

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA-UFSM-RS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Matheus Schardong Lucca

**AVALIAÇÃO DA ENZIMA PARAOXONASE TIPO 1 NO PLASMA
SEMINAL E SUA EXPRESSÃO DE RNAm DOS TECIDOS DAS
GÔNADAS EM SUÍNOS**

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Matheus Schardong Lucca

AVALIAÇÃO DA ENZIMA PARAOXONASE TIPO 1 NO PLASMA SEMINAL E SUA EXPRESSÃO DE RNAm DOS TECIDOS DAS GÔNADAS EM SUÍNOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lucca, Matheus Schardong

Avaliação da enzima paraoxonase tipo 1 no plasma seminal e sua expressão de RNAm dos tecidos das gônadas em suínos / Matheus Schardong Lucca.-2016.

60 f.; 30cm

Orientador: Carlos Augusto Rigon Rossi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

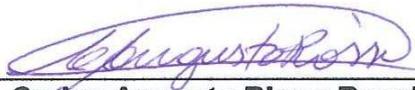
1. Ejaculado 2. Fração espermática 3. Espermatozoide
4. Gônadas I. Rossi, Carlos Augusto Rigon II. Título.

Matheus Schardong Lucca

ÁVALIAÇÃO DA ENZIMA PARAOXONASE TIPO 1 NO PLASMA SEMINAL E SUA EXPRESSÃO DE RNAm DOS TECIDOS DAS GÔNADAS EM SUÍNOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

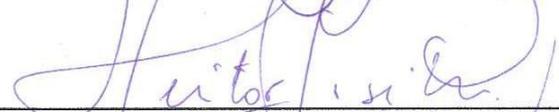
Aprovado em 18 de Fevereiro de 2016



Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. William Schoenau (UFSM)



Prof. Dr. Heitor José Cervo (IFRS - Campus Sertão)

AGRADECIMENTOS

A concretização desse trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Muito obrigado a todos aqueles citados e mesmo aqueles que não foram citados, mas sabem que contribuíram de alguma forma para minha formação pessoal e profissional; em especial agradeço:

- a Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de cursar o curso de pós-graduação em uma instituição de referência, e pelo apoio estudantil, fundamental para que eu pudesse ter uma boa formação.

- a Universidade Federal de Pelotas, particularmente ao “Grupo REPROPEL” que, mediante seus professores, pós-graduandos, estagiários tiveram participação direta na realização deste estudo.

- ao Professor orientador Carlos Rossi, pela amizade e companheirismo durante esse período de convivência, obrigado pela confiança, aprendizado e ao auxílio na idealização deste trabalho.

- aos Professores, Bernardo G. Gasperin, Thomas Lucia Jr. e Augusto Schneider pelo esforço em disponibilizar tudo o que fosse necessário para realização deste trabalho, pela amizade e confiança.

- ao BIOREP, em especial as acadêmicas de pós-graduação Monique Rovani e Alessandra Bridi que me auxiliaram na realização deste estudo.

- ao professor Marcelo Soares e colaboradores do Laboratório de Andrologia Veterinária pela ajuda e colaboração durante todo o curso.

- aos meus pais, por todo amor verdadeiro e principalmente pelo apoio dado para alcançar meus objetivos e realizar meus sonhos.

- a minha namorada, Tamine, pessoa especial em minha vida, de quem o apoio foi fundamental, obrigado por tanto tempo de carinho, amizade e pelo companheirismo incondicional.

- a minha irmã, Vivian pela paciência e compreensão.

- a “Gestion Veterinaria Porcina” pela doação do diluente de sêmen suíno.

- aos colegas, pela cooperação na execução dos trabalhos, companheirismo e que se colocaram sempre à disposição em todos os momentos.

- a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela bolsa concedida.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ENZIMA PEROXONASE TIPO 1 NO PLASMA SEMINAL E SUA EXPRESSÃO DE RNAm DOS TECIDOS DAS GÔNADAS EM SUÍNOS

AUTOR: Matheus Schardong Lucca

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi

O plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio (EROs). A paraoxonase tipo 1 (PON1) é um complexo multienzimático com propriedades antioxidantes, impedindo o aumento da quantidade de EROs, o que confere proteção às membranas celulares e neutraliza os efeitos da oxidação lipídica. O estudo objetivou correlacionar a influência da atividade de PON1 com os parâmetros de avaliação do sistema Computer Assisted Semen Analysis (CASA) e a viabilidade espermática (integridade de membrana, integridade de acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e fragmentação do DNA) do sêmen suíno *in natura* e investigar a expressão da PON1 (RNAm) no tecido do testículo e epidídimo (cabeça, corpo e cauda) do reprodutor suíno adulto. A fração espermática (FE) apresentou a maior atividade de PON1 e os machos 81, 80 e 79 ($P < 0,05$) apresentaram a maior atividade de PON1. Já em relação a comparação entre as diferentes amostras do ejaculado, nosso estudo demonstrou diferenças ($P < 0,05$) nos machos 81 e 92 em relação a FE e a fração pós-espermática (FP). Entretanto, quando o ejaculado foi diluído (1:1) apresentou redução média de 44% na atividade da PON1. A atividade de PON1 na FE apresentou uma correlação positiva com a concentração espermática, DCL, VCL e IDNA ($P < 0,05$) e apresentou correlação negativa para os parâmetros de STR e LIN assessorados pelo sistema CASA. A expressão de RNAm somente foi observada para a porção do corpo do epidídimo. A FE é a parte do ejaculado que mais apresentou atividade da PON1 e os parâmetros DCL, VCL, STR e LIN, juntamente, com concentração e viabilidade espermática (integridade de DNA) são os que apresentaram a maior associação com a enzima. Já a PON1 foi somente expressa (RNAm) no corpo de epidídimo do reprodutor suíno.

Palavras-chaves: Ejaculado. Fração espermática. Espermatozoide. Gônadas.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ENZYME PARAOXONASE TYPE 1 IN THE SEMINAL PLASMA AND ITS mRNA EXPRESSION IN BOARS GONADAL TISSUE

AUTHOR: Matheus Schardong Lucca
ADVISER: Prof. Dr. Carlos Augusto Rigon Rossi

The seminal plasma is particularly important in sperm protection against damage caused by reactive oxygen species (ROS). The paraoxonase type 1 (PON1) is a multi-enzymatic complex with antioxidant properties, preventing the increase of ROS quantities, thus protects cell membranes and neutralizes the effects of lipid oxidation. The objective of this study was to correlate the influence of PON1 activity with the CASA system parameters and sperm viability (membrane integrity acrosome integrity, functionality of mitochondria and DNA fragmentation) of swine semen *in natura*, and investigate the PON1 expression (mRNA) in testicle and epididymis (head, body and tail) tissue of boars. The sperm fraction (FE) presented the major PON1 activity and males 81, 80 and 79 ($P < 0.05$) showed the highest enzyme activity. But, when comparing the differences between the ejaculate samples, our study showed differences ($P < 0.05$) between males 81 and 92 in FE and sperm post fraction (PF). However, when the ejaculated was diluted (1:1), it has presented 44% average reduction in the activity of PON1. The activity of PON1 in FE showed positive correlation with sperm concentration, curvaceous distance, curvy velocity and DNA integrity ($P < 0.05$), and also showed negative correlation with straightness and linearity parameters advised by the CASA system. The mRNA expression was observed only in the body portion of the epididymis. The FE is the part of the ejaculate that more PON1 activity and presented the parameters DCL, VCL, STR and LIN, together, with concentration and sperm viability (integrity of DNA) are those who showed the greatest association with the enzyme. Already the PON1 was only expressed (Mrna) in the body of epididymis pig breeder.

