peroxidase at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. **Journal of Andrology**, v.32, p.641-650. 2011.
- NOVAK, S.; RUIZ-SÁNCHEZ, A.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Seminal plasma protein as potential markers of relative fertility in boars. **Journal of Andrology**, v.31, p.188-200. 2010.
- OCHSENDORF, F.R.; BUHL, R.; BÄSTLEIN, A. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. **Hum. Reprod**, v.13, p.353-359. 1998.
- O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v.250, p.4007-4021. 1975.
- O,FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v.52, p.289-301. 1999.
- OHSE, T.; INAGI, R.; TANAKA, T.; OTA, T.; MIYATA, T.; KOJIMA, I. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. **Kidney Int**, v.70, p.1447–1455. 2006.
- OKAMURA, N.; DACHEUX, F.; VENIEN, A.; ONOE, S.; HEUT, J.C.; DACHEUX, J.L. Localization of a maturation-dependent epididymal sperm

surface antigen recognized by a monoclonal antibody raised against a 135-kilodalton protein in porcine epididymal fluid. **Biol Reprod**, v.47, p.1040-1052. 1992.

OKAMURA, N.; TAMBA, M.; LIAO, H.; ONOE, S.; SUJITA, Y.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Cloning of Complementary DNA Encoding a 135-Kilodalton Protein Secreted From Porcine Corpus Epididymis and Its Identification as an Epididymis-Specific α -Mannosidase. **Molecular reproduction and development**, v.42, p.141-148. 1995.

OKAMURA, N.; IWAKI, Y.; HIRAMOTO, S.; TAMBA, M.; BANNAI, S.; SUGITA, Y.; SYTHIN, P.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1336, p.99–109. 1997.

OLLERO, M.; GIL-GUZMAN, E.; LOPEZ, M.C.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVENSON, D.; THOMAS, A.J. JR; ALVAREZ, J.G. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v.16, p.1912–1921. 2001.

PARK, C.S.; YI, Y.J. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during season. **Anim Reprod Sci**, v.73, p.53–61. 2002.

PARK, K.; JEON, S.; SONG, Y.-J.; YI, L.S.H. Proteomic analysis of boar spermatozoa and quality changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. **Anim Repr Sci**, v.135, p.53-61. 2012.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266. 1992.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZANSKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. **Theriogenology**, v.77, p.1497–1504. 2012.

PEARL, C.A.; ROSER, J.F. Expression of lactoferrin in the boar epididymis: effects of reduced estrogen. **Domest Anim Endocrin**, v.34, p.153–159. 2008.

- PENA, F.J.; SARAVIA, F.; NUNEZ-MARTINEZ, I.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? **Animal Reproduction Science**, v.93, p.101-113. 2006.
- PERUMA, P.; CHAMUAH, J.K.; RAJKHOWA, C. Effect of catalase on the liquid storage of mithun (*Bos frontalis*) sêmen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.2, p.209-214. 2013.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, n.7, p.597-612. 2006.
- PETRUJKIĆ, B.T.; ŠEFER, D.S.; JOVANOVIĆ, I.B.; JOVIČIN, M.; JANKOVIĆ, S.; JAKOVLJEVIĆ, G.; BEIER, R.C.; ANDERSON, R.C. Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. **Animal Feed Science and Technology**, v.197, p.194-205. 2014.
- PETRUSKA, P.; CAPCAROVA, M.; SUTOVSKY, P. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. **Turkish Journal of Veterinary & Animal**, v.38, p.643–652. 2014.
- PINART, E.; PUIGMULÉ, M. Factors affecting boar reproduction, testis function, and sperm quality. In: Bonet, E.; Casas, I.; Holt, W.V.; Yeste, M. (Editors). **Boar reproduction, fundamentals and new biotechnological trends**, 9. Springer, p.109-202. 2013.
- POLGE, C. Artificial insemination of pigs. **Vet Rec**, v.68, p.62-76. 1956.
- PRUNEDA, A. Estudi Citològic i Bioquímic del Fluid Epididimari de *Sus domesticus*. **Doctoral Thesis**. Ed Universitat de Girona. 2006.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDÁR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. **Theriogenology**, v.63, p.2219-2232. 2005a.
- PRUNEDA, A.; YEUNG, C.H.; BONET, S.; PINART, E.; COOPER, T.G. Concentration of glutamate and myo-inositol in epididymal fluid and spermatozoa from boars. **Reprod Domest Anim**, v.40, n.4, p.369. 2005b.
- PRUNEDA, A.; YEUNG, C.H.; BONET, S.; PINART, E.; COOPER, T.G.

