

HUGO HIDEKI SHIOMI

**ASPECTOS SEMINAIS DE SUÍNOS DA RAÇA PIAU: SAZONALIDADE E
CRIOPRESERVAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S556a
2018 Shiomi, Hugo Hideki, 1987-
Aspectos seminais de suínos da raça Piau : sazonalidade e
criopreservação / Hugo Hideki Shiomi. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 95f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Suínos - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Criopreservação de
orgãos, tecidos, etc. 4. Suínos - Recursos do germoplasma -
Criopreservação. 5. Suínos - Genética. 6. Esperma.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.40824

HUGO HIDEKI SHIOMI

ASPECTOS SEMINAIS DE SUÍNOS DA RAÇA PIAU: SAZONALIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

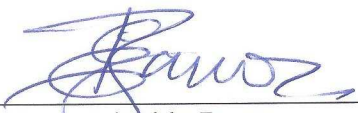
APROVADA: 21 de março de 2018.



Giancarlo Magalhães dos Santos



Jurandy Mauro Penitente Filho



Edvaldo Barros



Maria Cristina Baracat Pereira
(Coorientadora)



José Domingos Guimarães
(Orientador)

Aos meus pais, Massachiko Shiomi e Mari Yamaguchi Shiomi, pelo amor, dedicação e por serem exemplos para minha vida; aos meus irmãos Gustavo, Cassio e Vanessa, pela grande torcida e incentivo.

À minha querida batyan Sueko Yamaguchi (in memoriam).

Dedico

ii

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e benção.

À Universidade Federal de Viçosa, que permitiu a realização do meu doutorado. Aos Departamentos de Veterinária, de Zootecnia e de Bioquímica, pelas instalações e recursos.

À CAPES, à FAPEMIG e ao CNPQ pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro.

À minha querida família, por sempre me apoiarem e serem meu porto seguro.

Ao meu orientador, professor José Domingos Guimarães, pela confiança, paciência, pelo conhecimento e por ser exemplo de humildade.

À professora Maria Cristina Baracat Pereira, por se disponibilizar a ajudar prontamente nas análises bioquímicas, com toda sua gentileza e conhecimento.

Aos professores Paulo Sávio e Simone Guimarães, pelo apoio nas pesquisas e por permitir a realização de parte do experimento na Granja de Melhoramento de Suínos da UFV.

Ao Dr. Edvaldo por toda a ajuda nas análises bioquímicas, apoio moral e por ser exemplo de profissional. Sua contribuição foi essencial para a conclusão do trabalho.

Aos meus amigos da Veterinária, Camilo e Edgar, pela ajuda importantíssima no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, sempre dispostos e animados para o

trabalho. Vocês ajudaram demais naqueles dias solitários no laboratório e me deram força para prosseguir. Muito obrigado por todo companheirismo!

Agradecimento ao Núcleo de Análise de Biomoléculas, por disponibilizar o uso do MALDI TOF/TOF e softwares Mascot/ Scaffold.

Ao Camilo Elber, pela grande ajuda no Image Master e na Bioinformática. À Maria, Cláudia, Nívea, Pedro e Pedrão, pelo companheirismo e por deixarem o ambiente do Nubiomol mais leve e agradável.

Ao Rogério, Daniel, Jeane, Alberto, Breno, JC, Faider, Taynan, Lincoln e Lucas, pela atenção e participação ativa nos vários experimentos realizados na Granja de Melhoramento Genético de Suínos da UFV. A ajuda e a troca de conhecimentos foram fundamentais.

Ao Jurandy, por sempre ser solícito e disposto a ajudar. Muito obrigado pela ajuda nas análises estatísticas!

Aos funcionários da Granja de Melhoramento de Suínos: Seu Zé, Aloízio, Ednaldos, Leandro, Aldair, Toninho, Ricardo e Sérgio, por tornarem o ambiente de trabalho um lugar ainda mais agradável.

Aos professores dos Departamentos de Veterinária e Zootecnia, pelo estímulo ao aprendizado e à busca pelo conhecimento.

Ao Maurício, pela amizade, pelo grande incentivo e força desde os tempos de iniciação científica. Tenho enorme carinho e admiração por você! Você e sua família são muito queridos.

Ao Grupo de Estudos em Reprodução Animal (GERA), pelo conhecimento.

A todos meus queridos irmãos de Viçosa: Thiago Arcebispo, Baiano, Luis Felipe, Cachinhos, Daniel Arcebispo, Allan Muller, Tales, Empadinha, Ciro, Daniel Altholf, Rodrigo Rigueira, Wagnão, Buchecha, Gilcemir, Antônio Montalvão, Vinicião, Jammal, Pericão, Montalvinha, Kenji Osawa e Barlot, pelos momentos de descontração e parceria.

Ao casal Renan e Gláucia Cascardo, pelo carinho e amizade.

À Jeane Doucas, Tales Doucas e Carlos, por me acolherem gentilmente e me tratarem tão bem quando cheguei à Viçosa. Isso é muito importante para mim e sou muito grato a vocês.

Ao Edinho, Daniel, Carol, Alberto, JC, Faider, Jhonata, Vanessa, Dani, Hugo e toda a equipe da GMS, pela grande ajuda no dia-a-dia, companheirismo e amizade.

Aos membros do grupo de Bioquímica: Marcos, Flaviane, Renato, Patrícia, Kaíque, Wassali, Lavínias, por toda a ajuda.

Aos membros participantes da Banca de Defesa de Tese: professor José Domingos Guimarães, Dr. Jurandy, Dr. Edvaldo, professora Maria Cristina Baracat Pereira e professor Giancarlo. A contribuição e conhecimento de vocês são de grande valia para melhorar a tese.

À Rosi, por ser tão educada, coração bom, eficiente e proativa.

A todos os funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, por serem solícitos e gentis.

Aos varrões da Granja, pela contribuição essencial no experimento.

A todos que direta ou indiretamente participaram dessa caminhada até o dia de hoje.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
Sazonalidade influenciando as características seminais.....	2
Plasma seminal.....	4
Criopreservação de sêmen suíno.....	6
Justificativa.....	7
OBJETIVOS.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO 1- CARACTERÍSTICAS SAZONAIS DO SÊMEN DE SUÍNOS DA RAÇA PIAU.....	19
RESUMO.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES.....	44
AGRADECIMENTOS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO 2 - EFFECT OF CYCLODEXTRIN-LOADED CHOLESTEROL CONJUGATES ON PLASMA MEMBRANE VIABILITY OF PIAU SWINE BREED FROZEN/THAWED SPERMATOZOA (ARTIGO PUBLICADO)	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios e desvios-padrão de aspectos físicos do sêmen da raça Piau de acordo com a classe de idade.....	33
Tabela 2: Valores médios e desvios-padrão de Morfologia Espermática de suínos da raça Piau de acordo com a classe de idade	33
Tabela 3: Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do Sêmen de suínos da raça Piau de acordo com a estação do ano	35
Tabela 4: Valores médios e desvios-padrão de Morfologia Espermática de suínos da raça Piau de acordo com a estação do ano.....	36
Tabela 5: Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do Sêmen de suínos da raça Piau de acordo com o animal.....	37
Tabela 6: Valores médios e desvios-padrão de morfologia espermática de suínos da raça Piau de acordo com a estação do ano.....	38
Tabela 7: Identificação de proteínas extraídas do plasma seminal de varrões da raça Piau pelo Mascot.....	45
Tabela 8: Identificação de proteínas extraídas do plasma seminal de varrões da raça Piau (com validação no SCAFFOLD)	53
Tabela 9: Spots diferencialmente abundantes encontrados nas estações Primavera/Verão e Outono/ Inverno	59
Tabela 10: Correlações de Pearson	61
Table 11: Post-thawing semen quality in Piau swine breed, according cholesterol conjugates added during cryopreservation process.....	94
Table 12: Post-thawing semen quality in Piau swine breed during the thermo-resistance test, according cholesterol conjugates added during cryopreservation process.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Spots diferencialmente abundantes ao longo das estações do ano	60
Figura 2: Processos Biológicos – GENE ONTOLOGY	62
Fugura 3: Função Molecular – GENE ONTOLOGY	63
Figura 4: Componente Celular – GENE ONTOLOGY	64
Figura 5: Rede de interações realizada pelo programa STRING	65
Figura 6: Spots que tiveram proteínas identificadas por Mascott e validadas por Scaffold.....	66

RESUMO

SHIOMI, Hugo Hideki, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Aspectos seminais de suínos da raça Piau: sazonalidade e criopreservação.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Maria Cristina Baracat Pereira, Rogério Oliveria Pinho e Eduardo Paulino da Costa.

Foram realizados dois diferentes experimentos com o sêmen de suínos da raça Piau: o primeiro referiu-se à criopreservação seminal e o segundo, ao efeito da sazonalidade no perfil proteômico do plasma seminal e nas características físicas e morfológicas do sêmen. No primeiro experimento, foram utilizadas vinte coletas de cinco machos. O extensor de congelamento foi baseado em extensor de gema de lactose e ovo, adicionado a 2 % de glicerol, 3 % de dimetilacetamida. A adição de conjugados de colesterol carregados com ciclodextrina foi realizada após centrifugação, quando o sêmen foi diluído com o extensor de resfriamento. Quatro grupos foram submetidos ao seguinte tratamento: sem adição (grupo 1); 1,5 mg de colesterol carregado com ciclodextrina / 120×10^6 espermatozoides (grupo 2); 1,5 mg de colestanol carregado com ciclodextrina / 120×10^6 espermatozoides (grupo 3); 1,5 mg de esperma desmosterol carregado com ciclodextrina / 120×10^6 espermatozoides (grupo 4). Para analisar a qualidade pós-descongelamento, foram verificadas a motilidade e a morfologia espermática. Além disso, para verificar a viabilidade dos espermatozoides, foram utilizados o teste hiposmótico, a coloração supravital e o teste fluorescente. Os valores médios registrados para a motilidade espermática total imediatamente após a descongelação foram de $54,5 \pm 5,8$, $55,5 \pm 5,3$, $53,7 \pm 6,7$ e $52,5 \pm 6,6$ %, respectivamente, para os grupos de um a quatro, sem diferença entre eles ($p > 0,05$). Em relação ao teste fluorescente, os resultados foram $28,3 \pm 13,2$, $26,9 \pm 12,2$, $22,2 \pm 11,4$ e $32,0 \pm 15,3$ %, respectivamente, para os grupos de um a quatro, também sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Da mesma forma, testes complementares para avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática não mostraram diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$). Em conclusão, o uso de conjugados de colesterol carregados com ciclodextrina adicionados à membrana plasmática do esperma não demonstrou qualquer efeito aditivo no aumento e / ou manutenção da motilidade do espermatozoide. No experimento 2, foram utilizados dez varrões da raça Piau, aprovados previamente como férteis por exame andrológico e as coletas de sêmen foram realizadas mensalmente para análise, durante o período de um ano, avaliando motilidade, vigor, morfologia, concentração/ mL e concentração total. O perfil protéico do plasma

seminal foi obtido por eletroforese bidimensional, as análises de imagem dos géis foram realizadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6,0 (GE Healthcare®) e a identificação das proteínas foi por espectrometria de massas usando MALDI-TOF/TOF, com o software Mascot Daemon para a busca em banco de dados. A validação das proteínas identificadas entre os tratamentos foi realizada pelo programa SCAFOLD (95 %). No presente estudo, observou-se que as estações climáticas do ano influenciaram a qualidade do sêmen, e que no inverno houve maior alteração na morfologia espermática em relação ao verão, com mais defeitos espermáticos maiores e totais ($p < 0,05$), porém esses valores ainda se mostram dentro dos padrões de qualidade seminal preconizados para a espécie. Em relação à motilidade espermática progressiva, vigor e concentração espermática, não sofreram influência das estações climáticas do ano ($p > 0,05$). Importantes proteínas do plasma seminal de varrões da raça Piau foram identificadas e validadas, destacando-se as espermedesinas. Foram reportadas correlações significativas entre as características seminais e alguns spots. Ao longo das estações do ano, dez spots foram observados como diferencialmente abundantes.

ABSTRACT

SHIOMI, Hugo Hideki, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Seminal aspects of Piau swine breed: seasonality and criopreservation.** Advisor: José Domingos Guimarães. Co-advisors: Maria Cristina Baracat Pereira, Rogério Oliveria Pinho and Eduardo Paulino da Costa.

Two different experiments were carried out on the semen of Piau pigs: the first one referred to seminal cryopreservation and the second one, to the effect of seasonality on the proteomic profile of seminal plasma and on the physical and morphological characteristics of semen. In the first experiment, twenty samples of five males were used. The freezer extender was based on lactose and egg yolk extender, added to 2 % glycerol, 3 % dimethylacetamide. The addition of cyclodextrin loaded cholesterol conjugates was performed after centrifugation, when the semen was diluted with the cooling extender. Four groups were submitted to the following treatment: no addition (group 1); 1.5 mg of cyclodextrin-loaded cholesterol / 120×10^6 spermatozoa (group 2); 1.5 mg of cyclodextrin-loaded cholestanol / 120×10^6 spermatozoa (group 3); 1.5 mg of cyclodextrin-loaded desmosterol sperm / 120×10^6 spermatozoa (group 4). In order to analyze the post-thawing quality, the sperm motility and morphology were verified. In addition, to verify the viability of the spermatozoa, hyposmotic test, supravital staining and fluorescent test were used. The mean values recorded for the sperm motility immediately after thawing were 54.5 ± 5.8 , 55.5 ± 5.3 , 53.7 ± 6.7 and 52.5 ± 6.6 % , respectively, for groups one to four, with no difference between them ($p > 0.05$). Regarding the fluorescent test, the results were 28.3 ± 13.2 , 26.9 ± 12.2 , 22.2 ± 11.4 and 32.0 ± 15.3 % , respectively, for the groups one to four, also with no difference among groups ($p > 0.05$). Likewise, complementary tests to assess the integrity and functionality of the plasma membrane showed no difference among treatments ($p > 0.05$). In conclusion, the use of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates added to the plasma sperm membrane did not demonstrate any additive effect on the increase and / or maintenance of sperm motility. In the experiment 2, ten boars of the Piau breed, previously approved as fertile by andrological examination, were used and the semen collections were carried out monthly for analysis during one year, evaluating motility, vigor, morphology, concentration / mL and total concentration. The protein profile of the seminal plasma was obtained by bidimensional electrophoresis, the image analyzes of the gels were performed by ImageMaster 2D Platinum 6.0 program (GE Healthcare®) and the identification of the proteins was obtained by mass

spectrometry using MALDI-TOF/TOF, with Mascot Daemon software for database search. The validation of the proteins identified among the treatments was performed by the SCAfold program (95 %). In the present study, it was observed that the seasons of the year influenced semen quality, and that in winter there was a greater change in sperm morphology than in summer, with more major and total sperm defects ($p < 0.05$), however these values are still within the seminal quality standards recommended for the species. Regarding progressive sperm motility, vigor and sperm concentration, they were not influenced by climatic seasons of the year ($p > 0.05$). Important proteins of the seminal plasma of Piau boars were identified and validated, especially the spermadines. Significant correlations were reported between seminal characteristics and some spots. Throughout the seasons, ten spots were observed as differentially abundant.

INTRODUÇÃO

Suínos de raças naturalizadas são oriundos de animais trazidos pelos europeus, apresentam características próprias de adaptação ao ecossistema brasileiro, representando fontes potenciais de novas variantes genéticas para a suinocultura e por isso a conservação dos mesmos é essencial (Sollero et al., 2006). Além da sua importância na economia de subsistência das camadas mais humildes na zona rural, têm destacada importância em eventuais cruzamentos visando aumentar a rusticidade de animais de linhagem comercial e derivados exclusivamente de raças estrangeiras (Irgang, 1986).

Muito esforço está sendo despendido, nos órgãos de pesquisa internacionais, no sentido de preservar e melhorar geneticamente as diferentes raças de animais, muitas das quais em via de extinção. Entretanto, a maioria dessas raças, por cruzamentos absorventes ou por substituição, deu lugar a outras que, por serem mais produtivas e melhoradas geneticamente, contribuíram para redução considerável das populações de animais nativos (Pereira, 2004).

A raça Piau é oriunda de suínos introduzidos pelos colonos portugueses no século XVI e sofreu influência de suínos holandeses e africanos (Vianna et al., 1985). Essa raça foi submetida à seleção pelo médico veterinário Antonio Teixeira Vianna em 1939, visando o desenvolvimento de um animal de dupla aptidão, ou seja, produção de carne e gordura (Gomes e D'Aulísio, 1980). As principais características da raça são rusticidade, adaptabilidade e resistência a determinadas doenças (Mariante et al., 2003), sendo considerada a melhor e mais importante raça naturalizada brasileira (Cavalcanti, 1984), agregando o maior número de estudos e trabalhos publicados (Garcia e Barbosa, 1994), e entre as raças suínas catalogadas como de alto risco de extinção é a única que ainda existe (Pereira, 2004). Barbosa et al. (1985) relataram que até meados da década 80, a maioria dos estudos referiam-se aos aspectos de desempenho reprodutivo das fêmeas, desenvolvimento ponderal dos leitões, qualidade de carcaça e tendências genéticas de algumas características produtivas e reprodutivas da raça. Veroneze et al. (2014) relataram que grupo de pesquisas em Genética e Melhoramento Animal da Universidade Federal de Viçosa está em constante avanço no estudo de deposição de gordura no Piau: mapeamento de QTL usando cruzamentos divergentes (Pires et al., 2005; Paixão et al., 2008; Silva et al., 2008), análise de polimorfismo de genes candidatos (Band et al., 2005; Faria et al., 2006; Peixoto et al., 2006),

análises de filogenia e diversidade genética (Sollero et al., 2009; Souza et al., 2009) e padrões de expressão de genes candidatos (Sousa et al., 2011; Sollero et al., 2011).

No âmbito da reprodução animal, os estudos em varrões da raça Piau ainda permanecem incipientes. França et al. (2000) estudaram a proliferação celular e mudanças hormonais durante o desenvolvimento da testis desde o nascimento até a fase adulta; Barros et al. (2012b) e Pinho et al. (2012) relataram as características qualitativas e quantitativa do sêmen e testes complementares; Pinho et al. (2013) estudaram o comportamento sexual; enquanto Barros et al. (2012a), Pinho et al. (2014) e Shiomi et al. (2015) testaram diferentes protocolos de criopreservação seminal. Porém os estudos sobre a composição bioquímica do sêmen e sazonalidade reprodutiva ainda não foram realizados. Portanto, o presente estudo tem como objetivo determinar o perfil proteômico do plasma seminal e sua correlação com os aspectos físicos do sêmen de animais da raça Piau ao longo das estações do ano.

REVISÃO DE LITERATURA

Sazonalidade influenciando nas características seminais

Observa-se que o clima tem influência sobre a qualidade do sêmen de diferentes espécies. Na Embrapa, verificou-se que na espécie caprina, em determinados períodos do ano não se consegue realizar o processamento do sêmen, ou seja, a baixa qualidade seminal não possibilita o congelamento do sêmen para armazenamento e transporte. Pesquisadores verificaram que, em determinados períodos, há alteração dos parâmetros bioquímicos do plasma seminal, especialmente na época seca (Pinheiro, 1996), principalmente com variações de proteínas de baixo e alto peso molecular e da atividade antioxidante do plasma seminal (Zasiadczyk et al., 2015).

Em touros das raças zebuínas, o vigor espermático diminui na época de seca, e na época chuvosa a concentração espermática se mostra reduzida (Anchieta et al., 2005).

Avaliando os parâmetros reprodutivos e fisiológicos de garanhões da raça Mangalarga Marchador, Waddington et al. (2017) concluíram que o padrão de secreção de testosterona não apresentou ritmo circadiano bem definido e as médias de concentração de testosterona não variaram entre as estações nos garanhões criados em ambiente tropical e de baixa latitude; além disso, aspectos reprodutivos não mostraram uma sazonalidade claramente definida, sugerindo que o desempenho reprodutivo dos garanhões é mantido constante ao longo do ano, nessas condições.

O suíno selvagem europeu possui reprodução sazonal no início do inverno e o nascimento dos leitões ocorre no final da primavera (Mauget, 1982). Apesar de produzir leitões ao longo do ano todo, a porca doméstica mostra uma redução na fertilidade no final do verão e início do outono (Love, 1981). A duração da luz do dia regula a reprodução em suínos selvagens (Popiolek et al., 2010), com sincronização suportada principalmente por meio da temperatura e quantidade de alimento (Kozdrowski e Dubiel, 2004). Realizando estudo com suínos selvagens e suínos domésticos (Yorkshire×Landrace), Tast et al. (2001) relataram que ambos reagem às alterações de fotoperíodo, modificando a secreção de melatonina, respondendo rapidamente a uma mudança de dias longos para dias curtos.

Sancho et al. (2004) estudaram o efeito de fotoperíodos naturais crescentes e decrescentes na qualidade seminal de varrões da raça Landrace, submetidos à temperatura controlada (18 a 21 °C) e umidade de 60 a 70 %, em região com clima temperado, na Espanha. Esses autores observaram que os varrões submetidos ao fotoperíodo decrescente apresentaram menor concentração e produção espermática, e conseqüentemente menor número de doses inseminantes produzidas em relação aos varrões submetidos ao fotoperíodo crescente. Não houve diferença em termos de motilidade e viabilidade espermática, porém houve maior frequência de espermatozoides imaturos com gota proximal no grupo exposto ao fotoperíodo decrescente, provavelmente devido à função testicular comprometida.

Temperatura, umidade, intensidade de luz e fotoperíodo são fatores sazonais que podem influenciar a reprodução (Kowalewski et al., 2016). Ejaculados obtidos de varrões de diferentes raças diferem em volume e concentração espermática (Ciereszko et al., 2000; Szostak et al., 2003; Szostak and Przykaza, 2011). O efeito da variação sazonal na frequência de anormalidades morfológicas nos espermatozoides depende da raça suína, devido a variações de sensibilidade ou adaptabilidade de cada raça em relação aos fatores sazonais (Concuera et al., 2002; Wysokińska et al., 2009).

Fotoperíodo é o principal fator ambiental que influencia os ciclos reprodutivos nas diversas espécies de mamíferos, induzindo mudanças no tamanho, peso e secreção testicular, produção espermática, atividade reprodutiva e fertilidade dos machos (Gundogan et al., 2005; Cardozo et al., 2006). Em espécies com reprodução sazonal, diferenças no fotoperíodo são detectadas pela glândula pineal, que por sua vez, libera a melatonina durante os períodos de escuridão. O padrão de liberação de melatonina regula a liberação pulsátil de GnRH do hipotálamo (Malpaux et al., 1999) e conseqüente liberação de gonadotrofinas (Peltoniemi e Virolainen, 2006). Sazonalidade também pode mudar a função secretória das glândulas

acessórias, e influenciar a quantidade de fluido produzido e a composição química do plasma seminal (Strzezek et al., 2000; Strzezek, 2002b). Mudanças no volume e composição do plasma seminal foram reportadas em carneiros (Pérez-Pe et al., 2001; Gundogan et al., 2005; Cardozo et al., 2006), bodes (La Falci et al., 2002), varrões (Trudeau et al., 1986; Strzezek, 2002b) e garanhões (Janett et al., 2003). Contudo, Dias et al. (2013) destacaram a grande importância da temperatura ambiental influenciando a produção espermática, constatando que a exposição testicular a altas temperaturas leva à redução de libido, qualidade seminal e da fertilidade e ao aumento no número de patologias espermáticas.

Plasma seminal

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação até a fertilização (Kraus et al., 2005). Secreções dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias compõe o plasma seminal, que não é apenas um veículo para os espermatozoides, mas também está envolvido em inúmeras atividades nos órgãos reprodutivos masculino e feminino. O plasma seminal possui concentrações abundantes de diferentes aminoácidos, péptidos, lipídios e ácidos graxos (Mann et al., 1981). As proteínas do plasma são importantes fisiologicamente para o sêmen e estão presentes na forma de complexos associados. A composição, a conformação e o tamanho dessas proteínas são específicos para cada espécie e elas são estáveis, dependendo das condições do sêmen (Jelínková et al., 2003). Essas proteínas possuem alta especificidade de ligação, podendo interagir tanto com polissacarídeos, fosfolipídios, lipoproteínas e íons bivalentes, como também com os receptores de membrana plasmática e da zona pelúcida (Manaskova et al., 2000).

A maior parte das proteínas encontradas no plasma seminal se liga à membrana plasmática dos espermatozoides, recobrando sua superfície e evitando aglutinação espermática, reação acrossômica prematura e fagocitose, protegendo os espermatozoides do ambiente hostil no órgão reprodutivo feminino (Jonakova e Ticha, 2003).