Keywords: Ejaculated. Sperm fraction. Spermatozoon. Gonads.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Características físicas do ejaculado suíno.	23
Tabela 2 – Descrições dos parâmetros da motilidade espermática assessorada pelo Computer Assisted Semen Analysis (CASA).....	25

ARTIGO

Tabela 1. Atividade enzimática da paraoxonase tipo 1 no plasma seminal nas frações espermática, pós-espermática, ejaculado total e do ejaculado diluído no sêmen de suíno.	41
Tabela 2. Coeficientes de correlação entre a atividade da enzima paraoxonase tipo 1 (PON1), na fração espermática e no ejaculado total, em associação com os parâmetros de avaliação do Computer Assisted Sperm Analise (CASA).	43
Tabela 3. Coeficientes de correlação (não paramétrica) entre a atividade de paraoxonase tipo 1 (PON1), na fração espermática e no ejaculado total, em associação com a concentração espermática, motilidade total, integridade de DNA, integridade de acrossoma, integridade de membrana e funcionalidade de mitocôndria.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema Reprodutor do Suíno	15
Figura 2 – Relação da Liberação Hormonal na Corrente Sanguínea nos Machos..	18
Figura 3 – Maturação Espermática	19
Figura 4 – Parâmetros de avaliação do Computer Assisted Semen Analysis (CASA).....	26

ARTIGO

Figura 1. Expressão do gene da enzima paraoxonase tipo 1 (PON1), em tecido testicular e epididimário do suíno através de reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	46
Figura 2. Expressão do RNAm para enzima paraoxonase tipo 1 (PON1), em tecido testicular e epididimário do suíno.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento
CASA	Computer Assisted Semen Analysis
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CDG	Centro de difusão genética
cDNA	DNA complementar
CIA	Centrais de inseminação artificial
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
DAP	Distância média percorrida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCL	Distância em curva
DSL	Distância em linha reta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocionato de fluoresceína
FSH	Hormônio folículo estimulante
IP	Iodeto de propídeo
g	Gramas
Hz	Hertz
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
kg	Quilogramas
LH	Hormônio luteinizante
LIN	Linearidade
mg	Miligramas
mg kg ⁻¹	Miligramas por quilogramas
mL	Mililitros
mM	Milimol
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PON	Paraoxonase
PON1	Paraoxonase tipo 1
PON2	Paraoxonase tipo 2
PON3	Paraoxonase tipo 3
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
PSA	<i>Pisum sativum</i>
STR	Retilinearidade
U L ⁻¹	Unidades por litro
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear progressiva
WOB	Coeficiente de oscilação
µm	Micrômetro
µm s ⁻¹	Micrômetro por segundo
µL	Microlitros

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 ANATOMOFISIOLOGIA DO REPRODUTOR SUÍNO	15
1.1.1 Testículos	15
1.1.1.1 <i>Células de Leydig</i>	16
1.1.1.2 <i>Células de Sertoli</i>	17
1.1.1.3 <i>Controle endócrino</i>	17
1.1.1.4 <i>Espermatogênese</i>	18
1.1.1.4.1 <i>Espermatozoides</i>	20
1.1.2 Epidídimo	20
1.1.3 Ductos deferentes	21
1.1.4 Glândulas sexuais anexas	21
1.1.4.1 <i>Glândula prostática</i>	21
1.1.4.2 <i>Glândulas vesiculares</i>	21
1.1.4.3 <i>Glândulas bulbouretrais</i>	21
1.1.5 Pênis e prepúcio	22
1.1.6 Ejaculado suíno	22
1.2 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS	23
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO	28
1.4 ANTIOXIDANTES	29
1.4.1 <i>Paraoxonase tipo 1</i>	30
CAPÍTULO 2	33
ARTIGO	33
Abstract	34
Resumo	34
Introdução	35
Material e Métodos	37
Animais, coleta e processamento de sêmen	37
Avaliação dos parâmetros espermáticos	37
Mensuração da Atividade de PON1	39
Extração de RNA, transcrição reversa e <i>PCR</i> em tempo real	39
Análise estatística	40
Resultados e Discussões	41
Conclusões	46
Referências	47
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	56
APÊNDICE A – INSTALAÇÃO DE ALOJAMENTO E COLETA DE SÊMEN UFPEL - REPROPEL	57
APÊNDICE B – COLETA DE SÊMEN PELO MÉTODO DA MÃO ENLUVADA	58
APÊNDICE C – FRAÇÕES DO EJACULADO SUÍNO	59
APÊNDICE D – SISTEMA CASA DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	60

APRESENTAÇÃO

As metodologias, resultados e discussões, que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de artigo científico (disponível no capítulo 2) a serem enviados para publicação na revista científica: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.

As **REFERÊNCIAS APRESENTADAS do capítulo 1** são as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira é representada por um rebanho de aproximadamente 39 milhões de cabeças (SEAB, 2013). O Brasil é o terceiro maior produtor de suínos e quarto maior exportador do mundo. Atualmente produz em torno de 3,5 milhões de toneladas de carne suína, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por 19% da produção total do país. O mercado interno atingiu um consumo per capita acima dos 15 quilogramas, a maior parte concentrada no consumo de embutidos (ABIPECS, 2012).

Nos últimos anos, para acompanhar a demanda e produzir mais e com maior qualidade, a cadeia produtiva de suínos vem inovando e investindo desde os produtores até as indústrias. Os principais investimentos são direcionados para as formas de organização da produção, técnicas de manejo, área de medicamentos, área nutricional, controle sanitário, e com maior enfoque, nos avanços genéticos.

A inseminação artificial é uma biotécnica reprodutiva que possui como principais objetivos a maximização do uso dos ejaculados (WENTZ e BORTOLOZZO, 1998). Foi consolidada na década de 2000 e posteriormente com a introdução da inseminação artificial intrauterina, permitiu uma redução ainda maior no número de espermatozoides por dose inseminante (AREND, 2014). Em função dessa vantagem, muitos trabalhos têm buscado a melhora da qualidade seminal, por exemplo, através do uso de antioxidantes (via ração ou diretamente na dose inseminante) como forma de prevenir os danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio (EROs). Os danos provocados pelo excesso das EROs afetam a qualidade espermática como a perda da motilidade de forma irreversível, a inibição da respiração espermática, as lesões ao DNA espermático e mitocondrial e as perdas de enzimas intracelulares, o que interfere na capacidade fecundante do espermatozoide (TONIOLLI, 2012). Esses danos ocorrem porque o espermatozoide suíno é muito sensível aos danos peroxidativos devido às altas concentrações de ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídios da membrana plasmática espermática, assim como pela baixa capacidade antioxidante do plasma seminal dos suínos (RONDON, 2012).

Deste modo alguns antioxidantes já são utilizados na composição de diluentes comerciais e/ou em dietas especialmente formuladas para os machos reprodutores com o objetivo de prevenir os danos oxidativos nos gametas. Recentemente, BARRANCO (2014 e 2015), realizou um estudo com a paraoxonase tipo 1 (PON1) do plasma seminal do suíno e seus resultados foram surpreendentes em relação a atividade dessa enzima, que atua como protetor do espermatozoide tanto *in vitro* como *in vivo*. Porém, os estudos que correlacionam a possível influência da atividade da PON1 sobre a viabilidade espermática são incipientes e pouco conclusivos. Portanto, este estudo objetivou correlacionar a influência da atividade de PON1 com os parâmetros do sistema CASA e a viabilidade espermática (integridade de membrana, integridade de acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e fragmentação do DNA) do sêmen suíno *in natura* e investigar a expressão da PON1 (RNAm) no tecido do testículo e epidídimo (cabeça, corpo e cauda) do reprodutor suíno adulto.