Concentrations of carnitine, glutamate, myo-inositol and sorbitol in epididymal fluid and spermatozoa from boars: comparison of two different semen collection frequencies. **Anim Reprod Sci**, v.97, p.344-355. 2007.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A.; SCHULMAN, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.37, n.2, p.528-531. 1973.

RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; HENNING, H.; WABERSKI, D. Quality control of boar sperm processing: Implications from European AI centres and two spermatology reference laboratories. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50(Suppl.2), p.1-4. 2015.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, function and their regulation. In: Knobil E, Neill JD (eds) **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, New York. 1988.

ROCA, J.; RODRIGUEZ, M.J.; GIL, M.A.; CARVAJAL, G.; GARCIA, E.M.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. **Journal of Andrology**, v.26, p.15-24. 2005.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v.63, n.2, p.514-535. 2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. The physiological roles of the boar ejaculate. **Control of pig reproduction VIII**, v.66, p.1-21. 2009.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **Am J Reprod Immunol**, v.66 (Suppl 1), p.11-22. 2011.

RODRÍGUEZ, A.L.; RIJSSELAERE, T.; BEEK, J.; VYT, P.; SOOM, A.V.; MAES, D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. **Syst Biol Reprod Med**, v.59, p.5-12. 2013.

ROBERTS, K.P.; WAMSTAD, J.A.; ENSRUD, K.M.; HAMILTON D.W.

Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. **Biol Reprod**, v.69, p.572-581. 2003.

ROMERO, A.; ROMAO, M.J.; VARELA, P.F.; KÖLLN, I.; DÍAS, J.M.;

- CARVALHO, A.L.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The Crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. **Nat Struct. Biol**, v.4, p.783-788. 1997.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci**, v.38, p.1-36. 1995.
- SALIER, J. P.; ÅKERSTRÖM, B.; BORREGAARD, N.; FLOWER, D. R. Lipocalins in bioscience: the first family gathering. **Bioessays**, v.26, n.4, p.456-458. 2004.
- SANCHEZ-NINO, M.D.; SANZ, A.B.; LORZ, C.; GNIRKE, A.; RASTALDI, M.P.; NAIR, V. BASP1 promotes apoptosis in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v.21, p.610-621. 2010.
- SANCHO, S. Efectes del Fotoperíode sobre la Qualitat Espermàtica de Mascles Porcins *Sus domesticus*. **Doctoral Thesis**. Ed Universitat de Girona. 2002.
- SANCHO, S.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; KADAR, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; COLL, M.G.; BONET, S. 2004. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. **Theriogenology**, v.62, p.1271-1282.
- SANCHO, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; CASAS, I.; PALOMO, M.J.; RAMÍO, L.; BONET, S. Effects of exposing boars to different artificial light regimens on semen plasma markers and “in vivo” fertilizing capacity. **Theriogenology**, v.65, p.317-331. 2006.
- SANCHO, S.; VILAGRAN, I. The Boar Ejaculate: Sperm function and seminal plasma analyses. In: BONET, S.; CASAS, I.; HOLT, W.V.; YESTE, M. (Eds). **Boar Reproduction – Fundamentals and New Biotechnological Trends**. Berlin: Springer, p.471–516. 2013.
- SANOCA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v.2, p.12. 2004.
- SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; GUIMARÃES, J.A.; MORESCO, J.J.; YATES, J.R. 3rd. Proteomic Profile of *Cryptococcus neoformans* Biofilm Reveals Changes in Metabolic Processes. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p.1545-1559. 2014.