As proteínas adquiridas durante o trânsito epididimário podem ter diversas funções: modificar proteínas da membrana plasmática, expondo ou cobrindo receptores; atuar como proteínas livres no fluido epididimário, auxiliando na manutenção do meio; e aderir-se por meio de ligação fraca ou forte à membrana espermática, atuando na quiescência dos espermatozoides ou no processo de fertilização, respectivamente (Marengo et al., 2008). Proteínas do plasma seminal influenciam a capacitação, a reação acrossômica (Manjunath et

al., 2002), a motilidade espermática (Curi et al., 2003) e a integridade genotípica (Chen et al., 2002), atuando na proteção espermática contra injúrias, na manutenção da longevidade espermática (Novak et al., 2010), e na formação do reservatório espermático no trato reprodutivo feminino (Troedsson et al., 2005; Mogielnicka-Brzozowka et al., 2011). Por isso, a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies, pela identificação dos polipetídeos, pode fornecer elementos para a certificação da fertilidade e da congelabilidade do sêmen (Killian et al., 1993; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2007).

Garcia et al. (2014) mensuraram a concentração das principais proteínas do plasma seminal em ganhões (HSP-1 e HSP-2) por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência e constataram que essa concentração foi maior em ejaculados de ganhões de baixa fertilidade, podendo assim, ser indicada como biomarcador da baixa fertilidade em ganhões.

O Fator de Crescimento 1 semelhante a insulina (IGF-I), presente no plasma seminal equino e bovino, influencia na qualidade dos espermatozoides em relação à motilidade, vigor e morfologia espermática (Henricks et al., 1998; Macpherson et al., 2002). Foi verificada participação do IGF-I na maturação e capacitação espermática no trato reprodutivo feminino, no oviduto (Smith, 1998; Suarez, 1998). Silva (2010) verificou que a adição de 100 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno resfriado e de 150 ng/mL ao sêmen descongelado proporciona melhoria nos parâmetros seminais.

As características da superfície de espermatozoides ejaculados são adquiridas durante a maturação nos epidídimos e também pela adsorção de componentes do plasma seminal, durante a ejaculação (Amann et al., 1993); esses componentes são principalmente glicoproteínas, que aumentam os resíduos de sacarídeos na superfície espermática durante a maturação (Magargee et al., 1988). Algumas dessas proteínas plasmáticas poderão se constituir em marcadores bioquímicos que permitirão a identificação de indivíduos com maior ou menor potencial de fertilidade e congelabilidade do sêmen (Strzešek et al., 2002a). Neste contexto, Corcini et al. (2008) identificaram uma proteína de 28 kDa como um possível marcador para uma motilidade espermática de machos suínos e Pigozzo et al. (2008) verificaram em seu estudo que a presença da proteína de 22 kDa melhorou a integridade de membrana de espermatozoides suínos criopreservados, observando uma grande variação entre os machos estudados com relação à composição protéica do plasma seminal.

Quatro potenciais marcadores de fertilidade foram identificados no plasma seminal suíno. Duas proteínas (55 kDa, pI 4,8) e 26 kDa, pI 6,2) apresentaram correlação positiva

com fertilidade, sendo que altas concentrações das mesmas foram correlacionadas positivamente com capacidade fecundante do sêmen tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com a porcentagem de fertilização e número de leitões nascidos vivos por leitegada (Flowers, 2001; Flowers, 2009). Além de funções regulatórias no processo de fertilização, o plasma seminal parece ter atuação importante na supressão da resposta inflamatória causada pela rápida leucocitose após a deposição do sêmen nos órgãos genitais femininos.

A proteômica representa uma excelente ferramenta para avaliar os mecanismos moleculares regulando a função espermática, possivelmente elucidando o conhecimento sobre a fertilidade/ infertilidade do macho (Rahman et al., 2013). A proteômica por eletroforese bidimensional permite avaliar diferentes formas proteicas que podem atuar diferentemente no metabolismo reprodutivo (Magalhães Jr. et al, 2016). A investigação proteômica do plasma seminal nas diversas espécies é crescente, visto que pode servir como ferramenta no diagnóstico de falhas no processo de espermatogênese, mas ainda não há estudos publicados com a raça Piau associando a proteômica ao estudo da sazonalidade.

Criopreservação de sêmen suíno

No âmbito da formação de bancos de germoplasma, que é uma estratégia interessante para a raça Piau, a criopreservação seminal é uma biotécnica que se apresenta como importante ferramenta para a manutenção desse recurso genético (Andrabi e Maxwell, 2007). Entretanto, o êxito da criopreservação de sêmen é dependente de diversos fatores, incluindo a qualidade do ejaculado, protocolo de congelamento escolhido e diluentes utilizados (Johnson et al., 2000; Holt et al., 2005).

Apesar da tecnologia de congelamento de sêmen na espécie suína ter sido iniciada em 1975, com vários estudos conduzidos desde essa data, ainda não é empregada comercialmente por apresentar índices de fertilidade menores que o sêmen resfriado. Acredita-se que a diferença de sensibilidade espermática ao choque térmico, observada entre as espécies domésticas, está relacionada com a composição lipídica de membrana. Além disso, a criopreservação de espermatozoides na espécie suína está associada a modificações do conteúdo lipídico (fosfolipídeos, ácidos graxos e triglicéridos) e conseqüentemente em alterações na fluidez de membrana (Watson, 1981; Woelders, 1997; Levis, 2000).

As ciclodextrinas podem incorporar compostos hidrofóbicos, como o colesterol. Eles transportam o colesterol abaixo do gradiente de concentração da membrana plasmática celular, para dentro da região hidrofóbica durante a incubação da cultura celular (Zidovetzki et al., 2007), resultando em um aumento nos níveis de colesterol de membrana (Purdy et al., 2004; Moore et al., 2005; Mocé et al., 2010). Esta remoção de colesterol causa alterações na estrutura e funcionalidade da membrana (Atger et al., 1997; Moraes et al., 2010). Quando as ciclodextrinas são incubadas com espermatozoides, medeiam a capacitação de indução do colesterol (Visconti et al., 1999; Mocé et al., 2010a). Os conjugados de colesterol carregados com ciclodextrina foram utilizados para aumentar os rendimentos em sêmen de bovinos (Purdy et al., 2004; Mocé et al., 2006; Amorim et al., 2009; Moraes et al., 2010), de equinos (Moore et al., 2005; Torres et al., 2006; Spizziri et al., 2010), de pequenos ruminantes (Mocé et al., 2010b) e de suínos (Zeng et al., 2001; Mao et al., 2005; Galantino et al., 2006; Tomás et al., 2011; Blanch et al., 2012).

JUSTIFICATIVA

A crescente busca pela otimização nas técnicas de inseminação artificial e avanços nas pesquisas de criopreservação de sêmen em suínos acarreta em aumento do interesse de pesquisadores na identificação e controle de fatores que influenciam a qualidade do sêmen nos cachaços.

A caracterização do perfil sazonal do sêmen suíno da raça Piau por meio de análises proteômicas pode ser um importante salto na pesquisa e na condução de trabalhos de conservação do germoplasma desta espécie, já que não há nenhum relato na literatura pesquisada envolvendo efeito sazonal sobre a qualidade seminal e composição proteica (proteômica) do plasma seminal dessa raça local. Esse estudo pode contribuir na otimização do potencial biológico reprodutivo pelo mapeamento de biomarcadores de fertilidade.

O espermatozoide suíno apresenta maior sensibilidade ao estresse térmico em relação às demais espécies, devido à sua constituição de membrana. Pesquisas no âmbito de formação de bancos de germoplasmas são necessárias para a conservação de raças de interesse, e avanços na área de criopreservação de sêmen são cruciais para isso.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Estudar as características físicas e proteômicas do sêmen de suínos nativos Brasileiro, que possibilitem estudos posteriores para integração da raça Piau em programas estratégicos de Melhoramento Animal ou programas de estudo genômico na espécie suína.

Contribuir para a formação de banco de germoplasma de suínos da raça Piau por meio de pesquisa em criopreservação seminal.

Objetivos Específicos

Verificar se há efeito da sazonalidade sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de varrões da raça Piau;

Identificar proteínas diferencialmente abundantes nas diferentes estações do ano;

Determinar o perfil proteômico do plasma seminal e sua correlação com os aspectos físicos e morfológicos do sêmen de animais da raça Piau ao longo das estações do ano;

Investigar o efeito da adição de conjugados de colesterol carregados com ciclodextrina no diluente de congelamento durante o processo de criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. The epididymis and sperm maturation - a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.361-381, 1993.

AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; TORRES, C.A.A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.58, p.210-214, 2009.

ANCHIETA, M.C.; VALE FILHO, V.R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I.B.M.; ANDRADE, V.J. Descarte e congelabilidade de sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.196-204, 2005.

ANDRABI, S.M.H. AND MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

ATGER, V.M.; MOYA, M.; STOUDET, G.W.; RODRIGUEZ, W.V.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.773-789, 1997.

BAND, G.O; GUIMARÃES, S.E.F; LOPES, P.S.; SCHIERHOLT, A.S.; SILVA, K.M.; PIRES, A.V.; BENEVENUTO JR., A.A. AND GOMIDE, L.A.M. Relationship between the porcine stress syndrome gene and pork quality trait in F2 pigs resulting from divergent crosses. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.88-91, 2005.

BARBOSA, H.P.; PEREIRA J.A.A.; COSTA, P.M.A. Exigências de proteína bruta para leitões na fase inicial de crescimento (5 a 15 kg de peso vivo). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.14, p.45-52, 1985.

BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L. S.; GUIMARAES, S. E. F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARAES, J.D. Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau (Sus scrofa) submetido a três protocolos de congelamento. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.41, p.914-922, 2012a.

BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, R.O.; PEREIRA, J.V.T.N.; GUIMARÃES, JD. Características quantitativas e qualitativas do sêmen in natura de suínos da raça Piau. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, p. 1-17, 2012b.

BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K.; MOCE, E. Response of Boar Sperm to the Treatment with Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Added Prior to Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.959-964, 2012.

CAVALCANTI, S.S. **Produção de Suínos**. Campinas, SP: Instituto Campeiro de Ensino Agrícola, 453p, 1984.

CARDOZO, J.; FERNANDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ J. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v.66, p.841–850, 2006.

CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v.124, p.491-499, 2002.

CIERESZKO, A.J.S.; OTTOBRE, J.S.; GŁOGOWSKI, J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.89–96, 2000.

CORCINI, C.D.; REMPEL, F.J.K.; PIGOZZO, R.; MOREIRA, F.; VARELA JÚNIOR, A.S.; GOULARTE, K.L.; BRUM, V.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA JR., T. Identificação de um fator de 28 KDa no plasma seminal associado à motilidade espermática de machos suínos. **Anais... 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado/ RS, 359-1, outubro de 2008.

CORCUERA, B.D.; HERNANDEZ-GIL, R.; DE ALBA ROMERO, C.; MARTIN RILLO, S. Relationship of environment temperature and boar facilities with seminal quality. **Livestock Production Science**, v.74, p.55-62, 2002.

CURI, S.M.; ARIAGNO, J.I.; CHENLO, P.H. Asthenozoospermia: analysis of a large population. **Archives of Andrology**, v.49, p.343-349, 2003.

DIAS, A. V. **Ação de substâncias antioxidantes e a influência da ambiência sobre a qualidade do sêmen suíno**, 91f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; PAIVA, S.R.; SOLLERO, B.P. AND WENCESLAU, A.A. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634-640, 2006.

FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**, 2001.

FLOWERS, W.L. Selection for boar fertility and semen quality – the way ahead. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v.66, p.67-78, 2009.

FRANÇA, L.R.; SILVA, V.A.Jr.; CHIARINI-GARCIA, H.; GARCIA, S.K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during post natal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v.63 (6), p.1629-1636, 2000.

GALANTINO-HOMER, H.L.; ZENG, W.; MEGEE, S.O.; DALLMEYER, M.; VOELKL, D.; DOBRINSKI, I. Effects of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin and Cholesterol on Porcine Sperm Viability and Capacitation Status Following Cold Shock or Incubation. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.638-650, 2006.

GARCIA, L.D.L.; BRITO, E.L.R.; SERPA, P.; GREGORY, J.; NATALINI, C.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M. Horse seminal plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? **Pferdeheikunde**, v.30, p.557-560, 2014.

GARCIA, S.K.; BARBOSA, A.S. Características etiológicas, biométricas e seminais de varrões da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.279-289, 1994.

GOMES, M.B., D'AULÍSIO, S.H.G. Estudo da prolificidade da raça suína piau. Anais da ESA "Luiz de Queiroz", v. XXXVIII, 1980.

GUNDOGAN, M.; SERTESER, M. Some reproductive parameters and biochemical properties in Akkaraman and Awassirams. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.29, p.595–599, 2005.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; BOONE, W.R.; GRAY, S.L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v.59, n.2, p.330-337, 1998.

HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Theriogenology**, v.63(2), p.370-82, 2005.

IRGANG, R. Suínos de raças nativas: o interesse da pesquisa. **Suinocultura Industrial**, v.87, p.13-20, 1986.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.213–221, 2003.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biology Macromolecular**, v.32, p.99-107, 2003.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, p. 255-266, 2004.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143–172, 2000.

JONAKOVA, V.; TICHA, M. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. A review. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v.69, p.461-475, 2003.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KOWALEWSKI, D.; KONDRACKI, S.; GÓRSKI, K.; BAJENA, M.; WYSOKIŃSKA, A. Effect of piggery microclimate on ejaculate performance of artificial insemination boars. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.22, p.225-232, 2016.

KOZDROWSKI, R.; DUBIEL, A. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.281-289, 2004.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNICOVÁ, J.; JONÁKOVÁ, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, p.33-46, 2005.

LA FALCI V.S.N, TORTORELLA H, RODRIGUES JL, BRANDELLI A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v.57, p.1035–1048, 2002.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: International conference on boar semen preservation. 4., beltsville, maryland usa. **Proceedings...** Lawrence : Allen, p.121-128, 2000.

LOVE, R.J. Seasonal infertility in pigs. **Veterinary Record**, v.109, p.407–409, 1981.

MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.; SIMMEN, F.A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B.R.; VARNER, D.D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M.E.; MILLER, C.D.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T.L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and 5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.7, n.2, p.648-654, 2002.

MAGALHÃES JR, M.J.; MARTINS, L.F.; SENRA, R.L.; SANTOS, T.F.; OKANO, D.S.; PEREIRA, P.R.G.; FARIA-CAMPOS, A.; CAMPOS, S.V.A.; GUIMARÃES, J.D.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Differential abundances of four forms of Binder of SPerm 1 in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with different patterns of semen freezability. **Theriogenology**, xxx, p.1–12, 2016.

MAGARGEE, S.F.; KUNZE, E.; HAMMERSTED, R.H. Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. **Biology of Reproduction**, v.38, p. 667-685, 1988.

MALPAUX B.; THIERY, J.C.; CHEMINEAU, P. Melatonin and the seasonal control of reproduction **Reproduction Nutrition Development**, v.39, p.355-366, 1999.

MANASKOVA, P.; LIBERDA, J.; TICHA, M.; JONÁKOVÁ, V. Aggregated and Monomeric Forms of Proteins in Boar Seminal Plasma: Characterization and Binding Properties. **Folia Biologica**, v.46, p. 143-151, 2000.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109-119, 2002.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male Reproductive Function and Semen. **Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology**, Online ISBN 978-1-4471-1300-3/ DOI <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-1300-3>, 1981.

MAO, J.; W.U, G.; PRATHER, R.S.; SMITH, M.F.; CANTLEY, T.; RIEKE, A.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effect of methyl- β -cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. **Theriogenology**, v.64, p.1913-1927, 2005.

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

MARIANTE, A.S.; CASTRO, S.T.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PAIVA, S.R. AND GEMANO, J.L. Pig biodiversity in Brazil. **Archivos de Zootecnia**, v.52, p.245-248, 2003.

MAUGET, R. Seasonality of reproduction in the wild boar. In: Cole, D.J.A., Foxcroft, G.R. Eds., **Control of Pig Production**. Butterworth, London, p.509–526, 1982.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45 (2), p.57-66, 2010a.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.48, p.826-833, 2006.

MOCÉ, E.; PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival **Animal Reproduction Science**, v.118, p.236-247, 2010b.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; KORDAN, W. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.14, p.489-99, 2011.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241-249, 2005.

MORAES, E.A.; GRAHAM, J.K.; TORRES, C.A.A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.148-154, 2010.

MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.169-188, 2007.

NOVAK, S.; SANCHEZ, A.R.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K. Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars. **Journal of Andrology**, v.31, p.188-200, 2010.

PAIXÃO, D.M.; SILVA FILHO, M.I.; PEREIRA, M.S.; LOPES, M.S.; BARBOSA, L.; SOUZA, K.R.S.; LOPES, P.S. AND GUIMARÃES, S.E.F. Detection of quantitative trait loci on chromosomes 16, 17 and 18 for carcass, internal organs and meat quality traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.98-901, 2008.

PEIXOTO, J.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SOARES, M.A.M.; PIRES, A.V.; BARBOSA, M.V.G.; TORRES, R.A.; SILVA, M.A. Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.123, p.378-383, 2006.

PELTONIEMI, O.A.T.; VIROLAINEN, J.V. Seasonality of reproduction in gilts and sows. **Society of Reproduction and Fertility**, v.62, p.205-218, 2006.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**, 4 ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004.

PÉREZ-PE, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁ-PÉREZ, J.A. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.760, p.113-121, 2001.

PIGOZZO R, CORCINI CD, VARELA JUNIOR AS, DESCHAMPS JC, LUCIA TJR. Relação entre a proteína com 22 KDa no plasma de sêmen suíno com a integridade de membrana. **In: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas**, 2008.

PINHEIRO, R.R.; MACHADO, R.; PINHEIRO, A.A.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. **In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 1996. FORTALEZA, CE, p.416-18, 1996.

PINHO, R.O.; LIMA, D.M.A.; SHIOMI, H.H.; SIQUEIRA, J.B.; SILVA, H.T.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Effect of different cryo-protectants on the viability of frozen/thawed semen from boars of the Piau breed. **Animal Reproduction Science**, v.146, p.187-192, 2014.

PINHO, R.O.; SHIOMI, H.H.; LIMA, D.M.A.; COSTA, E.V.; CHAYA, A.Y.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Sexual behavior and seminal quality of Piau boars. **Jornal of Veterinary Behavior**, v.8, p.357-361, 2013.

PINHO, R.O.; SHIOMI, H.H.; LIMA, D.M.A.; COSTA, E.V.; SANTOS, M.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.245-249, 2012.

PIRES, A.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, C.T.; GOMIDE, L.A.M.; BENEVENUTO JR., A.A. AND CARMO, F.M.S. Quantitative trait loci mapping for meat quality traits in swine chromosome 6. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.608-615, 2005.

POPIOLEK, M., KNECHT, D., SZCZĘSNA-STASZKIEWICZ, J.; CZERWIŃSKA-ROZALOW, A. Helminths of the wild boar (*sus scrofa* L.) in natural and breeding conditions. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.54, p.161-166, 2010.

PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of Cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.48, p.36-45, 2004.

RAHMAN, M.S.; LEE, J.S.; KWON, W.S.; PANG, M.G. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. **International Journal of Endocrinology**, v.8, 11p., Article ID 360986, 2013.

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. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. **Theriogenology**, v.62, p.1271-1282, 2004.

SHIOMI, H.H.; PINHO, R.O.; LIMA, D.M.A.; SIQUEIRA, J.B.; SANTOS, M.C.R.; COSTA, E.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Cryopreservation of Piau-Breed Wild Boar Sperm: Assessment of Cooling Curves and Centrifugation Regimes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50 (4), p.545-53, 2015.

SILVA, D.M. **Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e sua importância na utilização após o resfriamento e congelamento do sêmen**. Lavras: UFLA, 78p. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SILVA, K.M.; PAIXÃO, D.M.; SILVA, P.V.; SOLLERO, B.P.; PEREIRA, M.S.; LOPES, P.S. AND GUIMARÃES, S.E.F. Mapping of quantitative trait loci and confirmation of the FAT1 region on chromosome 4 in an F2 population of pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.475-480, 2008.

SMITH, T.T. The modulation of sperm function by oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, v.58, n.5, p.1102-1104, 1998.

SOLLERO, B.P., et al. Estrutura genética de cinco raças naturalizadas e comerciais de suínos do Brasil, João Pessoa, PB, 2006. **In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, 2006.

SOLLERO, B.P.; GUIMARÃES, S.E.F.; RILINGTON, V.D.; TEMPELMAN, R.J.; RANEY, N.E.; STEIBEL, J.P.; GUIMARÃES, J.D.; LOPES, P.S.; LOPES, M.S. AND ERNST, C.W. Transcriptional profiling during fetal skeletal muscle development of Piau and Yorkshire-Landrace cross-bred pigs. **Animal Genetics**, v.42, p. 600-612, 2011.

SOLLERO, B.P.; PAIVA, S.R.; FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; CASTRO, S.T.R.; EGITO, A.A.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PIOVESAN, U.; BERTANI, G.R. AND MARIANTE, A.S. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, v.123, p.8-15, 2009.

SOUSA, K.R.S.; RIBEIRO, A.M.F.; GOES, P.R.N.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; VERONEZE, R.; GASPARINO, E. Toll-like receptor 6 differential expression in two pig genetic groups vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **BMC Proc**, 5 (Suppl 4): S9, 2011.

SOUZA, C.A.; PAIVA, S.R.; PEREIRA, R.W.; GUIMARÃES, S.E.F.; DUTRA JR., W.M.; MURATA, L.S. AND MARIANTE, A.S. Iberian origin of Brazilian local pig breeds based on Cytochrome b (MT-CYB) sequence. **Animal Genetics**, v.40, p.759-762, 2009.

SPIZZIRI, B.E.; FOZ, M.H.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.255-264, 2010.

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, SAIZ-CIDONCHA F, WYSOCKI P, TYSKIEWICZ A, JASTRZĘBSKI. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports**, v. 22, p.255-266, 2002a.

STRZEZEK, J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. **Reproductive Biology**, v.2, p.243–266, 2002b.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1105-1107, 1998.

SZOSTAK, B. The effect of genotype, age of boar and season of use on the selected qualities of ejaculates. **Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego**, v.68 (2), p.147–155, 2003.

SZOSTAK, B.; PRZYKAZA, L. The influence of breed, age of boars and exploitation season on their libido in conditions of the insemination station. **Journal Central European Agriculture**, v.12 (1), p. 124-134, 2011.

TAST, A.; H; ALLI, O.; AHLSTROM, S.; ANDERSSON, H.; LOVE, R. J.; PELTONIEMI, O. A. T. Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt. **Journal of Pineal Research**, v.30, p.43-49, 2001.

TOMÁS, C.; BLANCH, E.; HERNÁNDEZ, M.; GIL, M.A.; ROCA, J; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A.; MOCE, E. Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilising ability. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.209-220, 2011.

TORRES, P.; SERRES, C.; GÓMEZ-CUÉTARA, C.; SANTIAGO, I.; MATEOS, E. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.148-151, 2006.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-86, 2005.

TRUDEAU, V.; SANFORD, L.M. The influence of season and social-environment on the semen composition of adult landrace boars. **Canadian Journal of Animal Science**, v.66, p.337–338, 1986.

VIANNA, A.T. **Os suínos**. Editora Nobel. São Paulo, Brazil, 1985.

VERONEZE, R.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.V.; FARIA, V.R.; COSTA, K.A. Using pedigree analysis to monitor the local piau pig breed conservation program. **Archivos de Zootecnia**, v 63 (241), p.45-54, 2014.

VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X.; MOORE, G.D.; VALENZUELA, J.P.; JORGEZ, C.J. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.3235-3242, 1999.

WADDINGTON, B.; PENITENTE-FILHO, J.M.; NEVES, J.G.S.; PINHO, R.O.; CHAYA, A.Y.; MAITAN, P.P.; SILVEIRA, C.O.; NEVES, M.G.; GUIMARÃES, S.E.F.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D. Testosterone serum profile, semen characteristics and testicular biometry of Mangalarga Marchador stallions in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p.335–343, 2017.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. **Academic Press**, p.189-218, 1981.

WOELDERS, H. Overview of in methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v.1, p.145-164, 1991.

WYSOKIŃSKA, A.; KONDRACKI, S.; KOWALEWSKI, D.; ADAMIAK, A.; MUCZYŃSKA, E. Effect of seasonal factors on the ejaculate properties of crossbred Duroc × Pietrain and Pietrain × Duroc boars. **Bulletin Of The Veterinary Institute In Pulawy**, v.53, p.677-685, 2009.

ZASIADCZYK L.; FRASER ,L.; KORDAN, W.; WASILEWSKA, K. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates, **Theriogenology**, v.83 (8), p.1287-1303, 2015.

ZENG, W.; TERADA, T. Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin on Cryosurvival of Boar Spermatozoa , **Journal of Andrology**, v.22, p.111-118, 2001.

ZIDOVETZKI, R.; LEVITAN, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.6, p.1311-1324, 2007.

**CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS SAZONAIS DO SÊMEN DE SUÍNOS DA
RAÇA PIAU**

RESUMO

SHIOMI, Hugo Hideki, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2018. **CARACTERÍSTICAS SAZONAIS DO SÊMEN DE SUÍNOS DA RAÇA PIAU.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Maria Cristina Baracat Pereira, Rogério Oliveria Pinho e Eduardo Paulino da Costa.

Com o presente estudo, objetivou-se verificar o efeito da sazonalidade no perfil proteômico do plasma seminal e nas características físicas e morfológicas do sêmen. Foram utilizados dez varrões da raça Piau, aprovados previamente como férteis por exame andrológico. As coletas de sêmen foram realizadas mensalmente para análise, durante o período de um ano, avaliando motilidade, vigor, morfologia, concentração espermática/ mL e concentração espermática total. O perfil protéico do plasma seminal foi obtido por eletroforese bidimensional, as análises de imagem dos géis foram realizadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6,0 (GE Healthcare®) e a identificação das proteínas foi por espectrometria de massas usando MALDI-TOF/TOF, com o software Mascot Daemon para a busca em banco de dados. A validação das proteínas identificadas entre os tratamentos foi realizada pelo programa SCAFOLD (95 %). No presente estudo observou-se que as estações climáticas do ano influenciaram a qualidade do sêmen, e que no inverno houve maior alteração na morfologia espermática em relação ao verão, com mais defeitos espermáticos maiores e totais ($p < 0,05$), porém esses valores ainda se mostram dentro dos padrões de qualidade seminal preconizados para a espécie. Em relação à motilidade espermática progressiva, vigor e concentração espermática, não sofrem influência das estações climáticas do ano ($p > 0,05$). Importantes proteínas do plasma seminal de varrões da raça Piau foram identificadas e validadas, destacando-se as espermadesinas. Foram reportadas correlações significativas entre as características seminais e alguns spots. Ao longo das estações do ano, dez spots foram observados como diferencialmente abundantes.

INTRODUÇÃO

Suíños de raças naturalizadas são oriundos de animais trazidos pelos europeus, apresentam características próprias de adaptação ao ecossistema brasileiro, representando fontes potenciais de novas variantes genéticas para a suinocultura e por isso a conservação das mesmas é essencial (Sollero et al. 2006). Além da sua importância na economia de subsistência das camadas mais humildes na zona rural, têm destacada importância em eventuais cruzamentos futuros visando aumentar a rusticidade de animais de linhagem comercial e derivados exclusivamente de raças estrangeiras (Irgang, 1986).

Muito esforço está sendo despendido pelos órgãos de pesquisa internacional, no sentido de preservar e melhorar geneticamente as diferentes raças de animais, muitas das quais em via de extinção. Entretanto, a maioria dessas raças, por cruzamentos absorventes ou por substituição, deu lugar a outras que, por serem mais produtivas e melhoradas geneticamente, contribuíram para a redução apreciável das populações de animais nativos (Pereira, 2004).

A raça Piau é considerada a melhor e mais importante raça naturalizada brasileira (Cavalcanti, 1984), sendo a que agrega o maior número de estudos e trabalhos publicados (Garcia e Barbosa, 1994), e entre as raças suínas catalogadas como de alto risco de extinção é a única que ainda existe (Pereira, 2004). A maioria desses estudos refere-se aos aspectos de desempenho reprodutivo das fêmeas, desenvolvimento ponderal dos leitões, qualidade de carcaça e tendências genéticas de algumas características produtivas e reprodutivas da raça (Barbosa et al., 1985). Entretanto, diante das vantagens oferecidas pelas raças especializadas estrangeiras, as raças nativas foram colocadas em segundo plano de importância, de modo que a maioria das referências inerentes às raças nativas atualmente eram antigas e escassas. Recentemente, Barros et al. (2012b) e Pinho et al. (2012) relataram as características qualitativas e quantitativa do sêmen e testes complementares; Pinho et al. (2013) estudaram o comportamento sexual; enquanto Barros et al. (2012a), Pinho et al. (2014) e Shiomi et al. (2015) testaram diferentes protocolos de criopreservação seminal. Porém os estudos sobre a composição bioquímica do sêmen e sazonalidade reprodutiva nessa raça ainda não foram realizados.

Funções e características dos espermatozoides que podem ser influenciadas por proteínas do plasma seminal incluem a capacitação e a reação acrossômica (Manjunath e Thérien, 2002), bem como a motilidade espermática (Curi et al., 2003), e a integridade

genotípica (Chen et al., 2002). Por isso, a caracterização de proteínas presentes no plasma seminal de diferentes espécies, pela identificação dos polipetídeos, pode fornecer elementos para a certificação da fertilidade e da congelabilidade do sêmen (Killian et al., 1993; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2007).

Vários fatores influenciam no desempenho reprodutivo do animal: dieta, sanidade, escore corporal, latitude, temperatura e umidade relativa do ar. Na espécie caprina, em estudo na Central de Inseminação da Embrapa, verificou-se que em determinados períodos do ano não se consegue realizar o processamento do sêmen e que há variação dos parâmetros bioquímicos do plasma seminal, especialmente na época seca (Pinheiro, 1996), demonstrando a importante influência da sazonalidade na qualidade seminal nessa espécie.

Em relação à espécie bovina, no Brasil, Koivisto et al. (1998) relataram maior percentual de espermatozoides anormais perante altas temperaturas e umidade relativa do ar, e Silva et al. (2009) observaram animais da raça Nelore e animais mestiços Nelore X Simental e Chianina X Nelore e constataram maior volume dos ejaculados, motilidade e vigor espermático na época de chuvas. Kastelic et al. (1996) relatam que a redução da motilidade espermática progressiva, a queda da produção espermática e a elevação da porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas são causadas pelo estresse térmico nos testículos. A interação ambiente-espermatogênese resulta na habilidade dos touros para produzir sêmen (Taylor et al., 1985).

Avaliando os parâmetros reprodutivos e fisiológicos de garanhões da raça Mangalarga Marchador, Waddington et al. (2017) concluíram que o padrão de secreção de testosterona não apresentou ritmo circadiano bem definido e as médias de concentração de testosterona não variaram entre as estações nos garanhões criados em ambiente tropical e de baixa latitude; além disso, aspectos reprodutivos não mostraram uma sazonalidade claramente definida, sugerindo que o desempenho reprodutivo dos garanhões é mantido constante ao longo do ano, nessas condições.

Garcia et al. (2014) mensuraram a concentração das principais proteínas do plasma seminal em garanhões (HSP-1 e HSP-2) por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência e constataram que essa concentração foi maior em ejaculados de garanhões de baixa fertilidade, podendo assim, ser indicada como biomarcador da baixa fertilidade em garanhões.

Nas pesquisas da biotecnologia há muitos estudos de plasma seminal, que é um fluido com papel essencial para funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação, até a fertilização (Kraus et al., 2005; Bianchi et al., 2008; Cadavid, 2014;). As proteínas do plasma são

importantes fisiologicamente para o sêmen e estão presentes na forma de complexos associados. A composição, a conformação e o tamanho dessas proteínas são específicos para cada espécie e elas são estáveis, dependendo das condições do sêmen (Jelínková et al., 2003).

O IGF-I é uma proteína presente no plasma seminal das espécies equina e bovina, atuando na motilidade, vigor e morfologia espermática (Henricks et al., 1998; Macpherson et al., 2002). Foi verificada participação do IGF-I na maturação e capacitação espermática na tuba uterina (Smith, 1998; Suarez, 1998). Houve melhora nos parâmetros seminais com a adição de 100 ng/mL de IGF-I ao sêmen suíno resfriado e de 150 ng/mL de IGF-I ao sêmen descongelado (Silva et al., 2010).

Algumas dessas proteínas plasmáticas podem se constituir em marcadores bioquímicos que permitam identificar indivíduos com maior ou menor potencial de fertilidade e congelabilidade do sêmen (Strzešek et al., 2002). Neste contexto, Corcini et al. (2008) identificaram uma proteína de 28 kDa como um possível marcador para uma motilidade espermática de machos suínos e Pigozzo et al. (2008) verificaram em seu estudo que a presença da proteína de 22 kDa melhorou a integridade de membrana de espermatozoides suínos criopreservados, havendo uma grande variação entre os machos estudados com relação a composição protéica do plasma seminal.

Quatro potenciais marcadores de fertilidade foram identificados no plasma seminal suíno. Duas proteínas (55 kDa, pI 4,8) e 26 kDa, pI 6,2) apresentaram correlação positiva com fertilidade, sendo que altas concentrações das mesmas foram correlacionadas positivamente com capacidade fecundante do sêmen tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com a porcentagem de fertilização e número de leitões nascidos vivos por leitegada (Flowers, 2001; Flowers, 2009). Além de funções regulatórias no processo de fertilização, o plasma seminal parece ter atuação importante na regulação da resposta imune uterina (Campanero-Rhodes et al., 2005).

A proteômica representa uma excelente ferramenta para avaliar os mecanismos moleculares regulando a função espermática, possivelmente elucidando o conhecimento sobre a fertilidade / infertilidade do macho (Rahman et al., 2013). A investigação proteômica do plasma seminal nas diversas espécies é crescente, visto que pode servir como ferramenta no diagnóstico de falhas no processo de espermatogênese, mas ainda foi pouco explorada na raça Piau associada ao estudo da sazonalidade.

A caracterização do perfil sazonal do sêmen suíno da raça Piau por meio de análises proteômicas é de extrema importância, já que não há nenhum relato na literatura sobre proteômica do plasma seminal dessa raça nativa. Esse estudo pode contribuir na otimização do potencial biológico reprodutivo pelo mapeamento de biomarcadores de fertilidade. Considerando o exposto acima, o presente estudo teve como objetivo verificar se há efeito da sazonalidade e definir o perfil proteômico e sua relação com a qualidade física e morfológica do sêmen de animais da raça Piau ao longo de diferentes estações do ano.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 85/2015, no dia 08/04/2016. O experimento apresentou duas etapas: uma etapa de coleta de sêmen e avaliações espermáticas e a outra de análise proteômica do plasma seminal.

A etapa de coletas de sêmen e avaliações espermáticas foi realizada na Granja de Melhoramento Genético de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado na cidade de Viçosa, região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais/Brasil, durante as avaliações andrológicas de rotina da granja. O município está localizado a 20°45'45" latitude Sul e 42°52'04" a Oeste de Greenwich, altitude média é de 690 m, temperatura média anual de 20,9°C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo cwa (inverno frio e seco e verão quente e chuvoso) pela classificação de Köeppen. As análises proteômicas do plasma seminal foram realizadas no Núcleo de Análise de Biomoléculas, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- CCB/ UFV e no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

Animais

Foram utilizados dez varrões da raça Piau, com idades variando de 9,3 a 81,9 meses, aprovados previamente como férteis por exame andrológico, sendo divididos em quatro categorias de acordo com a idade na qual o ejaculado foi coletado (categoria 1= 9,3-11,7; categoria 2= 12,4 a 23,9; categoria 3= 24,4 a 35,8 e categoria 4 = 63 a 81,9 meses de idade) para análises do efeito da idade. As coletas de sêmen foram realizadas mensalmente para

análise, durante o período de um ano, com o intuito de caracterizar o perfil seminal durante as quatro estações do ano. Os animais foram submetidos ao regime de alimentação (manejo de manutenção) e controle sanitário de acordo com o manejo de rotina da granja, sendo alojados individualmente em baias (10 m²) e com água *ad libitum*, com bebedouro modelo chupeta fixado no interior da baia.

Antes do início das coletas de amostras para análise, todos os varrões foram submetidos a três coletas de sêmen durante uma semana, intercaladas por dois dias, para esgotamento da reserva espermática extra-gonádica (Pickett et al.,1987).

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando o método da estimulação com a mão enluvada (Hancock e Hovell, 1959) com auxílio de um manequim de madeira ou uma fêmea em estro normal, ocasionalmente, quando o varrão não se interessava pelo manequim (nesse caso, a fêmea não sofria nenhum estresse, já que estava no período fisiológico para aceitar a monta do macho). A fração rica de espermatozoides foi coletada em copos plásticos descartáveis de 700 mL, devidamente esterilizados, protegidos em embalagens térmicas previamente aquecidas a 37 °C, com dupla camada de gase, fixada ao copo com barbante, para reter a fração gelatinosa do sêmen. Posteriormente, o sêmen foi mantido em banho-maria, a 37 °C, para avaliação das análises laboratoriais de motilidade espermática progressiva (MOT), vigor espermático (VIG) e morfologia espermática.

Avaliação do sêmen in natura

A motilidade espermática progressiva retilínea (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de 0 a 5) foram avaliados acondicionando uma alíquota de 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. A motilidade espermática foi determinada pela atividade de movimento total dos espermatozoides e o vigor espermático foi caracterizado pela intensidade de movimento ou de batimento da cauda dos espermatozoides, sendo analisado com auxílio de microscopia de luz com aumento de 100 a 200x.

A concentração espermática foi estimada por meio de microscopia óptica e uso de câmara de Neubauer, calculando o número de espermatozoides por ml (concentração/ml) e o número de espermatozoides totais no ejaculado (concentração total).

Obtenção do plasma seminal e precipitação

Após a coleta e avaliação física, o sêmen foi centrifugado a 1500 xg por 15 minutos para a obtenção do plasma seminal. A seguir, o plasma seminal foi separado do pellet de

espermatozoides e envasado em palhetas médias (0,5 ml) e conservado em nitrogênio líquido (-196 °C) para posterior análise proteômica.

As amostras foram divididas em quatro grupos, equivalentes às estações do ano. A amostra coletada no mês central de cada estação foi selecionada para ser precipitada, totalizando 39 amostras (não foi possível uma coleta por problemas com o animal).

Duas palhetas de cada coleta foram descongeladas em temperatura ambiente, o conteúdo das duas palhetas foi transferido para um único microtubo Eppendorf de 1,5 ml, centrifugado a 1.500 xg, em temperatura de 4°C por 40 minutos; o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 2 ml e homogeneizado cuidadosamente com ponteira para evitar a formação de bolhas. Foi retirada uma alíquota de 20 µL (reserva de segurança) e armazenada em freezer a -80 °C. Ao restante do plasma seminal, adicionou-se acetona gelada Merck® no volume 5X o volume de plasma (1,25ml), sendo deixado a -20°C, “overnight”. O eppendorf foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 xg em temperatura de 4°C, a acetona foi retirada e o pellet foi ressuscitado em 250 µL de solução de solubilização, constituída de 7M uréia, 2M tiouréia, 2 % (p/v) 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS). Foi realizada a quantificação das proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976), na qual a curva padrão foi preparada utilizando albumina serica bovina (BSA) como proteína padrão; foram feitos seis géis monodimensionais e seis bidimensionais, mas o perfil não foi o esperado, dessa forma, realizamos uma segunda precipitação, na qual utilizamos acetona, Ditioneitol (DTT) e Ácido tricloroacético (TCA).

Antes de iniciar a segunda precipitação, foram separados 100 µL (metade) de cada amostra e armazenamos a -20°C como reserva de segurança. Aos outros 100 µL foram adicionados 600 µL de acetona gelada + 1mM DTT+ TCA 10 % (1:6 v/v). Após o microtubo ser mantido “overnight” com a solução, foi realizada a centrifugação a 20.000 xg por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado com acetona gelada+1mM DTT; foram realizadas mais quatro centrifugações sucessivas desse mesmo modo Posteriormente, o pellet foi ressuscitado com etanol gelado 80 % + 1mM DTT. Foi realizada uma última centrifugação com a mesma rotação, temperatura e tempo; os microtubos foram submetidos ao speed vac para a secagem das amostras e foram adicionados 100 µL de solução de solubilização em cada microtubo. Foi realizada a quantificação de proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976); posteriormente foram feitos géis monodimensionais para verificação do perfil proteico e os géis bidimensionais referentes às 39 amostras.

Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional (2-DE) consiste em duas etapas: focalização isoeletrica (primeira dimensão) e separação por massa molecular (segunda dimensão). A focalização isoeletrica foi realizada em sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare®), usando fitas de 7 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG) 3-10 linear. As fitas foram rehidratadas por 16 horas com 150 µg de proteína solubilizada em solução de reidratação (7M de ureia, 2M de tiourea, 40 mM de DTT, 2 % (p/v) de CHAPS, adicionada de solução DeStreak (GE Healthcare®) para completar 125 µL de amostra. Em seguida, realizou-se a focalização isoeletrica de acordo com o perfil proteico obtido nos géis monodimensionais: 1) Step de 300 V por 4 horas; 2) Step 500 V por 4 horas; 3) Gradiente de 1000 V até acumular os 300 V/h; 4) Gradiente de 2000V por 4 horas; 5) Gradiente de 3000 V por 4 horas; 6) Gradiente de 8000 V por 2 horas; 7) Step 200 V por 4 horas. Após o término da focalização, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

Na etapa de segunda dimensão, as fitas foram incubadas por 15 minutos em solução de equilíbrio (6M de ureia, 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 30 % (v/v) de glicerol, 2% (p/v) de dodecil sulfato 25 de sódio (SDS) e 0,002 % (p/v) de azul de bromofenol) contendo 1 % (p/v) de DTT. Seguiu-se o re-equilíbrio por mais 15 minutos, na mesma solução de equilíbrio, substituindo o DTT por 2,5 % (p/v) de iodoacetamida. As proteínas foram separadas por gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14 %, com 1,5 mm de espessura, preparado previamente para assegurar a polimerização adequada. Foi usado um marcador de ampla faixa (Broad Range, Biorad®) por gel, previamente fervido e aplicado a um papel filtro com dimensões de 5x5 mm, que foi colocado do lado positivo da fita. Os géis foram corados com o Comassie Brilliant Blue 250-R durante uma hora e meia, submergidos em solução descorante (25 % metanol, 7,5 % ácido acético) “overnight” e depois mantidos em solução de ácido acético a 5 %.

Aquisição e análise das imagens

As imagens dos géis foram adquiridas (300 dpi) usando o equipamento Image Scanner III (GE Healthcare, Suécia). Os arquivos salvos na extensão (.mel) foram analisados pelo programa Image MasterTM 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Suécia). Os géis foram separados em quatro grupos, conforme as estações: primavera, verão, outono e inverno. Dada ampla variabilidade das amostras em cada tratamento, foram analisados cinco géis mais representativos dos dez géis de cada estação, totalizando 20 géis, dessa forma, permanecendo

cinco géis em cada grupo (estação). Um único gel de referência representativo de cada estação foi obtido, os quais foram contrastados pelo programa. Spots em posições-chave nos géis de referência foram escolhidos como marcos. A correspondência de spots entre os géis representativos. Os resultados foram obtidos comparando-se as percentagens dos volumes dos spots em cada gel. Para isso, os volumes dos spots foram normalizados considerando-se o volume total dos spots no gel. O percentual de cada spot foi utilizado para estimar e comparar a abundância diferencial da proteína entre as amostras. Somente foram consideradas proteínas diferencialmente abundantes, aquelas com variação mínima de 1,5 vezes entre os volumes máximo e mínimo detectados entre os tratamentos, em consonância com o valor de p menor que 0,05 para o teste anova.

Digestão enzimática dos spots no gel e preparo das amostras para análise por espectrometria de massas

A digestão enzimática foi efetuada com tripsina de pâncreas suíno, indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência V5111 (Promega Corporation, EUA). As digestões das proteínas foram realizadas conforme descrito anteriormente por Shevchenko et al. (2006). Resumidamente, os spots dos géis de interesse foram excisados e submetidos à descoloração por meio de solução de acetonitrila 50 %, bicarbonato de amônio 25 mM. Em seguida, foram reduzidos por meio de DTT 65 mM e alquilados com iodoacetamida 200 mM, ambos solubilizados em solução de bicarbonato de amônio 100mM.. Após, os géis foram lavados, desidratados e submetidos à digestão utilizando uma solução de tripsina na concentração de 25 ng/ μ L, da qual foram adicionados 20 μ L em cada amostra. A digestão ocorreu em banho-maria à temperatura de 37°C por um período de 20 horas. Em seguida, foi adicionada solução de ácido fórmico 5 % e acetonitrila 50 % aos fragmentos de géis, os quais foram sonicados a uma frequência de 25 kHz, por 2 minutos, agitados em um vórtex e centrifugados a 3000 xg por um minuto. As soluções contendo os peptídeos trípticos foram recuperadas e acondicionadas em novo tubo. As soluções de peptídeos trípticos foram secadas em centrífuga a vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha) e armazenados a -80°C até o uso.

Os peptídeos trípticos de todas as amostras foram ressuspensos em 10 μ L de solução de ácido trifluoracético 0,1 % e dessalinizado em ZIPTIP, modelo ZTC18S096 (Millipore, USA) e eluídos em 2,5 μ L de acetonitrila 50 %, acidificada com ácido

trifluoracético 0,1 %. A matriz utilizada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), solubilizada na mesma solução da qual os peptídeos tríplicos foram eluídos, para uma concentração final de 10 mg/mL. Para calibração do método de análise MS1, foram utilizados peptídeos-padrão (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha). Em seguida, 1 μ L de amostra e 1 μ L de matriz foram aplicados e homogeneizados em cada spot de placa de aço apropriada.

Análise por espectrometria de massas

Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro de massas em Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-TOF/TOF), modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics). Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500 a 3400 Da. Para a realização de MS2, foi utilizado o método LIFT no modo positivo, sendo selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z). Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software flexControl, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo flexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato mascot generic format (mgf) pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

Identificação das proteínas

As listas de massas foram confrontadas contra o Banco de Dados de proteínas da espécie *Sus scrofa*, depositadas no UNIPROT (download em 18/10/2017, com 26.103 entradas), usando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

As proteínas identificadas pelo MASCOT como “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST, versão 2.4.0 (Altschul et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”. O resultado obtido pelo MASCOT foi validado pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software Inc., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados, foi

aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* (Keller et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii et al., 2003). Como critério de aceitação, foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90 % de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

Caracterização funcional das proteínas

As informações sobre a ontologia das proteínas identificadas e validadas foram recuperadas a partir dos dados do Gene Ontology, disponíveis no banco de dados do Uniprot Consortium (<http://www.uniprot.org>).

As redes de interação entre as proteínas identificadas e validadas foram reconstruídas utilizando o aplicativo STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, versão 10.0, [http:// string-db.org/](http://string-db.org/)) (Szklarczyk et al., 2014). Nessa análise, as redes foram obtidas usando a espécie *Sus scrofa* como organismo de referência para as buscas nas bases de dados por meio das estratégias de *textmining*, *experiments*, *database* e *co-expression*, com nível de confiança acima de 0,90, e no máximo 20 interações na primeira e também na segunda chamada. A figura da rede de interações foi gerada no modo *confidence view*, no qual os nós maiores representam proteínas com estrutura 3D conhecida e a espessura da linha entre os nós indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação.

Análise estatística

Para as análises estatísticas, foi utilizado o software SAEG versão 9.1. (SAEG-UFV, 2007). Análises descritivas quanto às médias, desvios-padrão e coeficientes de variação foram realizadas para todas as variáveis estudadas. O teste Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias entre grupos de tratamento foi estudada utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para verificar possíveis diferenças entre os grupos experimentais em relação aos testes complementares, aspectos físicos e morfológicos do sêmen durante as estações do ano. Quando foi detectado efeito pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ou Duncan (5 %). Nas variáveis que não atenderam às premissas de normalidade da variável e homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (5 %). Correlação simples de Pearson foi realizada entre as características seminais, os testes complementares e os spots.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias registradas para a motilidade espermática progressiva do sêmen diferiram entre as classes de idade (Tabela 1): os valores para a classe 2 foram superiores às classes 3 e 4 ($p < 0,05$), mas essas duas não apresentaram diferenças entre si; não houve diferença entre as classes supracitadas com a classe 1 ($p > 0,05$). Em relação ao vigor espermático, a classe 2 foi superior às classes 3 e 4, sendo que a classe 3 foi superior à 4 e a classe 1 não diferiu de nenhuma outra classe ($p > 0,05$). Fraser et al. (2016) relataram que a proporção de espermatozoides com acrossoma normal e intacto e com membranas acrossomais osmoticamente ativas foram maior em animais de faixa etária semelhante à classe 2 do presente estudo. Todos os valores se encontram dentro dos limites aceitáveis ou padrões de normalidade para a espécie, sendo considerados aprovados para todos os aspectos reprodutivos. Os animais da classe 4 apresentaram a menor concentração espermática ml/ejaculado, provavelmente por apresentarem menor produção espermática. Apesar dessa diferença, deve-se ressaltar que os valores em todas as classes de idade se encontram dentro dos limites aceitáveis para a espécie e, portanto, todas dentro de faixas normais de concentração.