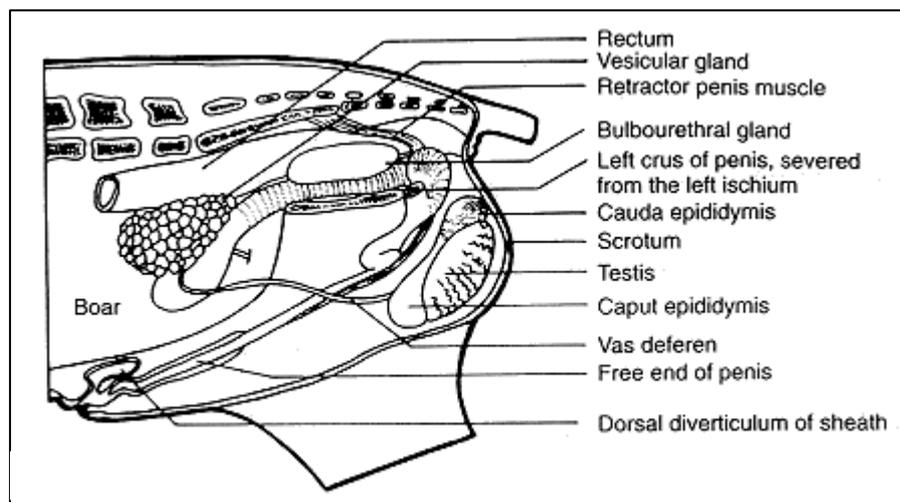
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ANATOMOFISIOLOGIA DO REPRODUTOR SUÍNO

O sistema reprodutivo do macho suíno (Figura 1) é constituído por diferentes estruturas, incluindo os testículos, os epidídimos, o sistema dos ductos urogenitais e as glândulas sexuais secundárias (ABRAHÃO, 2006). O sistema nervoso central, hipotálamo e hipófise se comunicam via sistema endócrino e nervoso para coordenar a atividade reprodutiva dos machos (CORRÊA, 2001).

Os principais hormônios responsáveis pelos processos reprodutivos, hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona e estradiol, estão envolvidos em eventos como o início e o desenvolvimento da puberdade, a espermatogênese e outros processos essenciais à vida reprodutiva do macho suíno (OBERLENDER, 2010).

Figura 1 – Sistema Reprodutor do Suíno



Fonte: (<http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap3.html>)

1.1.1 Testículos

As gônadas do macho, os testículos, têm duas funções principais: produção de células germinais denominadas espermatozoides que transmitem os genes do macho para os descendentes e, produção de andrógenos, que dão as características ao indivíduo do sexo masculino (CORRÊA, 2001). Os testículos nos

suínos situam-se fora do abdômen, contidos dentro da bolsa escrotal (KNOX, 2003), localizados na região perineal e um plano inclinado, permanecendo próximo da parede do corpo. São compostos por túbulos seminíferos, células de Leydig, capilares, vasos linfáticos, células de Sertoli, entre outras estruturas de preenchimento (SENGER, 2003).

A produção de espermatozoides ocorre ao longo de todo o comprimento dos túbulos seminíferos (KNOX, 2003), constituídos por uma parede conhecida como epitélio seminífero, apresentam-se ociosos, altamente contorcidos e circundados por extensos leitos capilares. Esses túbulos são constituídos internamente por dois tipos de células somáticas (as células mióides e as células de Sertoli) e de células germinativas e, externamente aos túbulos situam-se as células de Leydig (GARTNER e HIATT, 2003).

Durante a espermatogênese os espermatozoides deixam os túbulos seminíferos e entram na rede testicular, quando da sua passagem para dentro do epidídimo (ASHDOWN e HAFEZ, 1996). A rede testicular se continua com os ductos eferentes, os quais finalmente formam um ducto espiralado simples chamado de epidídimo (KNOX, 2003).

1.1.1.1 Células de Leydig

As células intersticiais ou de Leydig são encontradas no tecido intersticial externamente aos túbulos seminíferos e são responsáveis pela produção de testosterona que é essencial para o desenvolvimento e a manutenção da espermatogênese (principalmente na fase da meiose) e outras características masculinas (GARNER e HAFEZ, 1996). No suíno, as células intersticiais de Leydig são encontradas em grande quantidade (CORRÊA, 2001) e produzem especialmente a 5 α -androstenoona, a qual encontra-se usualmente em níveis mais elevados que a testosterona no plasma sanguíneo. Este andrógeno é secretado pela saliva (agindo como feromônio) e contribui para o odor de urina na carne do reprodutor (BRACKETT, 2014).

As células de Leydig são dependentes do efeito trópico de LH para seu crescimento e função. O LH estimula as células regulando assim a produção de testosterona (BRACKETT, 2014).

1.1.1.2 Células de Sertoli

As células de Sertoli são encontradas revestindo a luz dos túbulos seminíferos e são dependentes de FSH. As células de Sertoli são responsáveis pela produção de:

- Estrogênio: encontrado em grandes quantidades no sêmen a partir da conversão pelas células de Sertoli da testosterona para estrogênio, via enzima aromatase.
- Inibina: é difundida para o cérebro, sendo um importante componente da regulação das gonadotrofinas no macho.
- ABP (*Proteína ligante de andrógenos*): sob a influência do FSH, facilita a entrada de testosterona do tecido intersticial para dentro dos túbulos. Estão envolvidas na maturação dos espermatozoides e na produção de hormônios (ABRAHÃO, 2006; CORRÊA, 2001).

1.1.1.3 Controle endócrino

O sistema reprodutor masculino é regulado por mecanismos de retroalimentação que envolvem o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo secreta GnRH de maneira pulsátil, que estimula a secreção do LH e do FSH pela hipófise anterior. Irregularmente, a baixa frequência de GnRH induz a hipófise anterior a liberar FSH, enquanto que uma alta frequência de GnRH leva a liberação de LH (BRACKETT, 2014; BRINSKO, 2007; GARNER e HAFEZ, 1996).

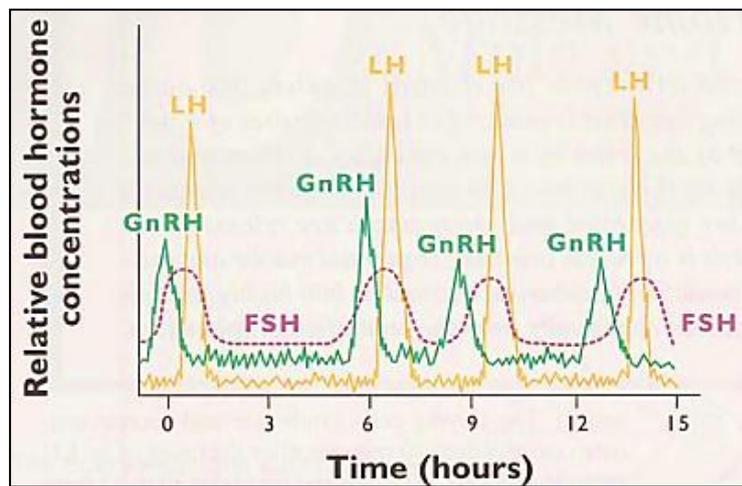
O LH estimula as células de Leydig a produzir andrógenos, principalmente a testosterona pela conversão do colesterol. Os andrógenos são secretados para as células de Sertoli e para a corrente sanguínea (desenvolvimento de características sexuais secundárias) bem como o desenvolvimento e manutenção do trato reprodutivo (BRACKETT, 2014; GARNER e HAFEZ, 1996).

O FSH estimula a produção de ABP e inibina pelas células de Sertoli. A ABP forma um complexo com andrógenos e é transportado com os espermatozoides para dentro do epidídimo. Estas células requerem altas doses de andrógenos para sua função normal (GARNER e HAFEZ, 1996).

Os andrógenos inibem a secreção de GnRH, LH e FSH por retroalimentação negativa sobre o hipotálamo e hipófise. A testosterona também é secretada para os

túbulos seminíferos, necessária à manutenção da espermatogênese. O FSH interage com receptores nas células de Sertoli, convertendo testosterona em diidrotestosterona e estrogênio, a estimulação da espermatocitogênese, a conclusão da liberação dos espermatozoides e a secreção de inibina. A inibina é secretada para a corrente sanguínea e exerce o efeito de retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH, mas não sobre a secreção de LH (BRACKETT, 2014; BRINSKO, 2007; GARNER e HAFEZ, 1996).

Figura 2 – Relação da Liberação Hormonal na Corrente Sanguínea nos Machos.