- SCHIRMER, E.C.; YATES, J.R. 3RD; GERACE, L. MudPIT: A powerful proteomics tool for discovery. **Discov Med**, v.18, p.38-9. 2003.
- SCHNORR, B. **Embryology of Domestic Animals**. Enke, Stuttgart, p.10–13, 1996
- SCHOENTGEN, F.; JOLLES, P. From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site, **FEBS Lett**, v.369, n.1, p.22-26. 1995.
- SEDDIQUI, N.; BOLLENGIER, F.; ALLIEL, P.M.; PERIN, J.P.; BONNET, F.; BUCQUOY, S.; JOLLES, P.; SCHOENTGEN, F. Amino acid sequence of the Homo sapiens brain 21-23-kDa protein (neuropolypeptide h3), comparison with its counterparts from Rattus norvegicus and Bos taurus species, and expression of its mRNA in different tissues. **J. Mol. Evol.**, v.39, p.655-660. 1994.
- SETCHELL, B.P. Fluid secretion by the testis. **J Reprod Fertil**, v.14, p.347-348. 1967.
- SETCHELL, B.P. Do Sertoli cells secrete fluid into the seminiferous tubules? **J Reprod Fertil**, v.19, n.2, p.391-392. 1969.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **J. Androl.**, v.25, p.5-18. 2004.
- SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: SIES, H. (Ed.) **Oxidative Stress**. Academic Press: London, p. 1-8, 1985.
- SILVEIRA, P.R.; SCHEID, I.R.; A IA na suinocultura. **Suinocult Ind**, n.5, p.22-26, 2002.
- SMITAL J. Effects influencing boar semen. **Anim Reprod Sci**, v.110, p.335-46. 2009.
- SMOLLICH, A.; MICHEL, G. Microscopic anatomy of domestic animals. **Mikroskopische Anatomie der Haustiere**, Ed. 2, 1992.
- SONDERMAN, J.P.; LUEBBE, J.J. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. **Theriogenology**, v.70, p.1380-1383. 2008.

STRZEZEK, J.; FRASER, L.; DEMIANOWICZ, W.; KORDAN, W.; WYSOCKI, P.; HOLODY, D. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. **Theriogenology**, v.54, p.949-963. 2000.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; GLOGOWSKI, J.; WYSOCKI, P.; BORKOWSKI, K. Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. **Reprod Dom Anim**, V.30, P.85-94. 1995.

STRZEŻEK, J.; LAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Anim Sci Pap Rep**, v.17, p.181-8. 1999.

STRZEŻEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P.; TYSZKIEWICZ, A.; JASTRZEBSKI, M. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Anim Sci Pap Rep**, v.4, p.255-66. 2002.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W. 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.

STRYNADKA, N.C.; JAMES, M.N. **Annu. Rev. Biochem**, v.58, p.951-998. 1989.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochemica et Biophysica Acta.**, v.779, n.1, p.89-137. 1984.

SYNTIN, P.; DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. **Biol Reprod**, v.61, p.1622-1635. 1999.

SYNTIN, P.; DACHEUX, F.; DRUART, X.; GATTI, J.L.; OKAMURA, N.; DACHEUX, J.L. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of Reproduction**, v.55, p.956-974. 1996.

THALER, C.J.; VANDERPUYE, O.A.; MCINTYRE, J.A.; PAGE, F.W. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. **Biol Reprod**, v.43, p.712–717. 1990.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and the male infertility – a clinical perspective.

Hum Reprod Update, v.14, p.243-258. 2008.

TRUDEAU, V.; SANFORD, L.M. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boars. **J Anim Sci**, v.63, p.1211-1219. 1986.

TUCK, R.R.; SETCHELL, B.P.; WAITES, G.M.; YOUNG, J.A. The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. **Pflugers Arch**, v.318, p.225-243. 1970.

TULSIANI, D.R.P.; BROQUIST, H.P.; JAMES, L.F.; TOUSTER, O. **Arch. Biochem. Biophys**, v.264, p.607-617. 1988.

TULSIANI, D.R.P.; SKUDLAREK, M.D.; NAGDAS, S.K.; ORGEBIN-CREST, M.C. Purification and characterization of rat epididymal-fluid α -D-mannosidase: Similarities to sperm plasma membrane α -D-mannosidase. **Biochem J**, v.290, p.427-436. 1993.

TURNER, T.T.; HOWARDS, S.S. The tenacity of the blood-testis and blood-epididymal barriers. In: Lobl, T.J.; Hafez, E.S.E. (eds). **Male Fertility and its Regulation**, MTP Press Ltd, Lancaster. 1985.

VADNAIS, M.L.; ROBERTS, K.P. Seminal plasma proteins inhibit in vitro- and cooling induced capacitation in boar spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v.22, p.893-900. 2010.

VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol Cell Endocrinol**, v.216, p.31-39. 2004.

VILAGRAN, I.; CASTILLO-MARTÍN, M.; PRIETO-MARTÍNEZ, N.; BONET, S.; YESTE, M. Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.165, p.22-30. 2016.