Na Tabela 1 ainda se pode observar que a concentração espermática total foi menor na classe 4 em relação às classes 2 e 3 ($p < 0,05$), que não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$); não houve diferença entre a classe 1 e as demais classes ($p > 0,05$). Em relação à concentração espermática / mL, a classe 4 foi inferior às demais ($p < 0,05$). Esses resultados corroboram com o estudo de Fraser et al. (2016) que estudaram as mesmas características em suínos em três classes de idade (oito a 18, 19 a 30 e 31 a 42 meses de idade) durante dois períodos (outono-inverno e primavera-verão) e observaram que a concentração espermática diminui ao longo do tempo, a partir de determinada idade do animal. No presente estudo, a classe 4 (63 a 81,9 meses) apresentou concentração espermática / mL menor quando comparada às demais classes de idade ($p < 0,05$). Para as demais faixas etárias, classe 1 (9,3 a 11,7 meses de idade), 2 (12,3 a 23,9 meses de idade) e classe 3 (24,4 a 35,8 meses de idade) não foi observada diferença entre os valores médios obtidos para a concentração espermática / mL. A diferença observada para a concentração por mL, provavelmente se deva ao fato dos animais em idades mais avançadas (classe 4) apresentarem pontos de fibrose difusa decorrentes de pequenos traumas e estresse por calor ao longo da vida, o que ocasiona perdas

de túbulos seminíferos para a produção de gametas. No geral, os valores obtidos no presente estudo se mostraram inferiores aos obtidos por Fraser et al. (2016), porém, os autores trabalharam com os suínos de linhagem comercial em condições de clima temperado, classes de faixa etária diferentes, podendo existir diferença fisiológica quanto à morfometria testicular e idades de maturação sexual entre as raças estudadas.

Na Tabela 2 os valores médios para defeitos espermáticos maiores, menores e totais estão sumariados. Na classe 1, os animais apresentaram valores médios inferiores aos da classe 3 em relação aos defeitos maiores, porém ambas não diferiram dos valores médios obtidos nas classes 2 e 4 ($p>0,05$). Não houve diferença entre as médias para defeitos menores entre as classes de idade ($p>0,05$). Em relação aos valores médios de defeitos totais, os animais da classe 3 apresentaram média superior aos das classes 1 e 2, que não apresentaram diferenças entre si ($p>0,05$). Os animais da classe 4 não apresentaram diferença quanto aos valores médios de defeitos espermáticos totais com nenhuma classe de idade estudada ($p>0,05$). Em estudo realizado por Huang et al. (2010) com 58 varrões da raça Duroc, idade entre 10 e 80 meses de idade, os autores relataram que animais mais jovens teriam maior resistência ao efeito danoso da temperatura e umidade relativa do ar sobre a qualidade espermática, apresentando maior resistência ao redor de um ano de idade. O presente estudo corrobora com esses autores, mostrando que animais nessa faixa etária apresentaram o mesmo comportamento. Provavelmente essa resistência dos animais mais jovens às oscilações térmicas e de umidade relativa do ar se deva a uma termorregulação mais eficiente, já que animais mais jovens tendem a possuir menos gordura corporal e perdem calor mais facilmente para o ambiente. Porém, apesar dessa diferença, todos os ejaculados apresentaram valores médios de patologias espermáticas dentro dos limites aceitáveis para reprodutores aptos a reprodução (CBRA, 2013), ou seja, percentuais de anomalias espermáticas identificadas nos ejaculados estão mais relacionadas às diferenças individuais e pequenas falhas no processo de espermiogênese, devido às pequenas diferenças de adaptabilidade ao manejo nutricional e ou ambiental (nutricional, temperatura, umidade, estresse), não afetando o potencial reprodutivo dos machos.

Tabela 1: Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen suíno da raça Piau de acordo com a classe de idade.

Classe	(n)	MOT	VIG	CONCML (x10 ⁶)	CONCT (x10 ⁹)
1	10	82,5±4,9 ^{AB}	3,8±0,4 ^{ABC}	452,5±237,1 ^A	59,2±39,6 ^{AB}
2	44	83,4±6,7 ^A	4,1±0,4 ^A	508,2±373,5 ^A	64,3±47,8 ^A
3	33	77,1±7,9 ^B	3,7±0,5 ^B	509,9±466,4 ^A	68,5±54,7 ^A
4	26	76,3±7,9 ^B	3,3±0,4 ^C	158,6±89,8 ^B	30,1±20,9 ^B
Média	28,25	79,9±7,6	3,8±0,5	422,6±378,7	57,2±46,8

^{AB}Valores médios seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Kruskal Wallis; CLASSE 1: animais com 9,3 a 11,7 meses de idade; CLASSE 2: animais com 12,4 a 23,9 meses de idade; CLASSE 3: animais com 24,4 a 35,8 meses idade; CLASSE 4: animais com 63,0 a 81,9 meses de idade; (n): número de coletas de sêmen dos animais; MOT: motilidade espermática; VIG: vigor espermático; CONCT: concentração espermática total no ejaculado (x10⁹); CONCML: concentração espermática por mL (10⁶).

Tabela 2: Valores médios e desvios-padrão da morfologia espermática de suínos da raça Piau, de acordo com a classe de idade.

CLASSE	(n)	DEFM	DEFMEN	DEFT
1	10	5,3±2,1 ^B	5,7±3,0	11,0±2,6 ^{BC}
2	46	8,0±3,6 ^{AB}	6,1±4,3	14,1±6,4 ^C
3	33	14,7±11,6 ^A	7,8±4,8	22,5±14,7 ^A
4	26	8,0±5,3 ^{AB}	7,2±2,3	15,3±6,3 ^{ABC}
Média	28,75	9,7±7,7	6,8±4,0	15,5±10,1

^{AB} Valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05); CLASSE 1: animais com 9,3 a 11,7 meses de idade; CLASSE 2: animais com 12,4 a 23,9 meses de idade; CLASSE 3: animais com 24,4 a 35,8 meses idade; CLASSE 4: animais com 63,0 a 81,9 meses de idade; (n): número de coletas de sêmen dos animais; DEFM: defeitos espermáticos maiores; DEFMEN: defeitos espermáticos menores; DEFT: defeitos espermáticos totais.

Os valores médios dos aspectos físicos do sêmen de acordo com a estação do ano estão sumarizados na tabela 3. Os valores médios registrados para a motilidade espermática progressiva foram 79,6±7,4; 80,6±9,0; 80,6±5,9 e 79,0±7,9 %, respectivamente para verão, outono, inverno e primavera, não havendo diferença entre as estações do ano (p>0,05).

Também não houve diferença entre as estações em relação aos valores médios obtidos para as características de vigor espermático, concentração espermática total e concentração por mL ($p>0,05$). No presente estudo, os resultados da média de motilidade espermática progressiva ($79,9\pm 7,6\%$) e vigor espermático ($3,8\pm 0,5$) são semelhantes aos obtidos por Pinho et al. (2013) que trabalharam com comportamento sexual e qualidade seminal em varrões do mesmo rebanho deste estudo ($76,2\pm 9,5\%$ e $3,3\pm 0,5$, respectivamente para motilidade espermática progressiva e vigor espermático). A ausência de influência da sazonalidade verificada para estas características, provavelmente se deva ao fato das estações do ano no local experimental, não apresentarem diferenças marcantes de temperatura, umidade relativa do ar e no tempo de luz e escuro durante ao longo do dia.

Na Tabela 4, podem ser observadas as alterações na morfologia espermática ao longo das estações do ano. Quanto aos valores médios para os defeitos maiores, no inverno observou-se valores médios superiores aos valores médios obtidos no verão ($p<0,05$). Comportamento semelhante foi observado para defeitos espermáticos totais ($p<0,05$).

Esses resultados corroboram com os de Chacur et al. (2012), que estudaram a influência das estações do ano sobre as características seminais e hormonais de touros das raças Nelore e Simental, e constataram o efeito do inverno em afetar negativamente a morfologia espermática na raça Simental, porém na raça Nelore, não houve variações significativas das características do sêmen ao longo das estações do ano. No entanto, os valores médios do presente estudo mostram-se contrários aos obtidos por Zasiadczyk et al. (2015) que estudando suínos, verificaram correlações negativas entre o aumento da temperatura ambiente (verão) e o aparecimento de espermatozoides anormais (alterações na espermatogênese), havendo aumento na porcentagem de espermatozoides com as membranas mitocondrial e plasmática íntegras funcionais durante o outono-inverno. Johnson e Gomes (1969) demonstraram que temperaturas acima de $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram correlacionadas à perda de peso dos testículos e degeneração dos túbulos seminíferos, fazendo com que o volume total do ejaculado fosse reduzido, afetando negativamente sua concentração e motilidade espermática. A temperatura e o fotoperíodo afetam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal regulando a produção e maturação dos espermatozoides (Hoffman et al., 1999), sendo que variações diárias de temperatura maiores que $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ tem um efeito negativo na produção espermática (Kunavongkrit et al., 2005). Contudo, tais efeitos negativos se manifestam somente após 7-15 dias a partir da exposição, podendo persistir até 60 dias após a remoção do

fator estressante (Levis, 1997), em função da duração do ciclo espermatogênico, maturação espermática e trânsito epididimário (35-39 dias; Roberts, 1986). Portanto, o maior número de alterações na morfologia espermática no inverno pode ter decorrido por um estresse térmico no final do outono.

Apesar de o presente estudo ter verificado que no inverno houve maior prevalência de alterações na morfologia espermática em relação ao verão, as diferenças são pequenas e o percentual de patologias espermáticas verificado está dentro dos limites aceitável para não comprometer a fertilidade do animal e sua aprovação no exame andrológico.

No verão, a menor exigência energética de manutenção e maior bem-estar animal (devido às temperaturas mais constantes) podem ter influenciado positivamente na espermatogênese, e possivelmente os varrões da raça Piau possuam uma temperatura de conforto térmico superior às demais, mostrando-se adaptado ao bioclima local.

Tabela 3: Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de suínos da raça Piau de acordo com a estação do ano.

ESTACÃO	(n)	MOT	VIG	CONCML	CONCT
Verão	29	79,6±7,4	3,6±0,6	324,8±230,8	45,9±27,8
Outono	24	80,6±9,0	3,7±0,6	409,3±392,7	59,4±51,0
Inverno	23	80,6±5,9	3,8±0,5	407,4±283,6	57,4±34,9
Primavera	36	79,0±7,9	3,9±0,5	519,7±492,3	64,5±60,7
Média	28	79,9±7,6	3,8±0,5	422,6±378,7	57,2±46,8

^{AB} Valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; (n): número de coletas de sêmen dos animais; MOT: motilidade espermática progressiva; VIG: vigor espermático; CONCT: concentração espermática total no ejaculado ($\times 10^9$); CONCML: concentração espermática por mL (10^6).

Tabela 4: Valores médios e desvios-padrão da morfologia espermática de suínos da raça Piau de acordo com a estação do ano.

ESTAÇÃO	(n)	DEFM	DEFMEN	DEFT
Verão	30	8,1±7,8 ^B	6,6±5,4	14,7±11,3 ^B
Outono	25	8,2±5,0 ^{AB}	6,2±3,3	14,4±7,0 ^{AB}
Inverno	24	13,8±10,2 ^A	6,6±2,7	20,4±11,9 ^A
Primavera	36	9,4±6,7 ^{AB}	7,6±3,9	17,0±9,1 ^{AB}
Média	28,75	9,7±7,7	6,8±4,0	16,5±10,1

^{AB} Valores médios seguidos letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; (n): número de animais; DEFM: defeitos espermáticos maiores; DEFMEN: defeitos espermáticos menores; DEFT: defeitos espermáticos totais.

Na tabela 5 estão expostos os valores médios para os aspectos físicos do sêmen por animal. Os animais 4 e 7 apresentaram valores médios de motilidade espermática progressiva inferiores aos animais 1, 2, 6, 8, 9 e 10 ($p < 0,05$), e não houve diferença entre os demais animais ($p > 0,05$). Em relação ao vigor espermático, o animal 4 apresentou valor médio inferior aos valores médios dos animais 1, 2, 3, 6, 8, 9 e 10 ($p < 0,05$), mas semelhante aos valores médios dos animais 4, 5 e 7 ($p > 0,05$), não sendo observado diferença entre os demais animais ($p > 0,05$). Em relação à concentração espermática total, o animal 8 apresentou valor médio superior aos valores médios dos animais 3, 4 e 5 ($p < 0,05$), mas não apresentou diferença com os valores médios dos demais animais ($p > 0,05$); o animal 4 apresentou valor médio inferior aos valores médios dos animais 2, 6, 7, 8, 9 e 10 ($p < 0,05$), mas não diferiu dos valores médios dos demais animais ($p > 0,05$). O animal 8, 9 e 10 apresentaram valores médios da concentração espermática por mL inferiores em relação aos valores médios dos demais animais ($p < 0,05$).

Na tabela 6, podem-se observar os valores médios da morfologia espermática para cada animal. Em relação aos defeitos espermáticos totais, os animais 7 e 8 apresentaram os maiores percentuais de patologias ($p < 0,05$), não diferindo do valor percentual dos animal 4 ($p > 0,05$). Com relação aos defeitos espermáticos maiores, o animal 7 os maiores percentuais destas patologias em relação aos demais animais ($p < 0,05$) e o animal 10 que apresentou valores médios diferentes ao do animal 3 ($p < 0,05$). Em relação aos valores percentuais de defeitos espermáticos menores, os animais 7, 8 e 9 apresentaram os maiores valores

percentuais destas patologias ($p < 0,05$), porém não diferiu o valor médio apresentado pelo animal 10 ($p > 0,05$). Apesar das diferenças observadas nos percentuais de anomalias espermáticas, ressalta-se que estes valores se encontravam dentro dos limites preconizados pelo CBRA (2013), de modo que os animais se encontravam aprovados à reprodução, como também, os animais possuíam históricos reprodutivos anteriores normais.

Os resultados médios para motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática total e por mL são similares a outros estudos relatados. Egerszegi et al. (2008) e Roca et al. (2006) obtiveram motilidade espermática progressiva semelhantes ao presente estudo, com valores de $75,5 \pm 6,8$ e $76,1 \pm 0,9$ %, respectivamente. Os resultados do presente estudo corroboram com diversos autores, que verificaram principalmente variações individuais e até entre ejaculados de um mesmo varrão, principalmente em experimentos de criopreservação de sêmen (Medrano, 1998; Hernandez et al., 2007).

Tabela 5: Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos de suínos da raça Piau de acordo com o animal.

1	(n)	MOT	VIG	CONCML	CONCT
1	5	$87,0 \pm 2,7^A$	$4,2 \pm 0,4^A$	$423,9 \pm 324,3^A$	$61,0 \pm 19,3^A$
2	13	$85,4 \pm 5,6^A$	$4,0 \pm 0,4^A$	$372,7 \pm 178,9^A$	$60,7 \pm 35,0^{AB}$
3	12	$78,7 \pm 4,8^{AC}$	$3,9 \pm 0,5^A$	$414,8 \pm 243,5^A$	$51,3 \pm 35,2^{ABD}$
4	12	$72,5 \pm 6,6^{BC}$	$3,0 \pm 0,0^{BC}$	$141,2 \pm 87,5^{AB}$	$20,1 \pm 12,8^{ACD}$
5	14	$79,6 \pm 5,4^{AC}$	$3,5 \pm 0,4^{AC}$	$173,4 \pm 92,3^{AB}$	$38,6 \pm 23,1^{ABD}$
6	10	$82,0 \pm 4,2^A$	$3,9 \pm 0,4^A$	$317,7 \pm 156,2^{AB}$	$44,1 \pm 17,8^{AB}$
7	11	$68,6 \pm 5,5^{BC}$	$3,3 \pm 0,5^{AC}$	$340,7 \pm 339,0^{AB}$	$54,4 \pm 50,9^{AB}$
8	11	$81,4 \pm 7,8^A$	$4,0 \pm 0,4^A$	$941,4 \pm 546,0^{AC}$	$110,2 \pm 65,1^{ABE}$
9	12	$85,4 \pm 6,2^A$	$4,2 \pm 0,4^A$	$739,1 \pm 594,7^{AC}$	$73,3 \pm 75,4^{AB}$
10	13	$81,1 \pm 5,5^A$	$3,9 \pm 0,5^A$	$450,4 \pm 149,6^{AC}$	$65,6 \pm 38,3^{AB}$
Média		$79,9 \pm 7,6$	$3,8 \pm 0,5$	$422,6 \pm 378,7$	$57,2 \pm 46,8$

^{AB} Valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; (n): número de animais; MOT: motilidade espermática progressiva; VIG: vigor espermático; CONCT: concentração espermática total no ejaculado ($\times 10^9$); CONCML: concentração espermática por mL (10^6).

Tabela 6: Valores médios e desvios-padrão para morfologia espermática de suínos da raça Piau de acordo com o animal.

ANIMAL	(n)	DEFM	DEFMEN	DEFT
1	5	7,6±1,8 ^A	5,8±2,3 ^A	13,4±1,1 ^A
2	13	6,3±2,2 ^{AB}	3,8±1,4 ^{AB}	10,1±2,1 ^{AB}
3	13	10,9±4,3 ^{ABD}	3,6±3,1 ^{AB}	14,5±6,6 ^{AB}
4	12	9,9±5,6 ^A	7,3±2,3 ^A	17,2±7,5 ^{ABD}
5	14	6,4±4,5 ^{AB}	7,1±2,3 ^A	13,6±4,7 ^{AB}
6	11	6,9±2,3 ^{AB}	6,4±2,1 ^A	13,3±3,6 ^{AB}
7	11	26,4±12,6 ^{AC}	10,6±3,6 ^{AC}	37,0±14,8 ^{AC}
8	11	11,1±5,8 ^A	11,0±7,0 ^{ACD}	22,1±10,9 ^A
9	12	6,8±2,8 ^{AB}	8,6±2,8 ^{ACD}	15,4±3,5 ^{AB}
10	13	5,5±2,1 ^{ABE}	4,8±2,6 ^{ABD}	10,4±3,9 ^{ABE}
Média		9, 7±7,7	6,8±4,0	16,5±10,1

^{AB} Valores médios seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; (n): número de animais; DEFM: defeitos espermáticos maiores; DEFMEN: defeitos espermáticos menores; DEFT: defeitos espermáticos totais.

Resultados das análises proteômicas

A separação de amostras do plasma seminal de suínos da raça Piau usando eletroforese bidimensional na região de pH 3 a 10 e SDS-PAGE 14 % possibilitou a detecção de 58 spots de proteínas, em média, por gel. Esses spots foram excisados e avaliados por espectrometria de massas MALDI TOF/TOF, sendo identificadas 12 proteínas pelo programa MASCOT (tabela 8), das quais 10 foram validadas pelo programa SCAFFOLD (tabela 7).

Dentre as proteínas identificadas e validadas, diferentes spots representaram as mesmas proteínas, que foram a Major Seminal Plasma Glycoprotein-PSP-I (P35495, spots 0, 1,2,3,4, 7, 8, 18, 19, 20,21, 39, 44 e 48), Major Seminal Plasma Glycoprotein- PSP-II (P35496, spots 2, 3, 5, 13, 14, 15, 16, 17 e 55), Beta-hexosaminidase (D0G6X8, spots 12, 37 e 38), Seminal Plasma Sperm Motility Inhibitor (I7HJH6, spots 2, 3 e 55), alfa-crystallin A chain (P02475, spot 8, 57), Alfa-crystallin B chain (Q7M2W6, spot 8), Carbohydrate-binding

Protein AWN (P26776, spots 2), Seminal Plasma Acrosin Inhibitor (P00999, spot 56), Seminal plasma protein pB1 (P80964, spot 5), Serum Albumin (F1RUN2, spot 11).

Comparando as estações Primavera/Verão e Outono/ Inverno, dez spots se apresentaram diferencialmente abundantes ($p < 0,05$), sendo os spots 1 e 51 mais abundantes no Outono/Inverno e os spots 3, 10, 17, 21, 34, 35, 36 e 52, mais abundantes na Primavera/Verão, como se pode observar na tabela 9. A figura 1 demonstra o perfil de abundância de cada spot por estação. Para os spots diferencialmente abundantes, os valores de massa molecular média e ponto isoelétrico médio foram: spot 1 (20 kDa e pI 9,13), spot 3 (17 kDa e pI 9,86), spot 10 (83 kDa e pI 6,38), spot 17 (31 kDa e pI 9,81), spot 21 (20 kDa e pI 7,89), spot 34 (79 kDa e pI 7,43), spot 35 (78 kDa e pI 7,58), spot 36 (77 kDa e pI 7,77), spot 51 (13 kDa e pI 3,22) e spot 52 (15 kDa e pI 3,24). Dentre esses spots, cinco tiveram as proteínas identificadas pelo programa MASCOT (tabela 7), porém apenas três spots tiveram suas identificações de proteínas validadas pelo SCAFFOLD (tabela 8). As identificações validadas foram de PSP-I para o spot 1; PSP-II, I7HJH6 e PSP-II para o spot 3; PSP-II para o spot 17 e PSP-I para o spot 21.

A motilidade espermática apresentou correlação positiva ($r = 0,54$) com o spot 5 que teve sua identificação validada como PSP-II e seminal plasma protein B1, e correlação negativa ($r = -0,47$) com o spot 21, validado como PSP-I (tabela 10). No presente estudo, essa correlação negativa de PSP-I com a motilidade corrobora com Novak et al. (2010) que estudaram varrões da raça Large White, realizando eletroforese bidimensional da fração rica do sêmen para investigar marcadores moleculares relacionados com a fertilidade *in vivo* e observaram que os índices de leitões nascidos ($r = -0,76$; $p < 0,01$) e motilidade espermática no dia 7 ($r = -0,74$, $p < 0,037$) foram correlacionados negativamente com uma proteína de 22 kDa, identificada por espectrometria de massa como PSP-I.

O vigor espermático apresentou correlação positiva ($r = 0,57$) com o spot 5 (PSP-II e seminal plasma protein B1) e correlação negativa ($r = -0,62$) e ($r = -0,46$) com os spots 14 e 15, respectivamente, sendo ambos validados como PSP-II. A patologia acrossomal, avaliada por microscopia ótica no presente estudo, foi correlacionada negativamente com os spots 1 ($r = 0,52$), 19 ($r = 0,46$) e 20 ($r = 0,49$), todos com identificação validada de PSP-I. Esse achado do presente estudo corrobora com pesquisa de Caballero et al. (2006), que fazendo testes *in vitro* constataram que a exposição dos espermatozoides ao heterodímero PSP-I/PSP-

II preserva a viabilidade, a motilidade e a atividade mitocondrial do sêmen diluído, quando comparados com espermatozoides não expostos, tendo efeito por dez horas. O efeito protetor do heterodímero parece estar relacionado à sua adesão à área acrosomal, e a perda desse efeito protetor coincide com uma redistribuição gradual da PSP-I / PSP-II durante a incubação, corroborando com Caballero et al. (2004) que sugerem que o heterodímero PSP-I e PSP-II não sustenta sua ação por longos períodos durante a incubação in vitro, provavelmente por bloqueio ou degradação. A agregação e a desagregação de proteínas do plasma seminal parecem ter uma importante função na fertilização, sendo que a formação do heterodímero PSP-I/PSP-II e as interações entre as famílias de espermadesinas AQN, AWN e DQH já foram demonstradas. A afinidade das proteínas do plasma seminal por fosforilcolina parece ser crucial para essas interações (Manaskova et al., 2000).

No presente estudo, foi observado maior percentual de patologias espermáticas no inverno, uma maior abundância de PSP-II (spots 3 e 17) na primavera-verão e uma maior abundância de PSP-I (spot 51) no outono/inverno, havendo correlação positiva de PSP-II com a motilidade (spot 5) como observado na Tabela 10. Esses resultados do presente estudo corroboram com pesquisas anteriores, que não definem exatamente qual a influência dessas espermadesinas na qualidade seminal. Centurion et al. (2003) relataram que a adição de PSP-I / PSP-II purificada teve um efeito benéfico na viabilidade se espermatozoides criopreservados, porém em outras pesquisas a adição de PSP-I e PSP-II diminuiu a capacidade fecundante dos espermatozoides avaliados pós-descongelamento (Caballero et al., 2004; Ceremades et al., 2004). PSP-I possui formas múltiplas devido às diferenças nos seus carboidratos constituintes (Rutherford et al, 1992; Nimtz et al, 1999). Novak et al. (2010) relataram a identificação de isoformas glicosiladas de PSP-I entre 14 a 20 kDa e uma única isoforma não-glicosilada de PSP-I com banda compacta de 12 kDa. As espermadesinas podem atuar na decapacitação, contribuindo para a longevidade espermática. Por outro lado, podem reduzir a fertilidade quando em excesso ou quando os espermatozoides são expostos a elas por um período longo (Novak et al., 2010).