Fonte: (SENGER, 2003)

1.1.1.4 Espermatogênese

É o processo em que as espermatogônias (células-troncos masculinas), se desenvolvem em espermatozoides através de divisões mitóticas e meióticas (BRACKETT, 2014). Esse processo cronológico dura em torno de 35 dias no reprodutor suíno (CORRÊA, 2001). Esta formação inicia-se nas espermatogônias que revestem a parede tubular e terminam no momento que os espermatozoides são liberados no lúmen do túbulo seminífero (BRACKETT, 2014). Este processo cíclico pode ser dividido em três grandes fases: espermatocitogênese, meiótica e espermiogênese.

A fase da espermatocitogênese realiza duas importantes funções: a) a primeira, a divisão mitótica de espermatogônias tipo A, que permanecerão inativas e

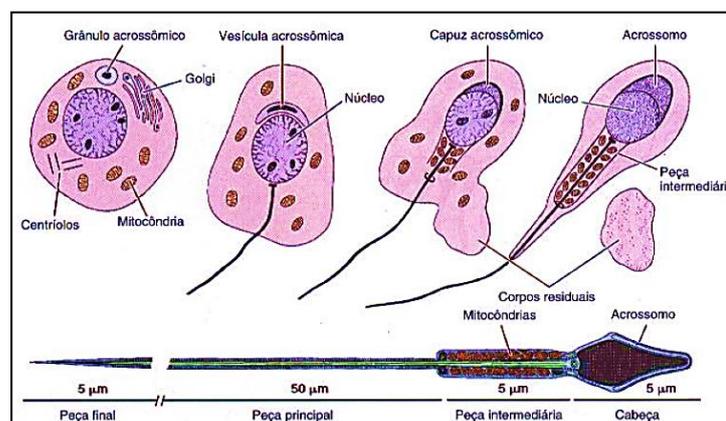
não serão usadas imediatamente para a produção de espermatozoides, e b) a segunda, torna as espermatogônias tipo A em espermatogônias tipo B que se diferenciarão em espermátocitos primários (BRINSKO, 2007).

Na fase meiótica, os espermátocitos primários duplicam seu DNA e sofrem modificações progressivas de prófase meiótica antes de se dividirem em espermátocitos secundários. Sem outra síntese de DNA os espermátocitos secundários dividem-se novamente para formar as células haploides, chamadas de espermátides (GARNER e HAFEZ, 1996).

A terceira e última parte do processo de produção dos espermatozoides é a espermiogênese. É nesta fase em que as espermátides são transformadas em espermatozoides através de uma série de modificações morfológicas progressivas (BRACKETT, 2014). São notadas quatro fases neste processo de desenvolvimento. Na fase de Golgi (Figura 3), as vesículas fundem-se de maneira progressiva para a formação do acrossoma (BRACKETT, 2014). Já na fase do capuz, a vesícula acrossômica aumenta de tamanho e sua membrana envolve parcialmente o núcleo. A fase do acrossomo caracteriza-se por várias modificações da morfologia da espermátide. O núcleo torna-se condensado, a célula se alonga e as mitocôndrias mudam de localização (GARTNER e HIATT, 2003).

A fase de maturação da espermiogênese envolve a transformação final das espermátides alongadas em células que são liberadas para dentro dos túbulos seminíferos. Esse processo de liberação é chamado de espermição (GARNER e HAFEZ, 1996).

Figura 3 – Maturação Espermática



Fonte: (GARTNER; HIATT, 2003)

1.1.1.4.1 Espermatozoides

Os espermatozoides completamente desenvolvidos, resultantes da espermatogênese, são células alongadas, constituídos por uma cabeça, que contém uma cromatina condensada com DNA e o acrossoma (contendo substâncias hidrolíticas); e uma cauda, onde na peça intermediária estão localizadas as mitocôndrias fornecendo energia necessária para a célula. Já a peça principal até a peça final é composta por axonemas, responsáveis pela motilidade espermática (GARNER e HAFEZ, 1996).

1.1.2 Epidídimo

O epidídimo é composto de um único túbulo, tortuoso, que é essencial para o armazenamento, maturação e transporte de espermatozoides (CORRÊA, 2001). O epidídimo apresenta revestimento muscular liso, que auxilia na movimentação do esperma através de ondas peristálticas na direção dos canais deferentes.

No epidídimo são reconhecidas três partes anatômicas: a cabeça, o corpo e a cauda (SETCHELL, 1993). No suíno, o epidídimo é muito grande sendo que a cauda é dorsal e a cabeça ventral (ASHDOWN e HAFEZ, 1996). Os espermatozoides entram na cabeça do epidídimo sem serem férteis e sem motilidade, e levam de 9 a 14 dias para migrar até a cauda do epidídimo, principal local de armazenamento (KNOX, 2003). Acredita-se que as secreções epididimárias possuam fatores de maturação que promovam alterações no potencial para motilidade progressiva, alterações em mecanismos metabólicos, perda da gota citoplasmática e alterações de membrana plasmática, acrossoma e conteúdo nuclear (CORRÊA, 2001).

A cauda continua com o ducto deferente das vias espermáticas e serve como o principal local de armazenamento pré-ejaculatório para o esperma (estima-se que contenha cerca de 75% de espermatozoides totais). Os espermatozoides se tornam moveis e adquirem competência para fertilizar no corpo dos epidídimos devido a secreção de fatores pelas células localizadas nesta região (KNOX, 2003). Os espermatozoides armazenados no epidídimo retêm a capacidade fertilizante por várias semanas (ASHDOWN e HAFEZ, 1996).

1.1.3 Ductos deferentes

O ducto deferente é simplesmente uma continuação do epidídimo que se estende a partir da cauda do epidídimo para a uretra pélvica. Sua principal função é transportar os espermatozoides do epidídimo para a uretra (CORRÊA, 2001).

1.1.4 Glândulas sexuais anexas

Adjacente a uretra pélvica situam-se as glândulas sexuais anexas, que secretam fluido e gel, compreendendo ao redor de 90% do volume do ejaculado suíno. (CORRÊA, 2001). A função das glândulas é adicionar substâncias no ejaculado para aumentar o volume, proteger as células espermáticas e fornecer os nutrientes necessários para assegurar a fertilidade do espermatozoide (KNOX, 2003). O suíno apresenta as glândulas prostática, vesiculares e bulbouretrais, sendo que as ampolas do ducto deferente estão ausentes.

1.1.4.1 *Glândula prostática*

Está localizada acima da glândula vesicular na espécie suína (ASHDOWN e HAFEZ, 1996), e sua secreção possui a função de neutralizar a acidez das secreções vaginais e dar as características de odor ao sêmen (CORRÊA, 2001).

1.1.4.2 *Glândulas vesiculares*

São pares e estão situadas lateralmente às porções terminais de cada ducto deferente. Nos suínos são grandes e menos compactas (ASHDOWN e HAFEZ, 1996), e responsáveis pela maioria dos fluidos do sêmen de suínos usados como substratos energéticos pelos espermatozoides (CORRÊA, 2001).

1.1.4.3 *Glândulas bulbouretrais*

As glândulas bulbouretrais são dorsais a uretra, próximas a extremidade de sua porção pélvica e recobertas por uma espessa camada de músculo estriado bulbo-glandular. Apresentam-se em par, são grandes nos suínos e contribuem para

a formação da substância gelatinosa do sêmen (ASHDOWN e HAFEZ, 1996). Esta é uma característica única do ejaculado suíno (CORRÊA, 2001), pois esta fração apresenta função *in vivo* de reter o ejaculado na cérvix e, assim minimizar o refluxo (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

1.1.5 Pênis e prepúcio

O suíno apresenta pênis do tipo fibroelástico e sua porção final (glande) espiralada em formato de "saca-rolhas" (CORRÊA, 2001). A ereção peniana, em suínos, deve-se a estímulos olfatórios, auditivos e visuais que levam segundo Ashdown e Hafez, (1996), a estimular o músculo retrator do pênis que controla o efetivo comprimento do pênis por sua ação na flexura sigmoide e o preenchimento dos espaços cavernosos. Estes, nos suínos, são pequenos, com exceção dos pedúnculos e na curvatura distal da flexura sigmoide, mas a dilatação é limitada.