WASHBURN, M.P.; WOLTERS, D.; YATES, J.R. 3RD. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol.**, v.3, p.242-7. 2001.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.871-891. 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492. 2000.

- WENDEL, A. In: Methods in enzymology. Vol I. **Gluthatione Peroxidase**. Academic Press, Inc, p. 325-333, 1981.
- Wentz, I.; Vargas, A.J.; Bortolozzo, F.P.; Castagna, C.D. Situação atual da inseminação artificial em suínos no Brasil e viabilização econômica do emprego dessa biotécnica. In: Simpósio Internacional Minitub de Inseminação Artificial em Suínos, 3, 2000, Flores da Cunha, RS. Anais... Flores da Cunha, RS: O simpósio. v.1, p.5-12. 2000.
- WICHMANN, L.; VAALASTI, A.; VAALASTI, T.; TUOHIMAA, P. Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. **Int J Androl**, v.12, p.179-186. 1989.
- WILCZYŃSKA, E.; KONDRACKI, S.; WYSOKIŃSKA, A.; KOWALEWSKI, D.; GAJOWNIK, K. The quality of boar semen of Polish Large White, Polish Landrace, Duroc and Pietrain breeds in different months of the year. **Scientific Annals of the Polish Society of Animal Reproduction**, v.9, p.49-56 (Summary in English). 2013.
- WOLF, J.; SMITAL, J. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. **J Anim Sci**, n.87, p.1620-1627. 2009.
- WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biol Reprod**, v.59, p.1506-1514. 1998.
- WOLTERS, D.A.; WASHBURN, M.P.; YATES, J.R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Anal Chem.**, v.73, p.5683-5690. 2001.
- WONG, P.Y.D.; AU, C.L.; NGAI, H.K. Some characteristics of salt and water transport in the rat epididymis. In: Fawcett DW, Bedford JM (eds) **The Spermatozoon, Urban & Schwarzenberg (English Edition)**, Baltimore-Munich. 1979.
- WYSOKIŃSKA, A.; KONDRACKI, S.; KOWALEWSKI, D.; ADAMIAK, A.; MUCZYŃSKA, E. Effect of seasonal factors on the ejaculate properties of crossbred Duroc x Pietrain and Pietrain x Duroc boars as well as purebred Duroc and Pietrain boars. **Bull Vet Inst Pulawy**, v.53, p.677-85. 2009.
- XU, T.; VENABLE, J. D.; KYU PARK, S.; COCIORVA, D.; LU, B.; LIAO, L.; WOHLSCHEGEL, J.; HEWEL, J.; YATES III, J. R. ProLuCID, a Fast and

- Sensitive Tandem Mass Spectra-based Protein Identification Program. Molecular & Cellular Proteomics. **5th Annual World Congress, Long Beach, CA**, v.671, p.174. 2006.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., et al. (Eds.), **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, p. 81-182. 1994.
- YATES, J.R.; RUSE, C.I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annu Rev Biomed Eng**, v.11, p.49-79. 2009.
- YESTE, M. New insights into boar sperm function and survival from integrated field and laboratory studies. **Doctoral Thesis**. Ed Universitat de Girona. 2008.
- YESTE, M.; BARRERA, X.; COLL, D.; BONET, S. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. **Theriogenology**, n.76, p184-196. 2011.
- YESTE, M.; CASTILLO-MARTÍN, M.; BONET, S.; BRIZ, M.D. Direct binding of boar ejaculate and epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to maintain sperm survival in in vitro co-culture. **Anim Reprod Sci**, v.131, p.181-193. 2012.
- YESTE, M.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; BONET, S. Diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. **Theriogenology**, v.73, p.577-86. 2010.
- YU, L.C.; CHEN, Y.H. The developmental profile of lactoferrin in mouse epididymis. **Biochem J**, v.296, p.107-111. 1993.
- ZHANG, X.G.; YAN, G.J.; HONG, J.Y.; SU, Z.Z.; YANG, G.S.; LI, Q.W.; HU, J.H. Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.2, p.263-269. 2015.
- ZASIADCZYK Ł, FRASER .L, KORDAN W, WASILEWSKA K. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. **Theriogenology**, v.83, p.1287-1303. 2015.
- ZUMOFFEN, C.M.; GIL, R.; CAILLE, A.M.; MORENTE, C.; MUNUCE, M.J.; GHERSEVICH, S.A. A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. **Hum. Reprod.**, v.28, p.1297-1308.

2013.