Na espécie suína, a maioria das proteínas do plasma seminal pertence à família das espermadesinas, um grupo de glicoproteínas constituídas por um único domínio CUB (Romero et al., 1997), com peso molecular entre 12 e 16kDa (Campanero-Rhodes et al., 2005) e relacionado com a capacitação espermática e ligação à zona pelúcida do oócito (Topfer-Petersen et al., 1998). Cinco proteínas constituem a família das espermadesinas:

AQN-1, AQN-3, AWN-1, AWN-2, PSP-I e PSP-II, sendo que as duas últimas são as mais abundantes e apresentam-se em forma de heterodímero glicosilado não-covalente em condições fisiológicas (Calvete et al., 1995a). No presente estudo pode-se supor que as espermedesinas se apresentaram as mais abundantes, já que dentre os 28 spots com identificações validadas, 24 caracterizaram essas proteínas, corroborando com estudos anteriores, que relatam que as espermedesinas correspondem de 75 a 90 % de todas as proteínas expressas no plasma seminal suíno, dependendo do método utilizado para a mensuração (Dostàlovà Z et al., 1994; Caballero et al., 2008).

Várias identificações da mesma proteína em diferentes spots foram observadas no presente estudo, sugerindo que essas proteínas apresentam diferentes isoformas, corroborando com estudos de Syntin et al. (1996), que realizaram a caracterização e identificação das proteínas secretadas em várias regiões de epidídimos de varrões adultos por meio de eletroforese mono e bidimensional e constataram que a maioria das proteínas analisadas eram altamente polimórficas em termos de ponto isoelétrico e massa molecular. Calvete et al. (1995b), estudando plasma seminal equino, cita que vários spots podem corresponder à mesma proteína devido a alguma modificação, possivelmente uma fosforilação e/ou glicosilação, o que poderia explicar diferenças na massa molecular e ponto isoelétrico. O padrão de glicosilação das proteínas influencia a propriedade de ligação à heparina, pela modulação da mesma.

O spot 56 foi identificado e validado no presente estudo como Seminal plasma acrosin inhibitor, que é uma proteína ácido-estável inibidora da ação da acrosina e pertence à KAZAK_FS superfamily. A principal função dos inibidores de protease no trato reprodutivo é a inativação da liberação prematura de enzimas proteolíticas por espermatozoides enjuriados e a proteção do trato reprodutivo contra a degradação proteica. No trato reprodutivo suíno, os inibidores de acrosina são encontrados no plasma seminal e no espermatozoide (Fritz et al. 1975) e possuem massa molecular de 6 a 7,5kDa (Tschesche et al, 1976).

Podemos observar as funções biológicas, funções moleculares e local onde são encontradas as proteínas validadas no presente estudo, respectivamente nas figuras 2, 3 e 4. Essas figuras foram feitas com auxílio dos programas Gene Ontology e UniProt.

De acordo com a rede de interações de proteínas realizada com o auxílio do Programa STRING, a PSP-I está intimamente relacionada com a PSP-II, corroborando com o exposto anteriormente; a Seminal plasma protein pB1 (BSP1) interage com a Seminal plasma sperm motility inhibitor (SPMI) e com a Carbohydrate-binding protein (AWN); a Beta-hexosaminidase (HEXB) interage com a HEXA, ENSSCG, CHIT1 e CHIA, e essas interagem entre si. A Serum Albumin (ALB) interage com a serotransferrina (TF) e com a Mitogen-activated protein-kinase (MAPK3), que interage com a Heat Shock protein HSP 90-alpha (HSPA1A) e a Heat Shock 90 kDa protein1B (HSPCB), ambas relacionadas à alpha crystallin (CRYAB), que faz interações com outras Heats Shocks (Figura 1).

A Serum albumin é constituinte comum no plasma seminal no plasma seminal suíno e se apresenta como isoformas de alta massa molecular (76,1-78 kDa), atuando na proteção espermática contra o estresse oxidativo causado pela peroxidação lipídica. Essa proteína parece também atuar em conjunto com superóxido dismutase e glutadiona peroxidase, possuindo ação antioxidante (Murase et al., 2007). Na análise pelo STRING, essa proteína interage com a serotrasnferrina (TF), uma proteína que é secretada por células de Sertoli, epitélio seminífero e glândulas acessórias, carrega o ferro e evita a peroxidação lipídica, possuindo ação antimicrobiana contra microorganismos patogênicos (Farnaud et al., 2003). A Serum albumin também interage com Mitogen-activated protein kinase (MAPK3), uma enzima que parece estar relacionada com a ativação do promotor LHb pelo GnRH, possibilitando a formação da subunidade beta do LH (Yamada et al., 2004). A MAPK 3 apresentou-se relacionada à HSF1 e HSPCB, Heat shock proteins, que têm função de chaperones em condições fisiológicas e são importantes para o mecanismo de defesa celular, preservando o ambiente celular nos ambientes mais adversos; elas são preferencialmente expressas em resposta à estresse de hipertermia, reativos livres de oxigênio, metais pesados, etanol, na inflamação e na infecção (Neuer et al., 2000). As alfa e beta-crystallins (gene CRYAB) também foram mencionadas pelo programa STRING como componente dessa rede de interações, interagindo com três HSPs, HSPCB, HSPA1B e HSF1. Acunzo et al. (2012) relatam que as cristalinas são pequenas Heat shock proteins (sHSP) que são expressas em condições ambientais desfavoráveis e estão envolvidas nas vias de necrose, apoptose e autofagia; relacionadas a nível molecular com a prevenção da agregação de proteínas desnaturadas, regulação da atividade de caspases, regulação do estado redox intracelular, polimerização da actina e degradação de proteínas. Halliwell et al. (1999) mencionaram que

em sistemas aeróbicos, é crucial o equilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas e a capacidade antioxidante. Ocorre injúria celular quando este equilíbrio é perdido, resultando em estresse oxidativo. Aitken et al. (1995) sugeriram que o espermatozoide possui limitada capacidade de biossíntese e o plasma seminal exerce importante função protetora contra os danos causados pelas ROS geradas pelos fagócitos e pelo próprio espermatozoide.

A Beta-hexosaminidase (HEXB) teve interações com HEXA, CHIA, CHIT1 e ENSSCG, como observado no STRING. Essa proteína diversas propriedades, dentre elas a de ligação a proteínas por interações seletivas e não covalentes para a formação de homodímeros e heterodímeros e pode estar relacionada com a ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito em humanos, como sugerido em experimento *in vitro* realizado por Miranda et al. (2000). A correlação da atividade dessa proteínas com patologias particulares, sugerem a possível relação com a capacidade fecundante (Menendez-Helman et al., 2015). A interação da rede pode ser devida ao envolvimento no metabolismo de carboidratos, comum a todas as proteínas (conforme o banco de dados do Uniprot).

O programa STRING nos mostra interações entre AWN, BSP-1 e SPMI. O AWN codifica a Carbohydrate-binding protein AWN, que possui o domínio CUB, pertence à família das espermadesinas, possuindo importante função na ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito, devido à propriedade de ligação aos carboidratos. SPMI codifica a proteína Seminal Plasma Motility inhibitor, que também possui domínio CUB, pertence ao grupo AQN-3 e possui similaridades com as espermadesinas; Martin et al. (1995), realizando experimento com sêmen humano, sugeriram que o SPMI está altamente associado aos componentes do coágulo seminal como formas ativas que podem afetar a motilidade seminal. O gene BSP1 codifica a Seminal plasma protein, que possui domínios fibronectina tipo I e II e pertence à família das Plasma Protein Family, exerce função no evento de capacitação espermática e possui capacidade de formar um complexo com a espermadesina AQN-1, que possui atividade de ligação a fosforilcolina; essa proteína, da mesma forma que a Carbohydrate-binding protein AWN, possui capacidade de ligação à heparina. Todas as proteínas envolvidas nessa rede exercem função na fertilização (conforme o banco de dados do UniProt).

CONCLUSÕES

No presente estudo conclui-se que as estações climáticas do ano influenciam a qualidade do sêmen, e que na região no qual o experimento foi realizado, no inverno houve maior alteração na morfologia espermática em relação ao verão, com mais defeitos espermáticos maiores e totais, porém esses valores ainda se mostram dentro dos padrões de qualidade seminal preconizados para a espécie.

Em relação à motilidade espermática progressiva, vigor e concentração espermática, não sofrem influência das estações climáticas do ano.

Importantes proteínas do plasma seminal de varrões da raça Piau foram identificadas e validadas, destacando-se as espermadesinas. Foram reportadas correlações significativas entre as características seminais e alguns spots. Ao longo das estações do ano, dez spots foram observados como diferencialmente abundantes.

Tabela 07 – Identificação de proteínas extraídas do plasma seminal de varrões da raça piau pelo MASCOT.

Match ID	Nome da Proteína	Banco de dados	Número de acesso	Score de identificação (MS/MS)	Cobertura da sequência MASCOT	Teórico		Experimental		NPI	Sequência dos peptídeos			
						Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico	Massa Molecular (kDa)	Ponto isoelétrico					
0	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	313	36%	14,719	8,3	9,6	9,2	4	LTDDYGTIFTYK			
												TECVWTLQVDPK		
												FCEGLSILNR		
01	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	59	7%	14,7	8,3	20,9	9,1	1	DSGHPASPYEIIFLR			
												FCEGLSILNR		
02	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	312	37%	15,0	8,9	15,3	9,9	4	INGPDECGR			
														NLCTWTILMKPDQK
														MAIPYLNLAGCK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK			
02	Major seminal glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	68	18%	14,7	8,3	15,3	9,9	2	FCEGLSILNR			
														DSGHPASPYEIIFLR
02	Carbohydrate-binding protein AWN	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P26776	177	30%	16,9	9,3	15,3	9,9	3	VKPHFHVLAIPPLNLSCGK			
														EYVELLDGPPGSEIIGK

											ICGGISLVFR
02	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	131	22%	15,3	9,1	15,3	9,9	2	NYSGWISYYK
											DSHHPASSFNVYFYGIPQGAK
03	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	303	37%	15,0	8,9	17,0	9,9	4	INGPDECGR
											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNACGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK
03	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	189	22%	15,3	9,1	17,0	9,9	2	NYSGWISYYK
											DSHHPASSFNVYFYGIPQGAK
03	Carbohydrate-binding protein AWN	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P26776	34	6%	16,9	9,3	17,0	9,9	1	ICGGISLVFR
03	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	60	11%	14,7	8,3	17,0	9,9	1	DSGHPASPYEIIFLR
04	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	418	46%	14,7	8,3	16,2	9,1	5	LTDDYGTIFTYK
											TECWTLQVDPK
											EYVEILEGAPGSK
											FCEGLSILNR
											DSGHPASPYEIIFLR
05	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	165	37%	15,0	8,9	12,7	9,9	4	INGPDECGR

UNIPROT											
											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNLAGCK
											EYVEVFDGLLSGSPSYGK.L
05	Seminal plasma protein pB1	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P80964	45	6%	15,8	8,4	12,7	9,9	1	CALPFIFR
07	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	382	36%	14,7	8,3	17,4	7,9	4	LTDDYGTIFTYK
											TECVWTLQVDPK
											FCEGLSILNR
											DSGHPASPYEIIIFLR
08	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	61	18%	14,7	8,3	17,3	7,1	2	FCEGLSILNR
											DSGHPASPYEIIIFLR
08	Alpha-crystallin A chain	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P02475	53	12%	19,8	5,8	17,3	7,1	2	ALGPFYPSR
											VPSGVDAGHSER
08	Alpha-crystallin B chain	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	Q7M2W6	44	6%	20,1	6,8	17,3	7,1	1	RPFFPFHSPSR
11	Serum albumin	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	F1RUN2	503	19%	71,6	5,9	71,5	6,4	9	FKDLGEQYFK
											DVFLGTFLYEYSR
											RHPDYSVSLLLR

											FQPLVDEPK
											LGEYGFQNALIVR
											KVPQVSTPTLVEVAR
											LSCAEDYLSLVLNR
											RPCFSALTPDETYKPK
											HKPHATEEQLR
11	Alpha-fetoprotein	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	Q8MJ76	36	1%	70,4	5,5	71,5	6,4	1	YIYEIAR
12	Beta-hexosaminidase	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	D0G6X8	229	11%	62,5	7,3	69,4	7,4	5	AGSSCEILQEAFR
											GSYSLSHVYTPNDVR
											DLLTPCYR
											LQSFYVFK
											NYYEVEPQDFPGSDKER
13	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	266	37%	15,0	8,9	55,9	9,9	4	INGPDECGR
											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNLAGGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK
14	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	277	37%	15,0	8,9	56,8	9,7	4	INGPDECGR
											NLCTWTILMKPDQK

											MAIPYLNLAGGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK
15	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	253	37%	15,0	8,9	41,6	9,7	4	INGPDECGR
											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNLAGGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK
16	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	242	37%	15,0	8,9	41,5	9,9	4	INGPDECGR
											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNLAGGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK
17	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	377	48	15,3	9,1	31,5	9,8	4	NYSGWISYYK
											ALTTNCVWTIEMKPGHK
											VCGGTTFVYQSSSNVATVK
											DSHHPASSFNVYFYGIPQGAK
17	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	292	37%	15,0	8,9	31,5	9,8	4	INGPDECGR
											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNLAGGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK

17	Carbohydrate-binding protein AWN	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P26776	100	30%	16,9	9,3	31,5	9,8	4	VKPHFHVVLAIPPLNLSCGK EYVELLDGPPGSEIIGK ICGGISLVFR
18	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	52	18%	14,7	8,3	14,5	7,9	2	FCEGLSILNR DSGHPASPYEIIFLR
19	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	66	18%	14,7	8,3	14,1	9,2	2	FCEGLSILNR DSGHPASPYEIIFLR
20	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	151	18%	14,7	8,3	18,0	9,1	2	FCEGLSILNR DSGHPASPYEIIFLR
21	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	162	18%	14,7	8,3	20,4	7,9	2	FCEGLSILNR DSGHPASPYEIIFLR
23	Family with sequence similarity 160 member B2	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	F1RMC0	29	1%	82,6	5,6	55,4	4,3	1	VPQFPGKLLLVR
26	Family with sequence similarity 160 member B2	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	F1RMC0	33	1%	82,6	5,6	53,8	5,6	1	VPQFPGKLLLVR
37	Beta-hexosaminidase	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	D0G6X8	98	5%	62,5	7,3	68,8	7,8	3	ANTVWGALR GSYSLSHVYTPNDVR

											DLLTPCY
38	Beta-hexosaminidase	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	D0G6X8	314	18%	62,5	7,3	68,9	7,6	9	AGSSCEILQEAFR
											ANTVWGALR
											GSYSLSHVYTPNDVR
											VMPEFDTPGHSR
											DLLTPCYR
											LQSFYVFK
											RPIVWQEAFDGR
											NYYEVEPQDFPGSDKER
											DIHDAYS R
39	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	34	11%	14,7	8,3	14,5	7,1	1	DSGHPASPYEIIIFLR
44	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	91	18%	14,7	8,3	17,2	8,5	2	FCEGLSILNR
											DSGHPASPYEIIIFLR
48	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	37	11%	14,7	8,3	32,5	9,2	1	DSGHPASPYEIIIFLR
51	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	39	18%	14,7	8,3	13,7	3,2	2	FCEGLSILNR
											DSGHPASPYEIIIFLR
55	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	305	37%	15,0	8,9	19,1	9,8	4	INGPDECGR

											NLCTWTILMKPDQK
											MAIPYLNLCAGK
											EYVEVFDGLLSGPSYGK
55	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	297	48%	15,3	9,1	19,1	9,8	4	NYSGWISYYK
											ALTTNCVWTIEMKPGHK
											VCGGTTFVYQSSSNVATVK
											DSHHPASSFNVYFYGIPQGAK
56	Seminal plasma acrosin inhibitor A1	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P00999	61	27%	7,9	9,3	8,9	9,9	2	SHLFFCTR
											FDFGHWGHCR
57	Alpha-crystallin A chain	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P02475	64	12%	19,8	5,8	17,9	6,3	2	ALGPFYPSR
											VPSGVDAGHSER

Tabela 08 – Identificação de proteínas extraídas do plasma seminal de varrões da raça piau (com validação pelo Scaffold).

MatchID	Nome da Proteína	Banco de dados	Número de acesso	Score de identificação (MS/MS)	Prob. (1)	Cobertura da sequência	Teórico		Experimental		NPIV (3)	Sequência dos peptídeos	Prob. (2)
							Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico			
0	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	313	100%	37%	14,7	8,3	9,6	9,2	4	LTDDYGTIFTYK	95%
												TECVWTLQVDPK	95%
												FCEGLSILNR	95%
												DSGHPASPYEIIIFLR	95%
01	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	59	95%	8%	14,7	8,3	20,9	9,1	1	FCEGLSILNR	95%
02	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	312	100%	38%	15,0	8,9	15,3	9,9	4	INGPDECGR	94%
												NLCTWTILMKPDQK	95%
												MAIPYLNLCGK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
02	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	68	98%	11%	14,7	8,3	15,3	9,9	1	DSGHPASPYEIIIFLR	95%
02	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	131	100%	23%	15,3	9,1	15,3	9,9	2	NYSGWISYYK	92%
												DSHHPASSFNVYFYGIP QGAK	95%
02	Carbohydrate-binding protein AWN	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P26776	177	100%	31%	16,9	9,3	15,3	9,9	3	VKPHFHVLAIPPLNLSC GK	95%
												EYVELLDGPPGSEIIGK	95%

												ICGGISLVFR	95%
03	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	303	100%	38%	15,0	8,9	17,0	9,9	4	INGPDECGR	93%
												NLCTWTILMKPDQK	95%
												MAIPYLNLACGK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
03	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	60	90%	11%	14,7	8,3	17,0	9,9	1	DSGHPASPYEIIIFLR	90%
03	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	189	100%	23%	15,3	9,1	17,0	9,9	2	DSHHPASSFNVYFYGIP QGAK	95%
												NYSGWISYYK	95%
04	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	418	100%	47%	14,7	8,3	16,2	9,1	5	LTDDYGTIFTYK	95%
												TECVWLQVDPK	95%
												EYVEILEGAPGSK	95%
												FCEGLSILNR	95%
												DSGHPASPYEIIIFLR	95%
05	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	165	100%	12%	15,0	8,9	12,7	9,9	1	EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
05	Seminal plasma protein pB1	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P80964	45	95%	6%	15,8	8,4	12,7	9,9	1	CALPFIFR	95%
07	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	382	100%	37%	14,7	8,3	17,4	7,9	4	LTDDYGTIFTYK	95%
												TECVWLQVDPK	95%

												FCEGLSILNR	95%
												DSGHPASPYEIIIFLR	95%
08	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	61	95%	11%	14,7	8,3	17,3	7,1	1	DSGHPASPYEIIIFLR	95%
08	Alpha-crystallin A chain	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P02475	53	90%	5%	19,8	5,8	17,3	7,1	1	ALGPFYPSR	90%
08	Alpha-crystallin B chain	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	Q7M2W6	44	95%	6%	20,1	6,8	17,3	7,1	1	RPFPPFHSPSR	95%
11	Serum albumin	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	F1RUN2	503	100%	13%	71,6	5,9	71,5	6,4	6	FKDLGEQYFK	95%
												DVFLGTFLYEYSR	95%
												LGEYGFQNALIVR	95%
												KVPQVSTPTLVEVAR	95%
												RPCFSALTPDETYKPK	95%
												HKPHATEEQLR	95%
12	Beta-hexosaminidase	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	D0G6X8	229	100%	6%	62,5	7,3	69,4	7,4	2	GSYSLSHVYTPNDVR	95%
												NYEVEPQDFPGSDKER	95%
13	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	266	100%	31%	15,0	8,9	56,0	9,9	3	NLCTWTILMKPDQK	95%
												MAIPYLNLAGCK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%

14	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	277	100%	38%	15,0	8,9	56,8	9,7	4	INGPDECGR	90%
												NLCTWTILMKPDQK	95%
												MAIPYLNLAGCK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
15	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	253	100%	31%	15,0	8,9	41,6	9,7	3	NLCTWTILMKPDQK	91%
												MAIPYLNLAGCK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
16	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	242	100%	31%	15,0	8,9	41,5	9,9	3	NLCTWTILMKPDQK	90%
												MAIPYLNLAGCK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
17	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	292	100%	31%	15,0	8,9	31,5	9,8	3	NLCTWTILMKPDQK	95%
												MAIPYLNLAGCK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
18	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	52	95%	11%	14,7	8,3	14,5	7,9	1	DSGHPASPYEIIIFLR	95%
19	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	66	99%	8%	14,7	8,3	14,1	9,2	1	FCEGLSILNR	91%
20	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	151	100%	19%	14,7	8,3	18,0	9,1	2	FCEGLSILNR	95%
												DSGHPASPYEIIIFLR	95%

21	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	162	100%	19%	14,7	8,3	20,4	7,9	2	FCEGLSILNR	95%
												DSGHPASPYEIIIFLR	95%
37	Beta-hexosaminidase	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	D0G6X8	98	100%	3%	62,5	7,3	68,8	7,8	1	GSYSLSHVYTPNDVR	95%
38	Beta-hexosaminidase	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	D0G6X8	314	100%	10%	62,5	7,3	68,9	7,6	4	AGSSCEILQEAFR	93%
												ANTVWGALR	91%
												GSYSLSHVYTPNDVR	95%
												NYVEVEPQDFPGSDKER	95%
39	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	34	90%	11%	14,7	8,3	14,5	7,1	1	DSGHPASPYEIIIFLR	90%
44	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	91	99%	11%	14,7	8,3	17,2	8,5	1	DSGHPASPYEIIIFLR	95%
48	Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35495	37	92%	11%	14,7	8,3	32,5	9,2	1	DSGHPASPYEIIIFLR	92%
55	Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P35496	305	100%	38%	15,0	8,9	19,1	9,8	4	INGPDECGR	95%
												NLCTWTILMKPDQK	95%
												MAIPYLNLCGK	95%
												EYVEVFDGLLSGPSYGK	95%
55	Seminal plasma sperm motility inhibitor	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	I7HJH6	297	100%	49%	15,2	9,1	19,1	9,8	4	NYSGWISYYK	95%
												ALTTNCVWTIEMKPGHK	95%

												VCGGTTFVYQSSSNVAT VK	95%
												DSHHPASSFNVYFYGIP QGAK	95%
56	Seminal plasma acrosin inhibitor A1	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P00999	61	98%	15%	7,9	9,3	8,9	9,9	1	FDFGHWGHCR	91%
57	Alpha-crystallin A chain	<i>Sus scrofa</i> / UNIPROT	P02475	64	95%	5%	19,8	5,8	17,9	6,3	1	ALGPFYPSR	95%

Legenda: (1) Probabilidade de identificação para proteína (Scaffold)
(2) Probabilidade de identificação para peptideo (Scaffold)
(3) NPIV – Número de peptídeos identificados e validados (Scaffol

Tabela 9 - Spots diferencialmente abundantes encontrados nas estações Primavera/Verão e Outono/Inverno.

Match ID	Identificação	Primavera/Verão	Outono/Inverno	MW	pI	Fold change	anova
3	I7HJH6 P35495 P35496	10.1076	4.83035	17	9,86	2.092519176	0.010202
10	NI	0.435143	0.10333	83	6,38	4.211197135	0.008177
17	P35496	6.76085	3.83573	31	9,81	1.762597993	0.008986
21	P35495	1.44171	0.743918	20	7,89	1.937995854	0.021303
34	NI	0.171044	0.0626182	79	7,43	2.731538115	0.040018
35	NI	0.281822	0.0934223	78	7,58	3.016645919	0.002646
36	NI	0.57984	0.141869	77	7,77	4.087150822	0.009436
52	NI	0.663756	0.326563	15	3,24	2.032551146	0.042163
1	P35495	0.326563	0.663756	20	9,13	2.032551146	0.049039
51	NI	0.328356	0.828822	13	3,22	2.524156708	0.021807

*NI: spots que não tiveram identificação e validação de proteínas por MASCOT e SCAFFOLD

Figura 1. Spots diferencialmente abundantes ao longo das estações do ano.