O prepúcio é uma dupla invaginação da pele que contém e cobre a porção livre do pênis e sua função é de abrigar e proteger o pênis (KNOX, 2003). O prepúcio apresenta um divertículo acessível à palpação digital, onde urina, sêmen e outras secreções podem se acumular, possibilitando o desenvolvimento bacteriano (CORRÊA, 2001).

1.1.6 Ejaculado suíno

O ejaculado é uma suspensão de espermatozoides em um plasma seminal composto de uma mistura de vários fluídos, dos testículos, epidídimos e das glândulas sexuais anexas (BRACKETT, 2014). O ejaculado do suíno difere em vários aspectos dos outros animais domésticos. Suas principais características (Tabela 1) são um volume muito grande, juntamente com uma densidade espermática baixa (AALBERS, 1961).

Tabela 1 – Características físicas do ejaculado suíno.

Características	Amplitude
Volume Filtrado (mL)	50 – 600
Cor	Branco acinzentado
Odor	<i>Sui generis</i>
Movimento de massa	Ausente
Concentração ($\times 10^6$ spz mL ⁻¹)	180 – 400
Total de spz ($\times 10^9$)	20 – 80
Motilidade (%)	≥ 50
Vigor	≥ 3
Sptz normais (%)	≥ 70

Fonte: (CORRÊA, 2001; CBRA, 2013).

O ejaculado suíno consiste basicamente de três frações: a primeira fração usualmente chamada pré-espermática (dominada pela secreção uretral das glândulas bulbouretrais bem como da próstata), a fração rica ou espermática (contém grande quantidade de espermatozoides) e a fração pós-espermática (que contém menos espermatozoides) (CORRÊA, 2001).

O plasma seminal é a porção fluída do sêmen, incorporada durante a ejaculação. Os componentes em sua maioria são: eletrólitos, frutose, ácido ascórbico, diversas enzimas, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento (BRACKETT, 2014). A presença ou ausência de muitos desses componentes podem estar envolvidas com a fertilidade (MATOS, 2008).

1.2 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

A avaliação dos espermatozoides deve ser realizada com exatidão para garantir o uso de animais com boa fertilidade, o que resulta em excelentes índices reprodutivos. As avaliações de motilidade, concentração, morfologia e outras características que influenciam a funcionalidade do esperma (integridade de membrana, acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e fragmentação de DNA);

devem ser realizadas a cada ejaculado para que tenhamos a certeza da qualidade do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial.

A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas na literatura como importantes ferramentas na seleção de um ejaculado. Para tanto, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal nas centrais de inseminação artificial é a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis (VERSTEGEN, 2002). No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esse conceito é falho e, na realidade, não é o número de espermatozoides móveis ou morfologicamente normais que determina a fertilidade e sim, sua competência funcional (MAIA, 2006).

Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva. Entretanto, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desse parâmetro devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (MATOS, 2008). O Computer Assisted Semen Analysis (CASA) é um sistema automático (*hardware* e *software*) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN e KATZ, 2004). Resumidamente, os espermatozoides móveis observados são posteriormente identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer suas trajetórias. Essas trajetórias obtidas são matematicamente processadas e os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozoide (SOUSA, 2007).

Apesar do seu alto custo, o sistema CASA oferece automatismo, rapidez, objetividade e repetibilidade nas avaliações, o que possibilita detalhar melhor a qualidade do sêmen analisado e assim fornecer informações adicionais sobre as características de movimentação dos espermatozoides, as quais apresentam limitações a observação convencional (AMANN e KATZ, 2004).

Os parâmetros da cinética espermática (Tabela 2 e Figura 4) avaliados pelo sistema CASA são: Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Distância Média Percorrida (DPL), Distância Curvilínea (DCL), Distância em Linha Reta (DSL), Velocidade Média de Trajeto (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Linear Progressiva (VSL), Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH),

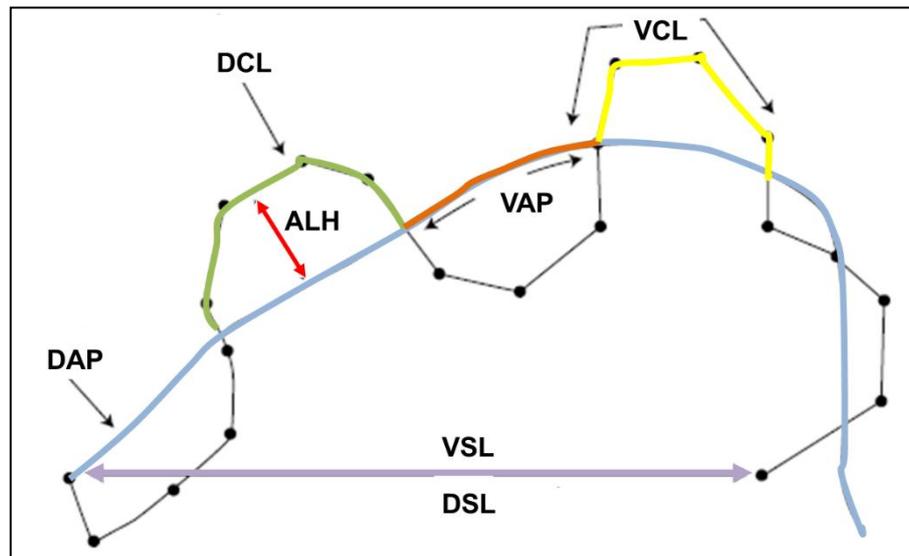
Frequência de Batimentos Flagelar (BCF), Retilinearidade (STR), Linearidade (LIN) e Coeficiente de Oscilação (WOB) (ARRUDA, 2000).

Tabela 2 – Descrições dos parâmetros da motilidade espermática assessorada pelo Computer Assisted Semen Analysis (CASA).

Parâmetros	Unidade	Descrição
MT	%	Referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima, sendo a proporção de células móveis do total ($>5\mu\text{m/s}$);
MP	%	Refere à porcentagem de células movendo-se progressivamente ($>20\mu\text{m/s}$);
DAP	μm	É a distância da trajetória geral do espermatozoide;
DCL	μm	É a distância em curva do caminho percorrido;
DSL	μm	É a distância considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória;
VAP	$\mu\text{m/s}$	É a velocidade média ininterrupta do trajeto do espermatozoide;
VCL	$\mu\text{m/s}$	É a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pelo espermatozoide;
VSL	$\mu\text{m/s}$	É a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto;
ALH	μm	É a largura média da oscilação da cabeça conforme o espermatozoide se move;
BCF	Hz	É a frequência com que a cauda do espermatozoide se move para trás e para frente durante um trajeto percorrido;
STR	%	É a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta, $(\text{VSL}/\text{VAP} \cdot 100)$;
LIN	%	É a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta, $(\text{VSL}/\text{VCL} \cdot 100)$;
WOB	%	É a expressão utilizada para a relação entre os caminhos médios e curvilínea, seria coeficiente de variação, $(\text{VAP}/\text{VLC} \cdot 100)$;

MT: Motilidade Total; MP: Motilidade Progressiva; DAP: Distância Média Percorrida; DCL: Distância Curvilínea; DSL: Distância em Linha Reta; VAP: Velocidade Média de Trajeto; VCL: Velocidade Curvilínea; VSL: Velocidade Linear Progressiva; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF: Frequência de Batimentos Flagelar; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; WOB: Coeficiente de Oscilação. Fonte: (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN, 2002)

Figura 4 – Parâmetros de avaliação do Computer Assisted Semen Analysis (CASA).



Legenda: DAP: Distância Média Percorrida; DCL: Distância Curvilínea; DSL: Distância em Linha Reta; VAP: Velocidade Média de Trajeto; VCL: Velocidade Curvilínea; VSL: Velocidade Linear Progressiva; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça.

Fonte: (http://www.mibio.org/sites/default/files/images/CASA_terminology_img_assist_custom-450x241.png; VERSTEGEN, 2002).