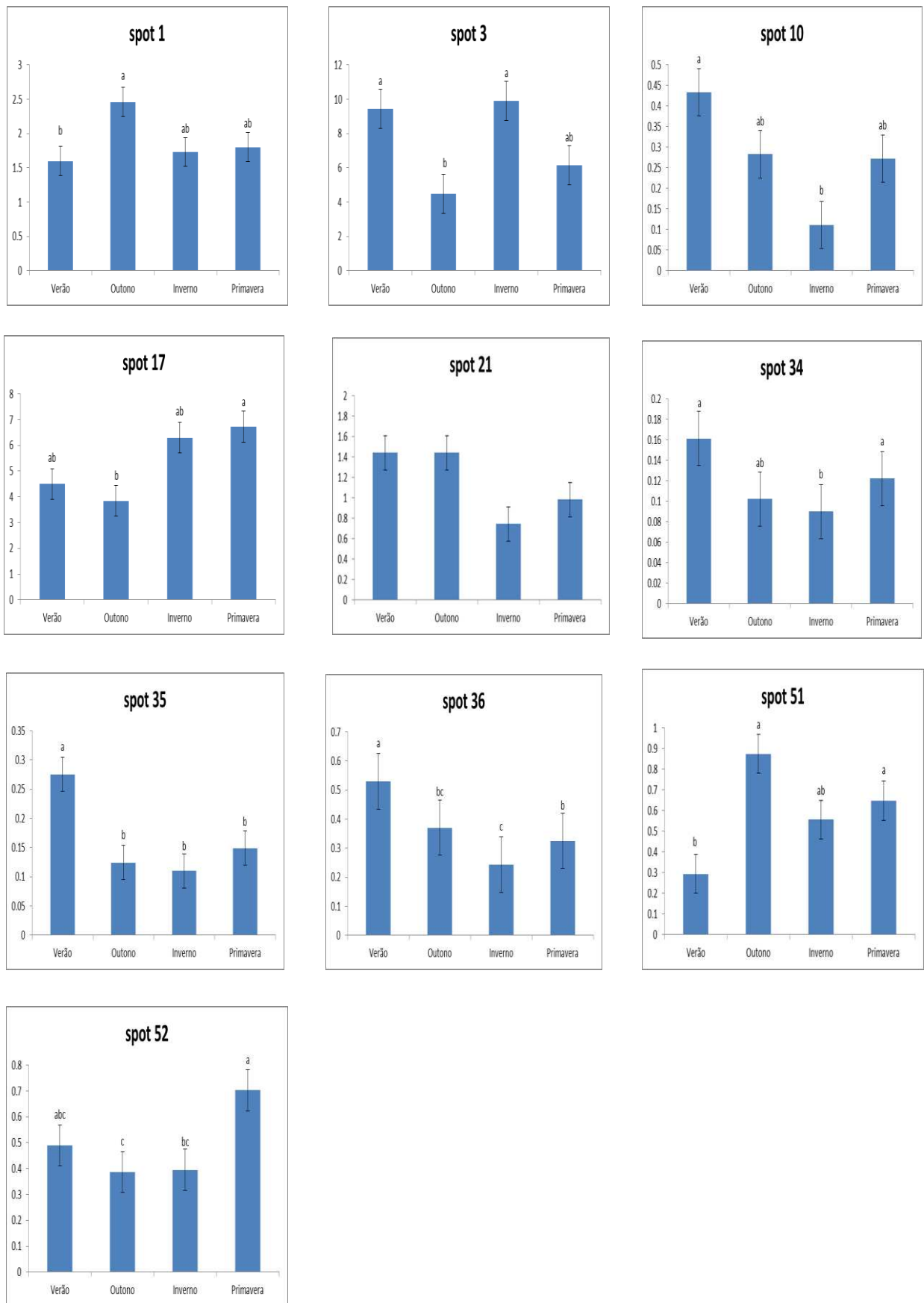


Tabela 10. Correlação simples de Pearson.

Parâmetros	SPOT 1	SPOT 2	SPOT 5	SPOT 8	SPOT 11	SPOT 12	SPOT 13	SPOT 14	SPOT 15	SPOT 16	SPOT 18	SPOT 19	SPOT 20	SPOT 21	SPOT 38	SPOT 39
IDDIAS	*	-0.52	-0.48	*	*	*	*	*	*	*	0.46	*	*	*	*	0.54
		0.02	0.03								0.04					0.01
VOLUME	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ASPECTO	*	*	*	*	0.61	*	-0.58	*	*	-0.56	*	*	*	*	*	*
					0.005		0.009			0.01						
PESOGEL	*	*	0.48	*	*	*	*	-0.51	-0.51	*	*	*	*	*	*	*
			0.04					0.02	0.02							
MOTILIDADE	*	*	0.53	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.47	*	*
			0.02											0.04		
VIGOR	*	0.63	0.57	*	*	*	*	-0.62	-0.46	*	*	*	*	*	*	*
		0.004	0.01					0.0049	0.05							
CONCML	*	*	*	*	*	0.63	*	-0.52	*	*	*	*	*	*	0.55	*
						0.0038		0.02							0.01	
CONCTOT	*	*	0.51	0.47	*	*	*	-0.62	-0.51	*	*	*	*	*	*	*
			0.02	0.04				0.0045	0.02							
MORFOLOGIA	*	*	*	*	-0.86	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
					<0.0001											
ACROSSOMA	-0.52											-0.46	-0.49			
	0.0009											0.05	0.03			

* Não houve correlação

IDDIAS – idade do animal em dias

CONCML- concentração espermática/mL

CONCTOT- concentração espermática total total (volume x CONCTOT)

MORFOLOGIA – patologias espermáticas

Figura 2. Processos Biológicos – Gene Ontology

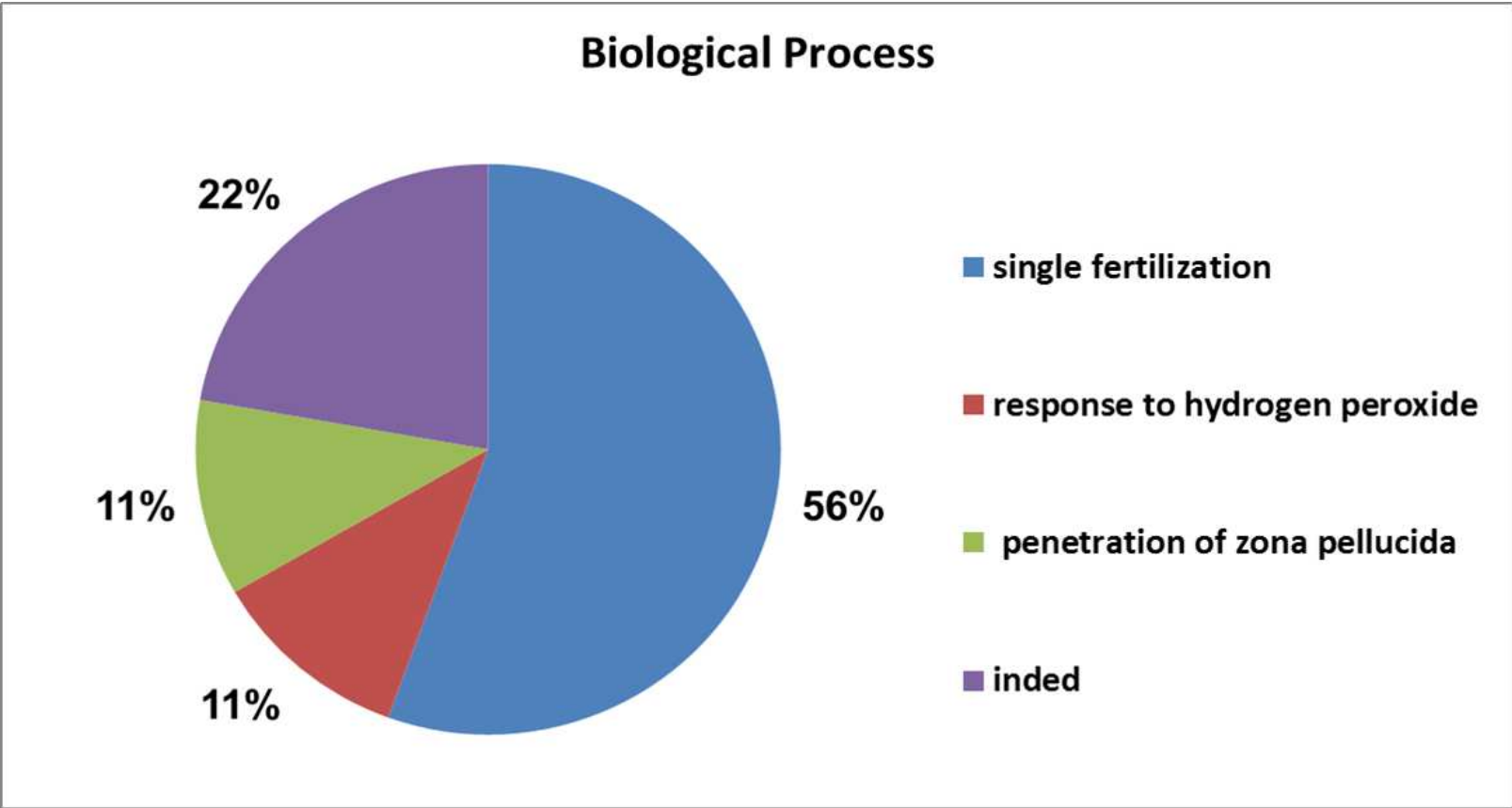


Figura 3. Função Molecular – Gene Ontology

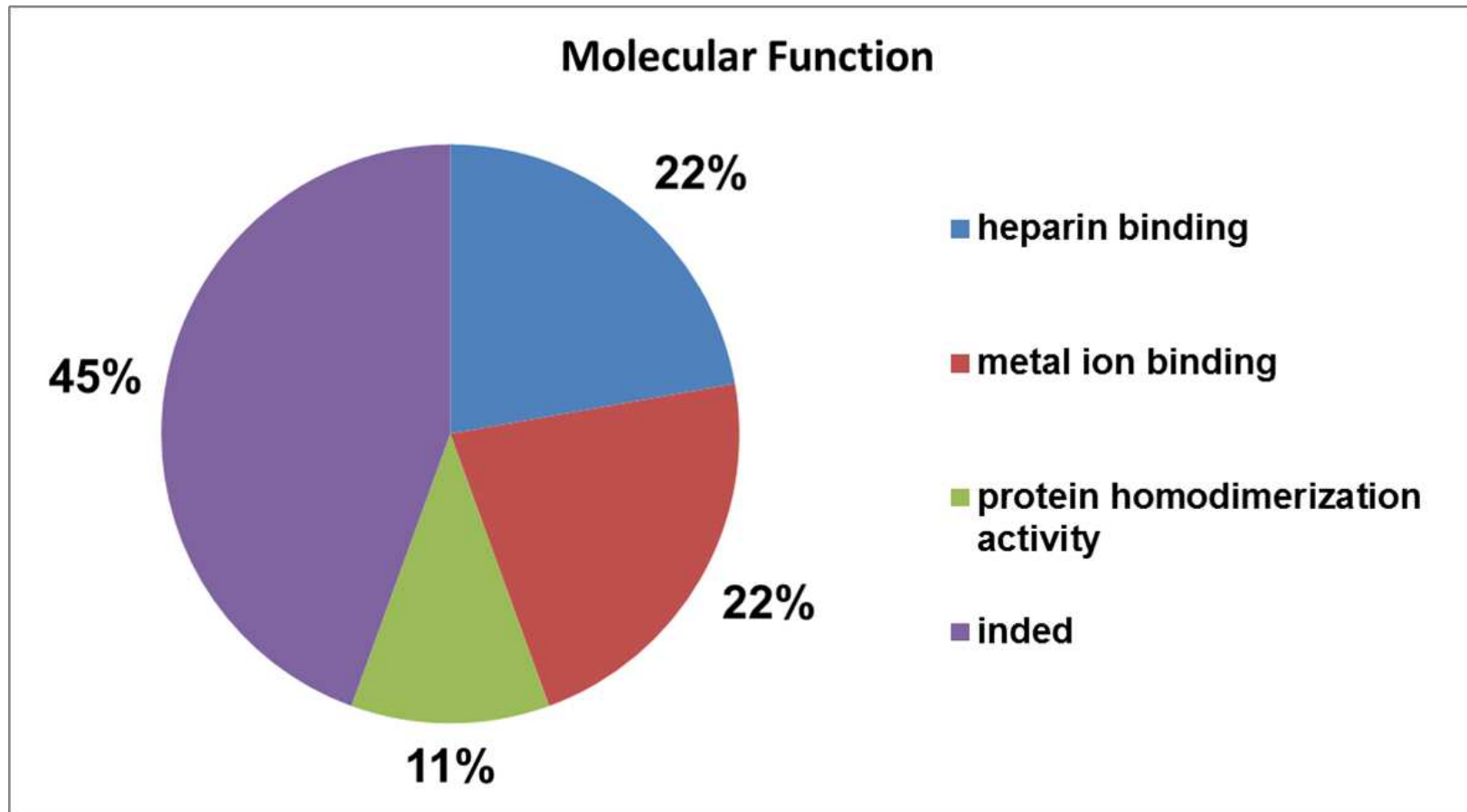


Figura 4. Componente Celular – Gene Ontology

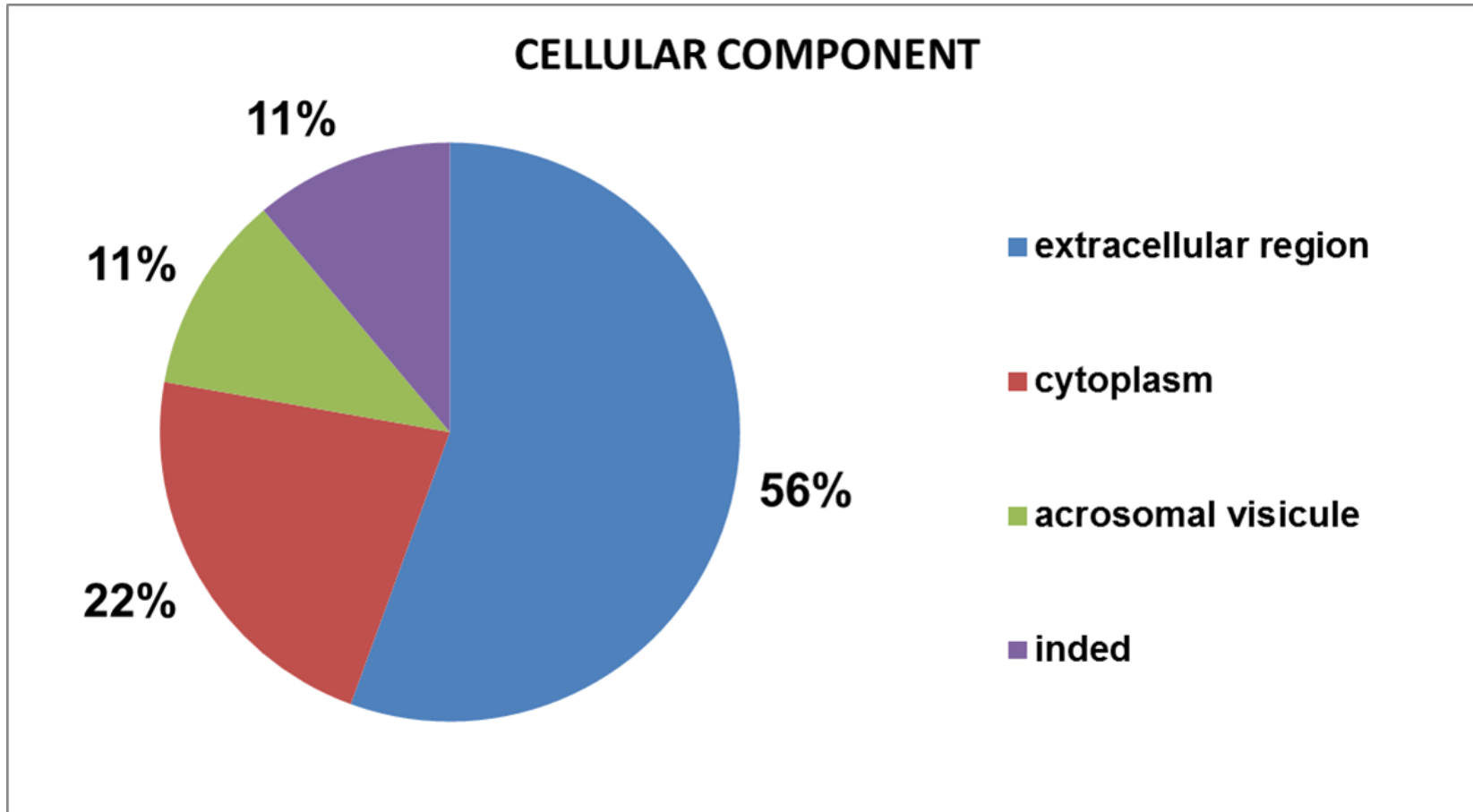
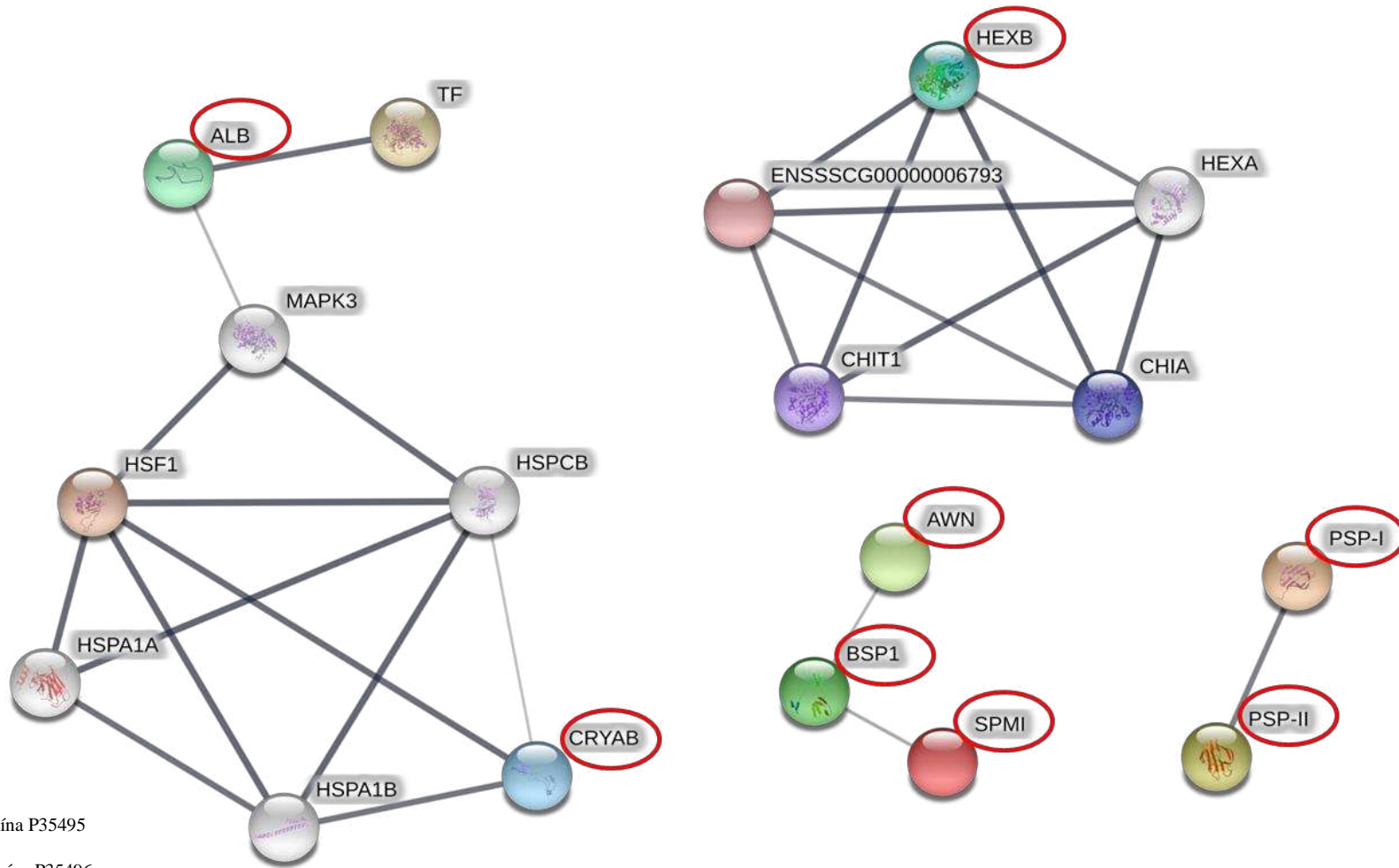


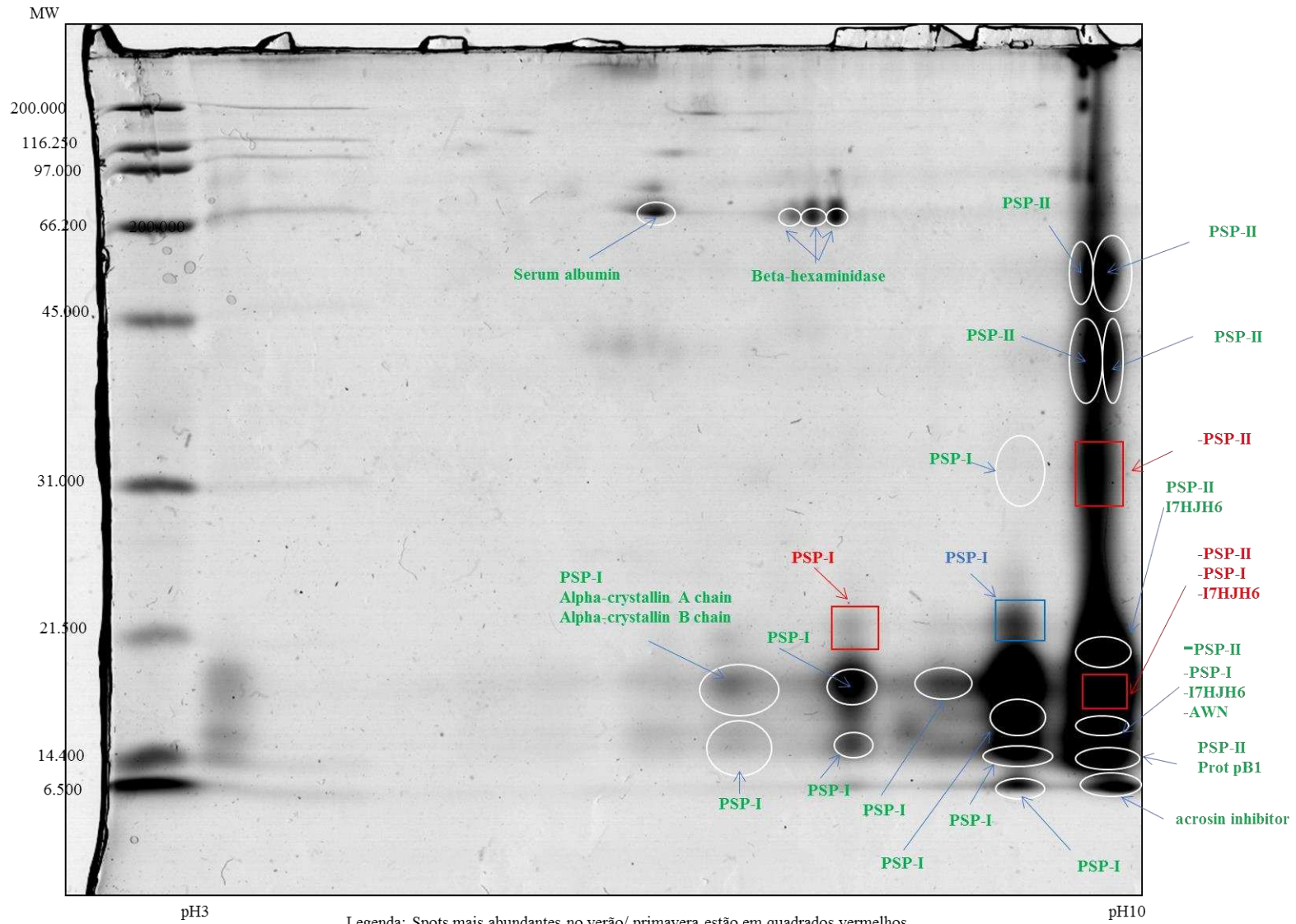
Figura 5. Rede de interações realizada pelo programa STRING.



Legenda:

- PSP-I- gene que codifica a proteína P35495
- PSP-II- gene que codifica a proteína P35496
- CRYAB- gene que codifica a proteína P02475
- CRYAB- gene que codifica a proteína Q7M2W6
- AWN- gene que codifica a proteína P26776
- BSP-I- gene que codifica a proteína P80964
- HEXB- gene que codifica a proteína DOG6X8
- ALB- gene que codifica a proteína FIRUN2

Figura 6. Spots que tiveram proteínas identificadas por Maccott e validadas por Scaffold



AGRADECIMENTOS

À CAPES, à FAPEMIG, à FINEP e ao CNPq, pelo apoio financeiro e ao NUBIOMOL-UFV por disponibilizar o uso do MALDI TOF TOF e softwares Mascot/ Scaffold para análise das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNZO, J.; KATSOGIANNOU, M.; ROCCHI, P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.44, p.1622-1631, 2012.

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

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215 (3), p.403-410, 1990.

BARBOSA, H.P.; PEREIRA, J.A.A.; COSTA, P.M.A. Exigências de proteína bruta para leitões na fase inicial de crescimento (5 a 15 kg de peso vivo). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 45-52, 1985.

BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L. S.; GUIMARAES, S. E. F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARAES, J.D. Criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau (Sus scrofa) submetido a três protocolos de congelamento. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.41, p.914-922, 2012a.

BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, R.O.; PEREIRA, J.V.T.N.; GUIMARÃES, JD. Características quantitativas e qualitativas do sêmen in natura de suínos da raça Piau. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, p. 1-17, 2012b.

BIANCHI, I.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.F.; CAVALCANTI, P.V.; KAEFERI, C.; CORRÊA, E.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, I.J.C.; CORRÊA, M.N. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, 2008.