Ainda não está bem definido qual das características do movimento espermático determinadas pelo sistema CASA, é capaz de prever a fertilidade ou a taxa de fertilização (ARRUDA, 2011), havendo controvérsias a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo* (VERSTEGEN, 2002). Na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que fertilizam mais de 50% de oócitos. As amostras com elevados valores de VAP, VCL, VSL, LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical e, além disso, parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos (VERSTEGEN, 2002). Ou ainda, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pelo CASA mostra maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas uma característica de movimento (ARRUDA, 2011).

As biotécnicas aplicadas à andrologia têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional dos espermatozoides em várias espécies, incluindo o suíno. Dessa forma, a funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente conhecidos como sondas fluorescentes (ARRUDA, 2011). Uma

variedade de sondas tem sido utilizadas na avaliação dos diferentes componentes celulares (SOUSA, 2007). Os corantes fluorescentes proporcionam avaliações mais objetivas das células espermáticas em relação aos métodos clássicos como a microscopia ótica. Estas, quando coradas com fluorescência podem ser avaliadas tanto quanto aos aspectos morfológicos como os funcionais, sem interferência do meio extracelular e a combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversos parâmetros celulares simultaneamente (MAIA, 2006).

Para a avaliação da integridade da membrana em espermatozoides suínos com o auxílio de microscopia de epifluorescência, Harrison e Vickers (1990), utilizaram diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (PI) como sondas fluorescentes. No geral foram encontradas duas populações de células: intactas (coradas com CFDA e não coradas com PI) ou danificadas (parcialmente coradas, ou não coradas com CFDA e coradas com PI).

A integridade das mitocôndrias e seu funcionamento também fazem parte do conjunto de fatores que indicam uma célula espermática íntegra e capaz de exercer sua função (CELEGHINI, 2005). Segundo Garner (1997), a rodhamina 123 é um fluorocromo capaz de corar mitocôndrias e apresentar imagens de alta fluorescência de mitocôndrias em células vivas. Esta, quando utilizada no espermatozoide apresentou capacidade de corar as mitocôndrias e identificar populações espermáticas que foram correlacionadas significativamente com a motilidade espermática, pois a observação se dá pela intensidade da fluorescência (coloração verde) que corresponde a atividade do corante.

Para estimar a integridade de acrossomo utiliza-se a técnica descrita por Kawamoto (1999), a qual prevê o uso da sonda a base de *Pisum sativum* conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) para avaliar a integridade das células espermáticas *in natura* ou submetidas ao resfriamento. Esta análise possibilita a marcação de duas subpopulações espermáticas, as com acrossomo intacto e com acrossoma danificado, marcando o acrossomo na cor verde amarelado, facilitando sua visualização. Sua eficiência foi comprovada através da correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides ligados ao FITC-PSA e a proporção de espermatozoides com acrossoma danificado nas amostras (ARRUDA, 2007).

A integridade da cromatina (DNA) é essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e união dos pró-núcleos feminino e masculino, uma vez que imperfeições na cromatina são incompatíveis com a fertilidade. Segundo

Evenson (1999), a avaliação da estrutura da cromatina espermática tem sido realizada com o uso da acridina laranja, um corante fluorescente que se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta se apresenta íntegra, todavia, quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA, ou quando associada ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANDRADE, 2010). As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio. O O_2 sofre redução, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos – superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2°) e hidroxila (OH°) e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – que normalmente sofre sua redução completa na mitocôndria (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MAIA, 2006).

A maioria dos seres vivos possui um eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas EROs formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios (DIAS, 2013). No ejaculado existem duas fontes principais de EROs, os espermatozoides e os leucócitos. Ambos possuem um mecanismo similar de geração de EROs (MAIA, 2006). Nos espermatozoides este estresse ocorre extra e intracelular e quando excede a capacidade dos antioxidantes disponíveis, o gameta fica altamente suscetível a danos (MAHFOUZ, 2010).

Os espermatozoides produzem espontaneamente uma variedade de EROs. Estes produzidos em pequenas quantidades são funcionalmente importantes na condução da motilidade, hipermotilidade, reação acrossômica e capacitação espermática (ANDRADE, 2010; MAHFOUZ, 2010, GUTHRIE e WELCH, 2012; BARRANCO, 2014). No entanto, quando ocorre um excesso de produção, o espermatozoide entra em um estado de estresse oxidativo, que é caracterizado por danos na membrana plasmática e na integridade de DNA (AITKEN, 2010).

Na espécie suína, os espermatozoides são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo, devido a sua membrana plasmática ser rica em ácidos graxos

poliinsaturados e ao conjunto de manipulação e processamento do ejaculado, que muitas vezes leva a um aumento nos níveis de ERO (CEROLINI, 2000). Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida (MAIA, 2006), logo, o conjunto desses fatores pode contribuir para a má qualidade do sêmen (BUCAK, 2010; GUTHRIE; WELCH, 2012). A utilização de antioxidantes parece ser uma forma eficiente de reduzir o estresse oxidativo não apenas *in vitro*, mas também *in vivo* e que numerosos antioxidantes têm provado esse efeito protetor contra o dano oxidativo no espermatozoide, assim melhorando os parâmetros seminais (BANSAL e BILASPURI, 2011).

1.4 ANTIOXIDANTES

Define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BANSAL e BILASPURI, 2011). Os antioxidantes convertem as EROs em água para prevenir a superprodução destes compostos (ANDRADE, 2010). Os antioxidantes agem em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida (MAIA, 2006; ANDRADE, 2010). Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de EROs, a célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático (MAIA, 2006).

Os antioxidantes não enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos dietéticos (DIAS, 2013). Dentre os antioxidantes que merecem destaque podemos citar o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), o ácido α -lipóico, a taurina, a hipotaurina, os compostos de selênio, o betacaroteno, o caroteno e as ubiquinonas (SIKKA, 2001; ANDRADE, 2010; BANSAL e BILASPURI, 2011)

Os antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais que atuam neutralizando o excesso de EROs e prevenindo danos estruturais na célula (BANSAL e BILASPURI, 2011). São eles a glutathione, a glutathione reduzida, a glutathione peroxidase, a catalase, o superóxido dismutase, o inositol e a cisteína (BANSAL e BILASPURI, 2011; DIAS, 2013).

O plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas EROs gerados pelo próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (MAIA, 2006). Devido sua capacidade biossintética ser limitada, é difícil para o espermatozoide substituir qualquer molécula que tenha sido danificada (AITKEN, 1995).

Os espermatozoides possuem um sistema intracelular de defesa antioxidante contra os EROs, que consiste principalmente de enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e redutase (AITKEN, 1995). No sistema extracelular, apresenta um complexo sistema antioxidante no plasma seminal como: ácido ascórbico, ácido úrico, hipotaurina, tirosina, α -tocoferol (OVERVELD, 2000) e mais recentemente nos suínos as paraoxonases (BARRANCO, 2014; 2015). Estes eliminam as espécies reativas de oxigênio e impedem a sua ação prejudicial em condições fisiológicas normais (CEROLINI, 2000; BANSAL e BILASPURI, 2011).

1.4.1 Paraoxonase tipo 1

As paraoxonases (PON), apresentam ação protetora contra o estresse oxidativo celular (AVIRAM e ROSENBLAT, 2004). As PONs são um complexo multienzimático (hidrolase, arilesterase, diaoxonase, fosfatase, peroxidase e lactonase) com propriedades antioxidantes, o que impede o aumento da quantidade de EROs e também apresentam efeitos protetores nas membranas celulares (AŞKAR e BÜYÜKLEBLEBICI, 2012) e neutralizam os efeitos da oxidação lipídica. Na família das PONs são incluídos três membros: PON1, PON2 e PON3 (AVIRAM e ROSENBLAT 2004).