BRADFORD, M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GIL, M.A.; CALVETE, J.J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARRILLA, I.; GARCIA, E.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E.A. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? **Journal of Andrology**, v.25, 1004–1012, 2004.

CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J.M.; GARCÍA EM, ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.A.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; EKWALL, H.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27 (6), p.766-73, 2006.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J.M.; GARCÍA, E.M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; CALVETE, J.J. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**, v.70, p.1352–1355, 2008.

CADAVID, V.G. **Parâmetros espermáticos e proteínas do plasma seminal de cachos e parâmetros reprodutivos de marrãs e porcas suplementados com minerais e vitaminas.** 2014. 241 f. Tese (doutorado em zootecnia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; RAIDA, M.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslation modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. **Federation of European Biochemical Societies**, v.365, p.179-182, 1995a.

CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TOPFERPETERSEN, E. Amino-acid-sequence of hsp-1, a major protein of stallion seminal plasma – effect of glycosylation on its heparin-binding and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**, v.310, p.615–622, 1995b.

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. Effects of Zn²⁺ and acidic pH. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v.272(21), p.5663-5670, 2005.

CAVALCANTI, S.S. **Produção de Suínos**. Campinas, SP: Instituto Campeiro de Ensino Agrícola, 453 p., 1984.

CBRA. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Third edition. Belo Horizonte: CBRA, 104p, 2013.

CENTURION, F.,VAZQUEZ, J.M., CALVETE, J.J., ROCA, J., SANZ, L., PARRILA, I.,GARCIA, E.M., MARTINEZ, E.A. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biology of.Reproduction**, v.69, p.640–646, 2003.

CEREMADES, T.; CARAVAJA, G.; HERNANDEZ, M. Freezing of boar semen is not affected by the addition of seminal plasma spermadhesins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.269, 2004.

CHACUR, M.G.M.; MIZUSAKI, K.T.; SANTOS, F.H.; CESARE, A.G.; GABRIEL FILHO, L.R.A.; OBA, E.; RAMOS, A.A. Influence of year season on semen characteristics and hormonal levels in Nelore and Simental bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.3, p.540-546, 2012.

CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, v.124, p.491-499, 2002.

CORCINI, C.D.; REMPEL, F.J.K.; PIGOZZO, R.; MOREIRA, F.; VARELA JÚNIOR, A.S.; GOULARTE, K.L.; BRUM, V.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA JR., T. Identificação de um fator de 28 KDa no plasma seminal associado à motilidade espermática de machos suínos. **Anais... 35° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado/ RS, 359-1, outubro de 2008.

CURI, S.M.; ARIAGNO, J.I.; CHENLO, P.H. Asthenozoospermia: analysis of a large population. **Archivo of Andrology**, v.49, p.343-349, 2003.

DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1200, p.48–54, 1994.

EGERSZEGI, I.; SARLÓS, P.; NAGY, S.Z.; TÓTH, P.; RÁTKY, J. Semen characteristics of Hungarian Mangalica boars. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.116, 2008.

FARNAUD S, EVANS RW. Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v.40, p.395–405, 2003.

FLOWERS, W.L. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility. **Swine News**, 2001.

FLOWERS, W.L. Selection for boar fertility and semen quality – the way ahead. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v.66, p.67-78, 2009.

FRASER, L.; STRZEZECK, J.; FILIPOWICZ, K.; MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; ZASIADCZYK, L. Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen. **Theriogenology**, v. 86 (3), p.806-816, 2016.

FRITZ, H.; SCHIESSLER, H.; SCHILL, W.B.; TSCHESCHE, H.; HEIMBURGER, N.; WALLNER, O.; REICH, E.; RIFKIN, D.; SHAW, E. Low molecular weight proteinase (acrosin) inhibitors from human and boar seminal plasma and spermatozoa and human cervical mucus-isolation, properties and biological aspects. **In: Proteases And biological control**, ed. By E. Reich, D.B. Rifkin, E. Shaw. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1975.

GARCIA, L.D.L.; BRITO, E.L.R.; SERPA, P.; GREGORY, J.; NATALINI, C.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M. Horse seminal plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? **Pferdeheilkunde**, v.30, p.557-560, 2014.

GARCIA, S.K.; BARBOSA, A.S. Características etiológicas, biométricas e seminais de varrões da raça Piau. **Arquivo Brasileiro Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.279-289, 1994.

HALLIWELL B Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. **Nutrition Reviews**, v.57, p. 104–113, 1999.

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

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; BOONE, W.R.; GRAY, S.L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v.59, n.2, p.330-337, 1998.

HERNANDEZ, M.; ROCA, J., GIL, M.A.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. **Theriogenology**, v.67, p.1436–45, 2007.

HOFFMAN, B. AND LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.89-98, 1999.

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. **Journal of Animal Science**, v.81 (4), p.432-7, 2010.

IRGANG, R. **Suínos de raças nativas: o interesse da pesquisa**. Suinocultura Industrial, v.87, p.13-20, 1986.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biology Macromolecular**, v.32, p.99-107, 2003.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, p. 255-266, 2004.

JOHNSON, H. D.; GOMES, W. R. Effect of elevated ambient temperature on lipid levels and cholesterol metabolism in the ram tests. **Journal of Animal Science**, v. 29, p. 469-475, 1969.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; SAACKE, R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the Bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-942, 1996.

KELLER, A.; NESVIZHSKII, A.I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v.74 (20), p.5383-5392, 2002.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KOIVISTO, M.B.; NOGUEIRA, G.P.; COSTA, M.T.A. Seasonal variations of morphological abnormalities in bovine spermatozoa. **In: SEMINAR ON ANIMAL REPRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY FOR LATIN AMERICA**, 4, 1998. Belém. **Proceedings...** Belém Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, v.2, p.50-56, 1998.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; PEKNICOVÁ, J.; JONÁKOVÁ, V. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, p.33-46, 2005.

KUNAVONGKRIT, A.; SURIYASOMBOOM, A.; LUNDEHEIM, N.; HEARD, T. W. AND EINARSSON, S. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. **Theriogenology**, v.63, p.657-667, 2005.

LEVIS, D. G. Production Management: Managing post-pubertal boars for optimum fertility. **Swine Medicine**, p.17-23, 1997.

MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.; SIMMEN, F.A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B.R.; VARNER, D.D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M.E.; MILLER, C.D.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T.L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and 5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.7 (2), p.648-654, 2002.

MANASKOVA, P.; LIBERDA, J.; TICHA, M.; JONAKOVA, V. Aggregated and Monomeric Forms of Proteins in Boar Seminal Plasma: Characterization and Binding Properties. **Folia Biologica (Praha)**, v.46, p.143-151, 2000.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109-119, 2002.

MARTIN, R.; GAGNON, C. Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: Association with semen coagulum. **Human Reproduction**, v.10(8), p.2192-2197, 1995.

MEDRANO, A. **The importance of individual variation in boar semen cryopreservation.** Ph.D. Thesis, University of London, London, UK; 1998.

MENENDEZ-HELMAN, R.J.; SANJURJO,C.; MIRANDA, P.V. Seminal plasma hexosaminidase in patients with normal and abnormal spermograms, **Iranian Journal Of Reproductive Medicine**, v.13(9), p.541–548, 2015.

MIRANDA P.V.; GONZÁLEZ-ECHEVERRÍA, F.; BLAQUIER, J.A.; MAHURAN, D.J.; TEZÓN, J.G. Evidence for the participation of beta-hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction in vitro, **Molecular Human Reproduction**, v.6(8), p.699-706, 2000.

MOURA, A.A.; CHAPMAN D.A.; KOC, H.; KILLIAN, G.J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2007.

NESVIZHSKII, A.I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; ABERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.75(17), p.4646-4658, 2003.

NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S.S. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, v.6(2), p.149-159, . 2000.

NIMTZ, M.; GRABENHORST, E.; CONRADT, H.S.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms. **European Journal of Biochemistry**, v.265, p.703–718, 1999.

NOVAK, S.; RUIZ-SANCHEZ, A.; DIXON, W.T.; FOXCROFT, G.R.; DYCK M.K. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. **Journal of Andrology**, v.31, p.188-200, 2010.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**, 4 ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. **Procedures of collections, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination**. Fort Collins: Colorado University, 125p, 1987.

PIGOZZO, R.; CORCINI, C.D.; VARELA JUNIOR, A.S.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA TJR. Relação entre a proteína com 22 KDa no plasma de sêmen suíno com a integridade de membrana. **In: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas**, 2008.

PINHEIRO, R.R.; MACHADO, R.; PINHEIRO, A.A.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. **IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 33, 1996. FORTALEZA, CE. **Anais**. Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.416-18, 1996.

PINHO, R.O.; LIMA, D.M.A.; SHIOMI, H.H.; SIQUEIRA, J.B.; SILVA, H.T.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Effect of different cryo-protectants on the viability of frozen/thawed semen from boars of the Piau breed. **Animal Reproduction Science**, v.146, p.187-192, 2014.

PINHO, R.O.; SHIOMI, H.H.; LIMA, D.M.A.; COSTA, E.V.; SANTOS, M.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.245-249, 2012.

PINHO, R.O.; SHIOMI, H.H.; LIMA, D.M.A.; COSTA, E.V.; CHAYA, A.Y.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Sexual behavior and seminal quality of Piau boars. **Journal of Veterinary Behavior**, v.8, p.357-361, 2013.

RAHMAN, M.S.; LEE, J.S.; KWON, W.S.; PANG, M.G. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. **International Journal of Endocrinology**. 2013:360986. doi:10.1155/2013/360986, 2013.

ROBERTS, S.J. **Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)**. 3rd. Ed. Edwards Brothers Inc. Michigan, 981p., 1986.

ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2692-2699, 2006.

ROMERO, A.; ROMÃO, M.J.; VARELA, P.F.; KOLLN, J.; DIAS, J.M.; CARVALHO, A.L.; SANZ, L.; TOFFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The crystal structure of two spermadhesins reveals the CUB domain fold. **Nature Structural Biology**, v. 4, p. 783–788, 1997.

RUTHERFURD, K.J.; SWIDEREK, K.M.; GREEN, C.B.; CHEN, S.; SHIVELY, J.E.; KWOK, S.C. Purification and characterization of PSP-I and PSP-II, two major proteins from porcine seminal plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.295, p.352–359, 1992.

SAEG, **Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas**. Viçosa-MG: UFV, 2007.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1(6), p.2856-2860, 2006.

SHIOMI, H.H.; PINHO, R.O.; LIMA, D.M.A.; SIQUEIRA, J.B.; SANTOS, M.C.R.; COSTA, E.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Cryopreservation of Piau-Breed Wild Boar Sperm: Assessment of Cooling Curves and Centrifugation Regimes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50 (4), p.545-53, 2015.

SILVA, A.R.; FERRAUDO, A.S.; PERECIN, D. Efeito da idade do touro e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças europeias e zebuínas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1218-1222, 2009.

SILVA, D.M. **Quantificação de IGF-I no plasma seminal de suínos e sua importância na utilização após o resfriamento e congelamento do sêmen**. Lavras: UFLA, 2010, 78p. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SMITH, T.T. The modulation of sperm function by oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, v.58, n.5, p.1102-1104, 1998.

SOLLERO, B.P., et al. Estrutura genética de cinco raças naturalizadas e comerciais de suínos do Brasil, João Pessoa, PB, 2006. **In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, 2006.

STRZEŃSK J, SAIZ-CIDONCHA F, WYSOCKI P, TYSKIEWICZ A, JASTRZĘBSKI. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports**, v. 22, p.255 – 266, 2002.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. **Biology of Reproduction**, v.58 (5), p.1105-1107, 1998.

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(5), p.956-74, 1996.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTER-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K.P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; MERING, C.V. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, 43:D447-52. Aquisição e Análise das imagens, 2014.

TAYLOR, J.F.; BEAN, B.; MARSHALL, C.E. Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.2703-2722, 1985.

TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA P.F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTA'LOVA, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, p.217–224, 1998.

TSCHESCHE, H.; KUPFER, S.; KLAUSER, R.; FINK, E.; FRITZ , H. Structure, Biochemistry and Comparative Aspects of Mammalian Seminal Plasma Acrosin Inhibitors. **Protides Biological Fluids**, v.23, p 255-266, 1976.

WADDINGTON, B.; PENITENTE-FILHO, J.M.; NEVES, JGS; PINHO, R.O.; CHAYA, A.Y.; MAITAN, P.P.; SILVEIRA, C.O.; NEVES, M.G.; GUIMARÃES, S.E.F.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D. Testosterone serum profile, semen characteristics and testicular biometry of Mangalarga Marchador stallions in a tropical environment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p.335–343, 2017.

YAMADA, Y.; YAMAMOTO, H.; YONEHARA, T.; KANASAKI, H.; NAKANISHI, H.;MIYAMOTO, E.; MIYAZAKI, K. Differential Activation of the Luteinizing Hormone b-Subunit Promoter by Activin and Gonadotropin-Releasing Hormone: A Role for the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in LbT2 Gonadotrophs. **Biology of Reproduction**, v.70, p.236–243, 2004.

ZASIADCZYK, L.; FRASER, L.; KORDAN, W.; WASILEWSKA, K. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. **Theriogenology**, v.83 (8), p.1287-1303, 2015.

**CAPÍTULO 2 - EFFECT OF CYCLODEXTRIN-LOADED CHOLESTEROL
CONJUGATES ON PLASMA MEMBRANE VIABILITY OF PIAU SWINE BREED
FROZEN/THAWED SPERMATOOA**

*Article published in the journal Cryobiology 73, in 2016.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates addition to freezing extenders on plasma membrane viability of frozen-thawed spermatozoa of the Piau swine breed. Twenty semen samples were used from five males. The freezing extender was based on lactose-egg yolk extender, added to 2 % glycerol, 3 % dimethylacetamide. The addition of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates was performed after centrifugation, when semen was diluted with the cooling extender. Four groups were subjected to the following treatment: without addition (group 1); 1.5 mg of cyclodextrin-loaded cholesterol /120x10⁶ sperm (group 2); 1.5 mg of cyclodextrin-loaded cholestanol /120x10⁶ sperm (group 3); 1.5 mg of cyclodextrin-loaded desmosterol /120x10⁶ sperm (group 4). To check post-thawing sperm quality sperm motility and sperm morphology evaluation were used. Additionally, to check sperm viability the hypoosmotic swelling test, supravital staining, and fluorescent assay were used. The mean values recorded for total sperm motility of semen immediately after thawing were 54.5±5.8, 55.5±5.3, 53.7±6.7, and 52.5±6.6 % respectively for groups one to four, without difference between themselves (p>0.05). Regarding fluorescent assay the results were 28.3±13.2, 26.9±12.2, 22.2±11.4, and 32.0±15.3 % respectively for groups one to four, also without difference between groups (p>0,05). Similarly, complementary tests for evaluating the integrity and functionality of the plasma membrane showed no difference between treatments (p>0.05). In conclusion, use of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates added to the plasma membrane of sperm did not demonstrate any additive effect on increasing and/or maintaining sperm motility.

Key-words: boars, cyclodextrin, plasma membrane, semen.

INTRODUCTION

Among the swine breeds at high risk of extinction, the Piau breed is one of them which still exists, therefore the maintenance of naturalized swine breeds is imperative, as such breeds present unique adaptation characteristics to Brazilian ecosystems, besides constituting potential sources of new genetic variants for the national swine breeding [45], making studies on swine semen cryopreservation of this breed essential.

Studies on semen cryopreservation over the last decades resulted in great improvements, especially those on evaluation of different cryoprotectants, freezing packaging, extenders and freezing/thawing curves [2].

Although cryopreservation may cause numerous damages to the sperm cell, most damages result from plasma membrane destabilization which occurs during freezing/ thawing processes [18, 21, 36]. The fact that swine spermatozoa submitted to freezing present higher particle aggregation than bovine spermatozoa, may be associated to higher sensibility to cryopreservation, which might imply greater damages from the lateral separation phase [14].

It is believed that part of the differences in sperm sensibility to thermal shock is related to lipid content. Moreover, swine sperm cryopreservation is associated to modifications in this lipid composition (phospholipids, fatty acids, cholesterol, and triglycerides) and consequent alterations in the head membrane fluidity [11, 51].

Thus, cholesterol, one of the main components of the sperm membrane, interferes with lipid behavior, enlarging its phase transition, preventing, thus sudden changes and minimizing phases separation. The swine sperm plasma membrane presents lower cholesterol/phospholipids ratio than that of spermatozoa of other species (0.26 over 0.36 in ovine and 0.38 in bovine), one possible responsible factor for higher thawing sensibility [14, 38, 39, 51].

In addition to cholesterol, the spermatozoa contain desmosterol (5.24-cholestadien-3 β -ol), an additional double-bond molecule, direct cholesterol biochemical precursor, identified in hamsters, monkeys and human spermatozoa, might be more abundant than cholesterol, besides having greater sperm capacitation inhibitory power [44].

Cholesterol loss of cryopreserved plasma membrane cells has been observed in swine (50%) and stallions (28%) [11, 31], and cholesterol loss may cause premature capacitation in cryopreserved cells, reducing the viability of cryopreserved sperm for female reproduction [8, 29]. Moore et al. [31] and Galantino-Homer et al. [16] demonstrated that addition of

cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates, during the cryopreservation process, allowed the cells to maintain an elevated cholesterol level. This high cholesterol concentration can prevent cells from suffering pre-maturation for capacitation, thus increasing viability.

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharide sugars, able to incorporate cholesterol in its structure center, in such way that allows its addition to the sperm plasma membrane. Thus, cyclodextrins are a precise and convenient method for altering cell cholesterol content [3, 15, 37].

Cyclodextrins can encapsulate hydrophobic compounds, such as cholesterol. They transport cholesterol from below the concentration gradient of the cell plasma membrane to inside the hydrophobic region during cell culture incubation [55] resulting in an increase in membrane cholesterol levels [29, 31, 39]. This cholesterol removal causes alterations in the membrane structure and functionality [3, 33]. When cyclodextrins are incubated with spermatozoa, they mediate cholesterol removal inducing capacitation [29, 50].

Cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates have been used to increase bovine [1, 28, 33, 39], equine [31, 46, 48], small ruminants [30] and swine sperm viability [8, 16, 25, 47, 54].

Thus, the objective of this study was to investigate the effect of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates addition to freezing extenders on plasma membrane viability of frozen-thawed spermatozoa of the Piau swine breed.

MATERIAL AND METHODS

Location

The study was conducted at the Genetic Improvement Pig Farm of the Department of Animal Science at the Federal University of Viçosa-MG (DZO/UFV) from March to April of 2012. The Pig Farm is located in Viçosa, in the Zona da Mata Region of Minas Gerais State, Brazil, located at 20°45'45" south latitude and 42°52'04" to the west of Greenwich, with mean altitude of 752 m, annual mean temperature of 20.9 °C, annual rainfall index of 1,203 mm³ and climate of CWA type (dry winter and rainy summer) by Köeppen classification.

Animals and semen collection

Four semen ejaculates from five adult boars of the Piau breed, suitable for reproduction by breeding soundness evaluation were used, totalizing 20 samples. Semen collections were carried out using the hand-gloved method [19] with the aid of a mobile

dummy or a female in estrous. The semen-rich fraction was collected in disposable sterilized 700 mL plastic cups, protected by thermal packaging previously heated at 38 °C, with double gases layer, fixed to the cup with a string, in order to retain the gelatinous fraction of the semen.

Total sperm motility and sperm vigor tests were carried out placing 10 µL semen between the slide and cover slip pre-heated to 38 °C, analyzed under light microscopy at 200 to 400x magnification.

Preparation of cyclodextrin-loaded cholesterol, cholestanol or desmosterol solutions

Methyl-β-cyclodextrin (Sigma-Aldrich®) was loaded with cholesterol or cholestanol (Sigma-Aldrich®) according to the methodology of Purdy and Graham [39], 200 mg cholesterol (or cholestanol) were diluted to 1 mL in chloroform (Sigma-Aldrich®) in a glass tube. In another glass tube, 1g methyl-β-cyclodextrin was diluted to 2 mL methanol (Sigma-Aldrich®). Next, 0.45 mL of cholesterol and chloroform solution was added to the cyclodextrin solution and homogenized until clearing the solution. Subsequently, the solution was placed in a glass Petri dish and the solvents removed by evaporation using a heating dish at 40 °C for 48 h. The resulting solution crystals were removed from the dish by scraping using a spatula and stocked in glass tubes at 22 °C.

For the desmosterol solution, the methodology described by Azevedo [4] was used; 10 mg desmosterol was dissolved in 0.5 mL chloroform, following then the same procedures used for cholesterol.

The cyclodextrin-loaded cholesterol (CLC) working solution was prepared by adding 50 mg CLC to 1 mL BTS (Beltsville Thawing Solution; Bio Pig - Magapor®) at 37 °C with subsequent homogenization using a vortex agitator. This solution was kept frozen at -80 °C until use.

Semen cryopreservation and treatments

For semen cryopreservation the methodology described by Bianchi et al. [7] was used with some modifications. The semen-rich fraction was diluted 1:1 BTS and kept at 22 °C for 60 min. Subsequently it was cooled to 15 °C for 60 minutes in a refrigerator fitted with controlled temperature and, then centrifuged at 800G for 10 minutes.

After centrifugation, the supernatant was discarded and the spermatozoa pellet re-suspended with cooling extender (80% β-lactose solution, 20% egg yolk and 100 µg/mL

kanamycin sulphate, Sigma-Aldrich®). After spermatozoa re-dilution with cooling extender, each ejaculate was divided into four groups:

- Group 1: control group, no cyclodextrin addition;
- Group 2: addition of 1.5 mg of cyclodextrin-loaded cholesterol/120x10⁶ sperm;
- Group 3: addition of 1.5 mg of cyclodextrin-loaded cholestanol/120x10⁶ sperm;
- Group 4: addition of 1.5 mg of cyclodextrin-loaded desmosterol/120x10⁶ sperm.

The groups were incubated for 15 minutes at 15°C to allow component incorporation and then, kept at 5 °C in a refrigerator for 90 min. Next, the freezing extender was prepared based on cooling extender, consisting of 2% glycerol and 3% dimethylacetamide (83.5 mL of colling extender + 1.5 mL Orvus-ex-paste + 6 mL glycerol + 9 mL dimethylacetamide; Sigma-Aldrich®) was added to a final concentration of 200x10⁶ spermatozoa/straw and stored in 0.5 mL straws.

After storage, straws were frozen horizontally, 5 cm above the liquid nitrogen vapor (-120 °C) for 20 min and then submerged in liquid nitrogen (-196 °C).

Thawing and complementary tests

The semen samples were thawed in water bath at 38 °C, for 20 seconds and re-suspended with 1.25 mL BTS extender [26]. The thermo-resistance test (TRT) was carried out by post-thawing semen incubation in water bath at 38 °C, for 120 min, evaluating motility, sperm vigor and percentage of live sperm by supravital staining, immediately after thawing and every 30 minutes up to 120 minutes of test.

For hypoosmotic test evaluation, 100 µL of thawed semen in BTS extender was incubated at 38 °C for 30 minutes in 100 mOsm/Kg sucrose solution [17]. After incubation, samples were fixed in 0.5 mL buffered formol-saline solution.

Subsequently, 20 µL of the solution was placed between a slide and coverslip for counting 100 spermatozoa, in phase contrast microscopy under 1000x magnification. The cells were classified as for the presence or not of coiled tails and results expressed in percentage, using the formula: Reactive sperm to hypoosmotic test (%) = (% alterations in sperm tail region after hypoosmotic test) – (% alterations in sperm tail region before hypoosmotic test) [27].

The evaluation of live and dead cells was carried out by the supravital staining test using eosin (1%) and nigrosin (5%) solution, as described by Bamba [6]. For that, a sample

of 10 μL of fresh semen was homogenized with 10 μL stain, on a pre-heated slide at 37 °C. Next, a smear was made on the slide, and after 20 to 30 seconds, a total of 100 cells were counted under optical microscopy under 200x magnification, considering live the non-stained cells, and dead the reddish-pink stained ones.

The evaluation of sperm plasma membranes of frozen/thawed semen samples was carried out with association of two fluorescent probes (carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide), according Harrison and Vickers [20]. The semen samples were thawed in water bath at 37°C and incubated for eight min in presence of the fluorescent probes. Subsequently, 100 sperm were counted, and classified as intact or injured in epifluorescence microscopy. Intact sperms are stained by the carboxyfluorescein diacetate (green all over its extension) and injured ones are stained in red.

In a 1.5 mL plastic tube (eppendorph®) containing 1 mL of buffered formol-saline solution, ejaculate fractions were added to smudge the solution for sperm morphological analysis by wet preparation, using phase contrast microscopy at 1250x magnification (under a drop of immersion oil). Two hundred cells were analyzed per ejaculate, determining the percentage of normal sperm and acrosome, midpiece and tail abnormalities, as determined by the Brazilian College of Animal Reproduction [10] and classified as major (MJD), minor (MID) and total sperm defects (TD), according to Blom [9].