A PON1 é uma enzima Ca^{2+} dependente sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea (AŞKAR e BÜYÜKLEBLEBICI, 2012; SCHNEIDER, 2013). Ela hidrolisa diversos compostos oxidantes e previne a oxidação de lipídeos, nas lipoproteínas de baixa (LDL) e alta (HDL) densidades (MACKNESS, 2010; SILVEIRA, 2014). A inibição da oxidação da LDL pela HDL é comumente atribuída ao seu conteúdo antioxidante como: α -tocoferol, licopeno e paraoxonase (LIMA e COUTO, 2006).

A PON2 é um antioxidante intracelular (não encontrada no plasma sanguíneo), amplamente distribuído e com capacidade para retardar a oxidação do

LDL. A PON3 também está associada com o HDL e também impede a oxidação do LDL (ROSENBLAT, 2005).

Estudos realizados com humanos sobre a expressão da família PON nos tecidos, observou-se a PON1 no fígado, rins e no cólon. Já o RNAm da PON2 em humanos foi encontrada nestes tecidos e também no pâncreas, cérebro, coração, baço, pulmão, intestino delgado, músculo esquelético, estômago, pâncreas, tireóide, ovário, placenta, pele, próstata e testículos (MACKNESS, 2010). Já estudo realizado por Marsillach (2008) indicou a presença de RNAm de PON1 no fígado, pulmão, coração, cérebro, rins, intestino delgado e testículos de ratos e nestes especialmente as espermatogônias, espermátocitos e espermátides redondas e alongadas apresentaram marcadores de PON1 e PON3 e muito fracamente a PON2.

A PON1 também já foi identificada no plasma seminal de humanos (VERIT, 2009), galos Leghorn (KHAN, 2012), touros (DEDEOĞLU, 2014) e no suíno (BARRANCO, 2014). A presença de PON1 no plasma seminal suíno apresenta propriedades antioxidantes quando está em alta atividade (BARRANCO, 2015).

A enzima PON1 está ligada funcionalmente ao colesterol e este por sua vez é um componente substancial na membrana plasmática dos espermatozoides. Por isso tem suma importância na modulação de sinalização de vias envolvidas na funcionalidade do esperma (BARRANCO, 2014). Barranco (2015), relatou que há diferenças individuais entre machos e entre ejaculados no mesmo macho, como também variações nos níveis de atividades da PON1, o que foi evidenciado a sua maior atividade na fração espermática. No geral, a atividade de PON1 no plasma seminal apresentou uma correlação negativa para a concentração enzimática e volume do ejaculado. Contudo, em relação a atividade enzimática demonstrou estar relacionada com o total de colesterol no plasma e com a concentração espermática (BARRANCO, 2014).

Em outro estudo realizado por Barranco (2015), a atividade enzimática da PON1 apresentou uma correlação positiva com a percentagem de espermatozoides com motilidade total e progressiva em 72h de armazenamento da dose inseminante. Além disso, a atividade da enzima em ejaculados contribuiu para altas taxas de parto (>85%).

Portanto, os estudos indicam que a paraoxonase, especialmente, a PON1 pode ser considerada como um marcador da fertilidade dos reprodutores suínos, pois ela é capaz de manter a motilidade espermática e diminuir os efeitos da EROs

no armazenamento e ainda está relacionada com altas taxas de parto. Porém, nesses estudos não há evidências da expressão de RNAm da PON1 nas gônadas do macho suíno e se há alguma correlação da PON1 com os parâmetros para o sêmen suíno *in natura*.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Avaliação da enzima PON1 no Plasma Seminal de Suínos nos Parâmetros do CASA, Viabilidade Espermática e sua Expressão de RNAm nos Tecidos do Testículo e Epidídimo

Evaluation of PON1 Enzyme in Seminal Plasma of Swine in the Parameters of CASA, Sperm Viability and their mRNA expression of the Testicle and Epididymis in Tissue

Matheus Schardong Lucca¹, Carlos Augusto Rigon Rossi², Bernardo Garziera Gasperin³, Thomas Lúcia Junior³, Karina Lemos Goularte⁴, Augusto Schneider⁵

¹Acadêmico de pós-graduação pela Universidade Federal de Santa Maria - RS. Autor para correspondência: schardonglucca@gmail.com.

²Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria - RS

³Departamento de Fisiopatologia da Reprodução da Universidade Federal de Pelotas - RS

⁴Acadêmico de Pós-Doutorado pela Universidade Federal de Pelotas - RS

⁵Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas - RS

Artigo a ser submetido a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, e apresentado de acordo com as normas da revista

Abstract

The seminal plasma is particularly important in sperm protection against damage caused by reactive oxygen species (ROS). The paraoxonase type 1 (PON1) is a multi-enzymatic complex with antioxidant properties, preventing the increase of ROS quantities, thus protects cell membranes and neutralizes the effects of lipid oxidation. The objective of this study was to correlate the influence of PON1 activity with the CASA system parameters and sperm viability (membrane integrity, acrosome integrity, functionality of mitochondria and DNA fragmentation) of swine semen *in natura*, and investigate the PON1 expression (mRNA) in testicle and epididymis (head, body and tail) tissue of boars. The sperm fraction (FE) presented the major PON1 activity and males 81, 80 and 79 ($P < 0.05$) showed the highest enzyme activity. But, when comparing the differences between the ejaculate samples, our study showed differences ($P < 0.05$) between males 81 and 92 in FE and sperm post fraction (PF). However, when the ejaculated was diluted (1:1), it has presented 44% average reduction in the activity of PON1. The activity of PON1 in FE showed positive correlation with sperm concentration, curvaceous distance, curvy velocity and DNA integrity ($P < 0.05$), and also showed negative correlation with straightness and linearity parameters advised by the CASA system. The mRNA expression was observed only in the body portion of the epididymis. The FE is the part of the ejaculate that more PON1 activity and presented the parameters DCL, VCL, STR and LIN, together, with concentration and sperm viability (integrity of DNA) are those who showed the greatest association with the enzyme. Already the PON1 was only expressed (Mrna) in the body of epididymis pig breeder.

Keywords: Ejaculated; sperm fraction; spermatozoon and gonads.

Resumo

O plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio (EROs). A paraoxonase tipo 1 (PON1) é um complexo multienzimático com propriedades antioxidantes, impedindo o aumento da quantidade de EROs, o que confere

proteção às membranas celulares e neutraliza os efeitos da oxidação lipídica. O estudo objetivou correlacionar a influência da atividade de PON1 com os parâmetros de avaliação do sistema Computer Assisted Semen Analysis (CASA) e a viabilidade espermática (integridade de membrana, integridade de acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e fragmentação do DNA) do sêmen suíno *in natura* e investigar a expressão da PON1 (RNAm) no tecido do testículo e epidídimo (cabeça, corpo e cauda) do reprodutor suíno adulto. A fração espermática (FE) apresentou a maior atividade de PON1 e os machos 81, 80 e 79 ($P < 0,05$) apresentaram a maior atividade de PON1. Já em relação a comparação entre as diferentes amostras do ejaculado, nosso estudo demonstrou diferenças ($P < 0,05$) nos machos 81 e 92 em relação a FE e a fração pós-espermática (FP). Entretanto, quando o ejaculado foi diluído (1:1) apresentou redução média de 44% na atividade da PON1. A atividade de PON1 na FE apresentou uma correlação positiva com a concentração espermática, DCL, VCL e IDNA ($P < 0,05$) e apresentou correlação negativa para os parâmetros de STR e LIN assessorados pelo sistema CASA. A expressão de RNAm somente foi observada para a porção do corpo do epidídimo. A FE é a parte do ejaculado que mais apresentou atividade da PON1 e os parâmetros DCL, VCL, STR e LIN, juntamente, com concentração e viabilidade espermática (integridade de DNA) são os que apresentaram a maior associação com a enzima. Já a PON1 foi somente expressa (RNAm) no corpo de epidídimo do reprodutor suíno.

Palavras-chaves: Ejaculado, fração espermática, espermatozoide e gônadas.