Gas Chromatography

The incorporation analysis of cholesterol and its conjugates was made by gas chromatography technique. For this purpose, a pallet of each treatment was thawed in a water bath at 37°C for 20 seconds and conditioned in 1.5 mL microtubes (eppendorf®) and centrifuged at 700g for 20 minutes. Subsequently, the supernatant was removed and added 1 mL of saline and the pellet was re-suspended. The centrifugation procedure was repeated four times. After the fourth centrifugation and removal of supernatant 400 μL of chloroform and 600 μL of methanol was added and the pellet was re-suspended and centrifuged for another 20 minutes in rotation similar to the previous [13]. At the end of centrifugation, the supernatant was stored in tube vial for gas chromatography.

Cholesterol analysis was performed on a gas chromatograph model brand Shimadzu® QP-5000, equipped with Mass Spectrometer detector. For registration and analysis of chromatograms, the device was attached to a notebook, using the program GC Solution.

Compounds were separated and identified on a DB1 capillary column of size 30 m x 0.25 mm.

For chromatographic separation 1 μ L sample was injected with aid of a 10 μ L syringe (Hamilton®) system Split. Helium gas was used to move the sample along system, programmed with linear velocity of 36.5 cm / s. [22].

The temperatures of the injector and detector were respectively 300°C and 320°C. The programming of the initial column temperature 80 °C (maintained for 5 minutes), increasing in 12 °C per minute until reaching 300 °C. The flow of the mobile phase in the column was 1.0 ml / min [22].

Statistical analyses

The statistical analysis was carried out employing the statistical software program SAEG 9.1 [41]. Descriptive statistics (mean and standard deviation) was carried out for all studied characteristics. Quantitative data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and when significance was found by “F” test, means were compared by Tukey’s test, at 5% significance level. Parameters that did not attend the premises required by ANOVA were evaluated by the non-parametric analysis, by median comparison with Kruskal Wallis test. Data referring to gas chromatography was submitted to square root transformation ($x' = \sqrt{x}$) to normalize the data, then submitted to ANOVA and Duncan Test at 5% probability. Pearson correlation analysis was employed to verify the relation between seminal characteristics and complementary tests.

RESULTS

All animals demonstrated similar ejaculate pattern ($p>0.05$), mean volume= 121.1 \pm 58.5 mL; total sperm motility= 84.5 \pm 4.8%; sperm vigor= 3.9 \pm 0.5; and sperm concentration= 10.9 \pm 3.0 $\times 10^9$ total spermatozoa per ejaculate.

The means for total sperm motility immediately after thawing (Table 1) were 54.5 \pm 5.8; 55.5 \pm 5.3; 53.7 \pm 6.7 and 52.5 \pm 6.6, respectively for control, cholesterol, cholestanol and desmosterol, with no difference across treatments ($p>0.05$). Similarly, complementary plasma membrane integrity and functionality evaluation tests, in addition to sperm abnormality evaluations, demonstrated no difference between treatments ($p>0.05$).

According to cholesterol or it’s conjugates present in cryopreserved boar sperm after addition of them, there were no differences ($p>0.05$) among treatments analyzed through gas

chromatography, with 88.6 ± 79.8 , 71.5 ± 51.0 , 89.3 ± 81.5 , and 50.0 ± 42.7 p.p.m. for control, cholesterol, cholestanol and desmosterol groups, respectively.

Table 2 shows total sperm motility and percentage of live spermatozoa by supravital staining results during the two-hour TRT.

There was no difference in motility and supravital staining between groups up to 60 minutes of TRT ($p>0.05$). At 90 minutes, the control group obtained better results for the mentioned characteristics comparing with the desmosterol group ($p<0.05$), without difference between the other groups ($p>0.05$). At the end of TRT (120 minutes of evaluation), the control group obtained better results than the cholestanol or cyclodextrin-loaded desmosterol groups ($p<0.05$), similar to the group using cholesterol as membrane protector ($p>0.05$).

All treatments obtained a linear motility and live spermatozoa by supravital staining decrease behavior, following the equation: $\hat{Y} = 60.7 - 7.6x$ ($R^2 = 0.72$; $p < 0.0001$) observed for the control group, with no difference between groups, for ejaculates evaluated at thawing and after 120 minutes of TRT ($p > 0.05$). Average motility (30.7 ± 6.9 ; 34.5 ± 6.0 ; 37.2 ± 7.9 ; and $35.5\pm 6.0\%$) and supravital staining (26.1 ± 6.0 ; 29.0 ± 8.1 ; 27.5 ± 8.7 ; and $30.5\pm 6.7\%$) reduction were observed from baseline to 120 minutes, for treatments one to four, respectively, with no difference between groups ($p > 0.05$).

DISCUSSION

During cryopreservation, sperm cells suffer intra and extracellular stresses resulting in membrane disorders, reorganization of membrane lipids/proteins, besides osmotic alterations along the membrane. This type of stress can damage sperm membranes, causing cellular death, and significant membrane damage when cellular membranes undergo the transition from crystal liquid to gel phases [39, 51]. The probable benefit of cholesterol addition to cells occurs due to the reduction of temperature sperm membranes undergo in this transition during freezing [23].

According to Mocé et al. [29], cholesterol addition would increase the spermatozoa cholesterol/phospholipids ratio to similar as those of thermal shock non-sensitive spermatozoa (>0.8). Therefore, CLC treatment may reduce damages to spermatozoa induced by temperature variations during cryopreservation.

Apparently, the improvement in post-thawing sperm quality after cholesterol addition is not as evident in swine and seems to be inferior (6 to 8%) than that observed in other species (10 to 20%) [29]. However, this difference can be explained by swine sperm

sensitivity to cold shock, due to membrane phospholipids' differences and its relations with cholesterol (inferior) and proteins (superior) comparing to other species [14, 38, 51].

Among the multiple forms of cyclodextrins, cyclodextrin- β accepts cholesterol and increases water solubility more efficiently when methylated [52]. Methyl-cyclodextrin- β removes cholesterol more efficiently, reducing the energy necessary for cholesterol release activation and this alteration in lipid concentration induces acrosomal reaction, allowing the sperm to fertilize [25]. Cyclodextrins show reduction in the activation energy because membrane cholesterol molecules are incorporated to the cyclodextrin without forming an aqueous intermediary phase. Cholesterol can cross straight from the plasma membrane to the hydrophobic nucleus without going through the aqueous phase. This characteristic allows cyclodextrins to be efficient cholesterol donors and receptors [12, 53, 54].

The ideal CLC concentration to be added has been studied by several authors, in different species, and results show between 1 and 3 mg [29, 31, 39]. However, in swine the ideal concentration is between 1 [8, 47] and 1.5 mg [32, 35, 49], the last one employed in the present study.

In line with that, Blanch et al. [8] used several CLC concentrations in animals considered good and bad semen freezers, and noticed that there was no difference between animals or in post-thawing sperm motility in relation to the group control. In addition, 1 and 2 mg CLC concentrations showed better sperm motility results after one hour of TRT (25.0 ± 3.0 and $22.0 \pm 3.0\%$, respectively). Conversely, in the present study, the addition of 1.5 mg CLC or cholesterol-conjugates showed sperm quality similar to the control group after one hour of TRT.

Moreover, post-thawing motility results in the present study were similar to those of Blanch et al. [8]. However after one hour of TRT the results of these authors can be compared to those of the present study at 120 minutes of test, showing greater efficiency of cryoprotectants and/or CLC concentration used.

Therefore, in the studies of Blanch et al. [8] and Tomás et al. [47], as well as in the present study, CLC addition did not improve or decrease post-thawing sperm quality. On the other hand, Zeng and Terada [53, 54] observed up to 32% improvement comparing to the control group, as well as Moraes et al. [32] (36% sperm motility, approximately 23% improvement comparing to control groups which obtained 26% sperm motility) and Moraes et al. [35] (34 and 47% motility for control and treated groups respectively, approximately

38% improvement). In contrast, Galantino-Homer et al. [16] and Bailey et al. [5] obtained 19 and 10% decrease, respectively.

As in the present study, Moraes et al. [33] used cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates, however in bovine, observing sperm quality improvement in cholesterol and cholestanol treatments, having desmosterol as the least efficient treatment. Conversely, in the present study, such difference was only observed along the TRT (Table 2).

Such results can be due to semen freezing variability between males, extenders and protocols used, as well as CLC addition time and concentration, besides incubation time before the thawing and/or freezing process. Still, it is possible that, according to Watson [51] and Tomás et al. [47], differences between thermal-shock sensitive species responses to the same treatment depend on or are influenced by phospholipids' composition and distribution in the plasma membrane.

As mentioned by Purdy and Graham [39], it is evident that different cholesterol quantities are incorporated to different membrane compartments. However, it is beyond the purpose of previous studies, to determine the amount of cholesterol incorporated to each membrane compartment. Nevertheless, apparently higher cholesterol incorporation to mitochondrial compartments and to the acrosomal membrane specifically, may be responsible for some cryoprotectant effect provided by CLC treatments to spermatozoa in general, and to sperm motility particularly.

Similarly, Mocé et al. [29], observed elevated response variability to the addition of cyclodextrins in a literature review, making it difficult to evaluate how cholesterol addition or removal can improve sperm survival rates.

The present research demonstrated that the cholesterol contained in boar sperm can also be identified by gas chromatography as well as quantified by gas chromatography.

According to Purdy and Graham [39], the concentration of cholesterol associated with sperm increases in a linear form according to the increase in the concentration of cholesterol-cyclodextrin complex incubated with the sperm. The concentrations of cholesterol obtained by the method of gas chromatography did not differ among treatments. Schiller et al. [42] described that the chromatographic techniques are traditional methods for lipids analysis. For this purpose, Sion et al. [44] demonstrated that high performance liquid chromatography (HPLC) is a quick and accurate method to analyze cholesterol, desmosterol and cholesterol sulfate in human semen. The results obtained by these authors was 88% of total recovery of the substances reported above, when they were added to biological substances. Therefore, the

authors conclude that the efficiency of the operation of extraction and HPLC assay showed excellent results for the three types of steroids (cholesterol, cholesterol sulfate, and demosterol).

Leßig et al [24] have used alternative methods such as mass spectrometry associated with thin layer chromatography, to check the lipid composition of human and boars semen. These tests showed that the semen of boars has less variety of membrane lipids compared to human semen. These authors reported that this assay allows rapid assessment of the quality of sperm subjected to cryopreservation, through these tests can detect changes in the lipid composition of spermatozoa after freezing. Moraes et al. [34] have used gas chromatography to identify the composition of fatty acids in pig feed. These authors added oil sources and levels of vitamin E supplementation in pig feed in order to analyze the quality of boar semen. Result being an increase of sperm motility and reactive hiposmotic test in animals supplemented with salmon oil. Rooke et al. [40] performed a study to evaluate the effects of feeding tuna oil on the lipid composition and characteristics of in vitro sperm pigs. The chromatographic analyzes of this study were sensitive to detect changes in the proportion of fatty acids and phospholipids with improvement in the quality of semen in vitro. Purdy and Graham [39] performed the technique of high performance liquid chromatography and showed that bovine sperm submitted to treatment with 5 mg of cholesterol-cyclodextrin complex have had higher concentration of cholesterol compared to the control group.

Silveira [43] used the techniques of thin layer and gas chromatography to qualify and quantify, respectively, the cholesterol present in goat sperm cryopreserved with 1 mg of cholesterol cyclodextrin complex. Getting no difference between treatments. The same author says that the concentration of cholesterol used was not sufficient to increase concentrations of this compound in semen. No studies were found in the literature studies to quantify cholesterol using gas chromatography, and this proves to be an accurate and efficient quantification of steroids. Like there are numerous studies using cyclodextrin to increase seminal viability of different livestock species, gas chromatography proves to be important to assess this odd inclusion, so that it can be said that the cyclodextrin incorporates semen accurately, thus increasing its viability.

CONCLUSIONS

The present study demonstrated that the use of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates added to the plasma membrane of sperm did not demonstrate any additive effect

on increasing and/or maintaining sperm motility. Thus, there was no improvement in post-thaw sperm viability in Piau swine Breed.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), for financial support.

REFERENCES

- [1] E.A.M. Amorim, J.K. Graham, B. Spizziri, M. Meyers, C.A.A. Torres. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryob.* 58 (2009) 210-214.
- [2] R.C. Antunes. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31(1) (2007) 60-63.
- [3] V.M. Atger, M. Moya, G.W. Stoudt, W.V. Rodriguez, M.C. Phillips, G.H. Rothblat. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 773-789.
- [4] H.C. Azevedo. Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oleico-linoleico e alfactoalbumina. (2006) 218f. Thesis (Ph.D.) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- [5] J.L. Bailey, C. Lessard, J. Jacques, C. Bréque, I. Dobrinski, W. Zeng, H.L. Galantino-Homer. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry *Theriog.* 70 (2008) 1251-1259.
- [6] K. Bamba. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriog.* 29 (1988) 1245-1251.
- [7] I. Bianchi, K. Calderam, E.S. Maschio, E.M. Madeira, R.R. Ulguim, C.D. Corcini, D.C. Bongalardo, E.K. Correa, T. Lucia Jr., J.C. Deschamps, M.N. Correa. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriog.* 69 (2008) 632-638.
- [8] E. Blanch, C. Tomás, J.K. Graham, E. Moce. Response of Boar Sperm to the Treatment with Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Added Prior to Cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (2012) 959-964.
- [9] E. Blom. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. *Nord. Vet. Med.* 25 (1973) 383-390.

- [10] CBRA - Colégio Brasileiro De Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 2ªed. Belo Horizonte (1998) 49p.
- [11] S. Cerolini, A. Maldjian, F. Pizzi, T.M. Gliozzi. Changes in sperm quality e lipid compositions during cryopreservation of boar semen. *Reprod.* 121(3) (2001) 395-401.
- [12] A.E. Christian, M.P. Haynes, M.C. Phillips, G.H. Rothblat. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid. Res.* 38 (1997) 2264-2272.
- [13] W.W. Christie. Isolation of lipids from tissues. In: CHRISTIE, WW, editors. *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, Oxford: Pergamon Press (1982) 17-25.
- [14] F.E. De Leeuw, H.C. CHEN, B. COLENBRANDER, A.J. VERKLEU. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryob.* 27(2) (1990) 171-183.
- [15] H. Dodziuk. Molecules with holes – cyclodextrins. In: Dodziuk H (ed.), *Cyclodextrins and their complexes*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co, Weinheim, Germany, (2006) 1-30.
- [16] H.L. Galantino-Homer, W. ZENG, S.O. MEGEE, M. DALLMEYER, D. VOELKL, I. DOBRINSKI. Effects of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin and Cholesterol on Porcine Sperm Viability and Capacitation Status Following Cold Shock or Incubation. *Molec. Repr. Develop.* 73 (2006) 638-650.
- [17] S.E.F. Guimarães, R.O. Pinho, H.H. Shiomi, J.B. Siqueira, V.R. Faria, K.A. Costa, E.V. Costa, D.B. Diniz, D.M.A. Lima, M.H.C. Barros, P.S. Lopes, J.D. Guimarães. Avaliação de diferentes soluções e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen congelado/descongelado de suínos da raça Piau. In: 15º Congresso da ABRAVES, 2011, Fortaleza-CE, Proceedings... Fortaleza, 2011.
- [18] R.H. Hammerstedt, J.K. Graham, J.P. Nolan. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11 (1990) 73-88.
- [19] J.L. Hancock, G.J.R. Hovell. The collection of boar semen. *Vet. Rec.* 71 (1959) 664-665.
- [20] R.A.P. Harrison, S.E. Vickers. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Repr. Fert.* 88 (1990) 343-352.
- [21] W.V. Holt. Basic aspects of frozen storage of semen. *An. Repr. Sci.* 62 (2000) 3-22.
- [22] E.B. Hoving. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *J Chromat B: Biom Appl* 671 (1995) 341–362.
- [23] B.D. Ladbroke, R.M. Williams, D. Chapman. Studies on lecithin-cholesterol- water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta* 150 (1968) 333-340.

- [24] J. Leßig, C. Gey, R. Süß, J. Schiller, H. Glander, J. Arnhold. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and PNMR spectroscopy. *Comp Bioch Phys* 137 (2004) 265-277.
- [25] J. Mao, G. WU, R.S. Prather, M.F. Smith, T. Cantley, A. Rieke, B.A. Didion, B.N. Day. Effect of methyl- β -cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. *Theriog.* 64 (2005) 1913-1927.
- [26] W.M.C. Maxwell, L.A. Johnson. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriog.* 48 (1997) 209-219.
- [27] M.I.V. Melo, M. Henry. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arq. Bras. Vet. Zoot.* 51(1) (1999) 71-78.
- [28] E. Mocé, J.K. Graham. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. An. Sci.* 48 (2006) 826-833.
- [29] E. Mocé, E. Blanch, C. Tomás, J.K. Graham. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reprod. Dom. Anim.* 45 (Suppl. 2) (2010a) 57-66.
- [30] E. Mocé, P.H. Purdy, J.K. Graham. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *An. Repr. Sci.* 118 (2010b) 236-247.
- [31] A.I. Moore, E.L. Squires, J.K. Graham. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryob.* 51 (2005) 241-249.
- [32] E.A. Moraes, C.A.A. Torres, J.K. Graham, P.L. Romualdo, P.S. Lopes. Cholesterol-loaded cyclodextrin added to fresh boar ejaculates and sperm cryosurvival. Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Córdoba, Argentina, 9–12 January (2010a).
- [33] E.A. Moraes, J.K. Graham, C.A.A. Torres, M. Meyers, B. Spizziri. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *An. Repr. Sci.* 118 (2010b) 148-154.
- [34] E.A. Moraes, C.A.A. Torres, J.D. Guimarães, G.R. Carvalho, L.D.S. Murgas, E.P. Costa. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5°C. *Rev Bras Zootec.* 39 (2010c) 1450-1456.
- [35] E.A. Moraes, C.A.A. Torres, J.K. Graham, P.L. Romualdo, P.S. Lopes. Treating boar sperm with cholesterol improves cryosurvival. Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Orlando, Florida, 8-12 January (2011).
- [36] G.J. Morris, E. Acton, B.J. Murray, F. Fonseca. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryob.* 64 (2012) 71-80.

- [37] H. Ohvo, C. Olsio, J.P. Slotte. Effects of sphingomyelin e phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. *Bioch. Bioph. Acta.* 1349 (1997) 131-141.
- [38] J.E. Parks, D.V. Lynch. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryob.* 29(2) (1992) 255-266.
- [39] P.H. Purdy, J.K. Graham. Effect of Cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Criob.* 48 (2004) 36-45.
- [40] J.A. Rooke, C-C. Shao, B.K. Speake. Effect of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reprod* 121 (2001) 315-322.
- [41] SAEG. Sistema de análise estatística e genética - SAEG versão 9.1. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados (2007) 68p.
- [42] J. Schiller, R. Suss, B. Fuchs, M. Muller, O. Zschornig, K. Arnold. MALDI-TOF MS in lipidomics. *Front Biosc* 12 (2007) 2568-2579.
- [43] C.O. Silveira. Inclusão de colesterol a membrana plasmática de espermatozoides caprinos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. (2013) 53p.
- [44] B. Sion, G. Grizard, D. Boucher. Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. *Journ. Chrom.* 935 (2001) 259-265.
- [45] B.P. Sollero, S.R. Paiva, D.A. Faria, S.E.F. Guimarães, S.T.R. Castro, A.A. Egito, M.S.M. Albuquerque, U. Piovezan, G.R. Bertani, A.S. Mariante. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Liv. Sci.* 123(1) (2009) 8-15.
- [46] B.E. Spizziri, M.H. Foz, J.E. Bruemmer, E.L. Squires, J.K. Graham. Cholesterol-loaded cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *An. Repr. Sci.* 118 (2010) 255-264.
- [47] C. Tomás, E. Blanch, M. Hernández, M.A. Gil, J. Roca, J.M. Vázquez, E.A. Martínez, E. Moce. Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilising ability. *Anim. Reprod. Sci.* 129 (2011) 209-220.
- [48] P. Torres, C. Serres, C. Gómez-Cuétara, I. Santiago, E. Mateos. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *An. Repr. Sci.* 94 (2006) 148-151.
- [49] C.A.A. Torres, E.A. Moraes, J.K. Graham, P.L. Romualdo. The effect of adding cholesterol-loaded cyclodextrin on boar sperm cryosurvival. In: Fazleabas AT, Hunt PA, Plant TM (eds), 42nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR) "Science for the Public Good", Pittsburgh, PA, USA. *Biol Reprod Special Issue* 81, (2009) 455.

- [50] P.E. Visconti, H. Galantino-Homer, X. Ning, G.D. Moore, J.P. Valenzuela, C.J. Jorgez. Cholesterol efflux mediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *Journ. Biol. Chem.* 274 (1999) 3235-3242.
- [51] P.F. Watson. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London (1981) 189-218.
- [52] P.G. Yancey, W.V. Rodriguez, E.P. Kilsdonk, G.W. Stoudt, W.J. Johnson, M.C. Phillips, G.H. Rothblat. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of Kinetic pools and mechanism of efflux. *Journ. Biol. Chem.* 271(27) (1996) 16026-16034.
- [53] W. Zeng, T. Terada. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Repr. Fertil. Dev.* 12 (2000) 223-228.
- [54] W. Zeng, T. Terada. Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin on Cryosurvival of Boar Spermatozoa *J. Andr.* 22 (2001) 111-118.
- [55] R. Zidovetzki, I. Levitan. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Bioch. Biophys. Acta.* 1768 (2007) 1311-1324.

Table 11: Post-thawing semen quality in Piau swine breed, according cholesterol conjugates added during cryopreservation process.

<i>Parameters</i>	<i>Groups</i>			
	<i>Control</i>	<i>Cholesterol</i>	<i>Cholestanol</i>	<i>Desmosterol</i>
Motility (%)	54.5±5.8	55.5±5.3	53.7±6.7	52.5±6.6
Vigor (1-5)	3.1±0.3	3.2±0.2	3.2±0.3	3.2±0.3
Supravital (%)	53.1±5.6	52.4±9.7	49.9±8.3	51.4±6.7
Hypoosmotic (%)	12.8±6.3	14.5±6.7	14.1±5.2	15.0±7.5
Intact (%)	28.3±13.2	26.9±12.2	22.2±11.4	32.0±15.3
MJD (%)	5.2±2.3	5.7±2.3	5.3±1.9	6.2±2.3
MID (%)	9.6±1.8	8.8±2.1	9.2±2.9	9.1±2.6
TD (%)	14.8±2.6	14.5±3.3	14.5±3.6	15.3±3.5

ANOVA ($p>0,05$); Mean±sd = mean and standard deviation; Hypoosmotic: % of reactive sperm; Intact: % of intact sperm by fluorescent probes test; MJD: major defects; MID: minor defects; TD: total defects.

Table 12: Post-thawing semen quality in Piau swine breed during the thermo-resistance test, according cholesterol conjugates added during cryopreservation process.

<i>Groups</i>	<i>Incubation time (min)</i>				
	<i>0</i>	<i>30</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>
	Total sperm motility (%)				
Control	54.5±5.8 ^{aA}	44.5±6.3 ^{bA}	37.0±5.7 ^{cA}	30.2±7.9 ^{dA}	23.7±7.6 ^{eA}
Cholesterol	55.5±5.3 ^{aA}	45.0±6.9 ^{bA}	36.5±8.4 ^{cA}	26.7±8.0 ^{dAB}	21.0±5.3 ^{dAB}
Cholestanol	53.7±6.7 ^{aA}	40.7±7.3 ^{bA}	32.0±8.9 ^{cA}	24.2±6.9 ^{dAB}	16.5±7.6 ^{eB}
Desmosterol	52.5±6.6 ^{aA}	41.2±8.6 ^{bA}	32.2±8.5 ^{cA}	23.5±7.6 ^{dB}	17.0±5.2 ^{dB}
	Live spermatozoa by supravital staining (%)				
Control	53.1±5.6 ^{aA}	47.3±7.1 ^{bA}	40.0±7.1 ^{cA}	30.8±4.7 ^{dA}	27.0±5.0 ^{dA}
Cholesterol	52.4±9.7 ^{aA}	45.4±6.2 ^{bA}	38.0±6.7 ^{cA}	27.3±3.8 ^{dAB}	23.3±4.0 ^{dAB}
Cholestanol	49.9±8.3 ^{aA}	43.1±6.0 ^{bA}	35.2±7.0 ^{cA}	25.1±5.1 ^{dAB}	22.3±4.3 ^{dB}
Desmosterol	51.4±6.7 ^{aA}	43.9±5.6 ^{bA}	35.9±6.1 ^{cA}	26.9±5.9 ^{dB}	20.9±4.6 ^{eB}

^{a,b}Means of values in the same line, followed by lower case letters differed between them by the Tukey test (p<0.05); ^{A,B}Means of values in the same column, followed by upper case letters differed between them by the Tukey test (p<0.05); Mean±sd = mean and standard deviation.