Introdução

A ampliação de programas de inseminação artificial em fêmeas suínas, permitiu a maximização do uso dos machos reprodutores e um maior controle na qualidade dos ejaculados. Assim, o desempenho reprodutivo dos cachacos acaba sendo uma parcela importante na eficiência econômica da atividade suinícola. Nesse contexto, a compreensão da anatomia e fisiologia da produção dos espermatozoides, pode auxiliar na seleção e no gerenciamento de machos para assegurar bons índices de fertilidade (Knox, 2015).

Um dos fatores que influenciam a fertilidade dos machos são as espécies reativas ao oxigênio (EROs). Os espermatozoides são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo, que causa lesões peroxidativas com danos na estrutura e no DNA do espermatozoide e, eventualmente, a infertilidade (Guthrie e Welch, 2012). Isso ocorre devido a membrana plasmática ser rica em ácidos graxos poliinsaturados e a manipulação e processamento do ejaculado, que muitas vezes leva a um aumento nos níveis de EROs (Cerolini *et al.* 2000).

Os espermatozoides dos suínos produzem uma variedade de EROs que desempenham papéis fisiológicos destacados no controle da capacitação e concomitante fosforilação da tirosina (Peña *et al.*, 2004). O plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas EROs (Maia, 2006), pois atua em um sistema intracelular (Aitken, 1995) e extracelular de defesa antioxidante. O sistema extracelular apresenta um complexo de antioxidantes no plasma seminal (Overveld *et al.* 2000), e entre estes, a paraoxonase tipo 1 (PON1), presente nos suínos (Barranco *et al.* 2014; 2015).

A paraoxonase tipo 1 é uma enzima cálcio-dependente sintetizada principalmente no fígado e secretada para o soro sanguíneo, onde é associada com as lipoproteínas de alta densidade, HDL (Dedeoğlu *et al.* 2014). Ela é um complexo multienzimático (hidrolase, arilesterase, diaoxonase, fosfatase, peroxidase e lactonase) com propriedades antioxidantes (Aviram e Rosenblat, 2004; Aşkar e Büyükleblebici, 2012). A paraoxonase tipo 1 está amplamente difundida pelos tecidos como indicou o estudo de Marsillach *et al.* (2008) na presença de RNAm de PON1 no fígado, pulmão, coração, cérebro, rins, intestino delgado e testículos de ratos, e nestes, especialmente nas espermatogônias, espermatócitos e espermátides.

O objetivo do estudo foi correlacionar a influência da atividade de PON1 com os parâmetros do sistema CASA e com a viabilidade espermática (integridade de membrana, integridade de acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e fragmentação do DNA) do sêmen suíno in natura e investigar a

expressão da PON1 (RNAm) no tecido do testículo e epidídimo (cabeça, corpo e cauda) do reprodutor suíno adulto.

Material e Métodos

Animais, coleta e processamento de sêmen

Foram usados nesse estudo ejaculados de seis machos híbridos da linhagem Agroceres/Genetipork, com dois anos de idade. Esses machos foram identificados (brincos 79, 80, 81, 82, 92 e 96) e alojados individualmente em baias com aproximadamente 7m², localizadas na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, no município de Capão do Leão/RS, Brasil. Este estudo teve aprovação da comissão de ética no uso de animais conforme parecer nº135/2014 da Universidade Federal de Santa Maria/RS, Brasil.

As coletas de sêmen foram realizadas no período da manhã através da técnica da mão enluvada (Hancock e Howell, 1959), e o sêmen foi coletado duas vezes por semana por um período de três semanas, totalizando 36 ejaculados. A colheita de sêmen foi realizada em recipiente plástico com capacidade de 500mL, previamente aquecido a 35°C, coberto com gaze (separação da fase gelatinosa do ejaculado). Cada ejaculado foi separado durante a coleta nas frações espermática (+-56,62mL) e pós-espermática (+-179,13mL). Também foi realizada a diluição do sêmen em 1:1 em diluente comercial Eobos (Gestión Veterinaria Porcina, Madri, Espanha).

Obtida a colheita de cada fração, essa foi pesada (obtenção do volume), e retirada uma alíquota de 2mL para posterior avaliação da atividade PON1. Após foi realizada a misturas das frações e retirada outra alíquota de 2mL. Para a estimativa da concentração foi retirada uma alíquota de 10µL do sêmen *in natura* e diluída em 990µL de formol salina e mensurada em câmara de *Neubauer* pela microscopia óptica (aumento de 400x).

Avaliação dos parâmetros espermáticos

Para a estimativa dos parâmetros espermáticos foi retirada uma alíquota de 10µL do sêmen *in natura* e diluída em 990µL de diluente comercial Eobos, e dessa amostra, foram retirados 3µL e colocado na *LEJA* (lâmina com 4 câmaras, 20µm de altura) por capilaridade para realizar a avaliação da

motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); distância média percorrida (DAP; μm); distância curvilínea (DCL, μm); distância em linha reta (DSL, μm); velocidade média de trajeto (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$); velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$); velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$); retilinearidade (STR, %); linearidade (LIN, %); coeficiente de oscilação (WOB, $\mu\text{m s}^{-1}$); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm); frequência de batimentos flagelar (BCF, Hz); através do Sistema CASA (*software AndroVisionTM* – Minitüb, Tiefenbach, Alemanha).

A avaliação da integridade de membrana (IM) foi realizada conforme Harrison e Vickers (1990), em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP). As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde/vermelha foram consideradas lesadas.

A funcionalidade mitocondrial (FM) foi avaliada com o uso de uma sonda específica, rodhamina 123 (Rh123) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, 23 USA), (Garner *et al.* (1997). As células foram avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. As células espermáticas que apresentaram a parte intermediária com intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias íntegras (funcionalmente ativas), enquanto as células sem ou com pouca intensidade de fluorescência verde na parte intermediária foram consideradas não funcionais.

A integridade do acrossoma (IA) foi realizada como descrito na literatura (Kawamoto *et al.* 1999). Foram avaliados 100 espermatozoides por lâmina. As lâminas foram avaliadas sob um aumento de 1.000x em microscópio de epifluorescência. As células com acrossoma considerados íntegros não apresentaram rugosidades, vacúolos e emitiram fluorescência verde. As demais foram classificadas como células com acrossoma danificado.

A integridade de DNA (IDNA) foi avaliada pela técnica descrita por Evenson *et al.* (1999). As amostras foram avaliadas em microscópio de epifluorescência sob aumento de 1.000x. Foram consideradas células com DNA normal (bicatenário) aquelas que apresentaram fluorescência verde e

quando as células apresentaram coloração laranja foram consideradas DNA desnaturado (monocatenário).

Mensuração da Atividade de PON1

A atividade arilesterase da PON1 foi mensurada por espectrofotometria (CIRRUS 80MB; FEMTO Indústria, São Paulo, SP, Brasil) a partir da velocidade de formação de fenol através da monitorização do aumento da absorbância na faixa de 270nm a 25°C. O reagente de trabalho consistiu em Tris/HCl 20mM, pH 8,0; contendo 1mM de CaCl₂ e 4mM de fenilacetato como substrato. As amostras foram diluídas 1:3 em tampão Tris/HCl, adicionadas a solução de trabalho e a mudança na absorbância foi registrada durante 60 segundos. Uma unidade de atividade da PON1 arilesterase foi considerada igual a 1mM de fenol formado por minuto. A atividade foi expressa em U L⁻¹, com base no coeficiente de extinção de fenol. Para corrigir a hidrólise não enzimática, foram utilizadas amostras brancas contendo água (Browne, 2007).

Extração de RNA, transcrição reversa e *PCR* em tempo real

Um reprodutor suíno foi submetido a orquiectomia sob anestesia geral (Midazolan = 0,1mg kg⁻¹; Xilazina = 0,3 mg kg⁻¹ e Ketamina = 4 mg kg⁻¹). As amostras de cada fração (testículo e epidídimo) foram coletadas, imediatamente colocadas em nitrogênio líquido para o transporte, e posteriormente armazenadas em temperatura inferior a -80°C.

O RNA total foi extraído dos tecidos testiculares e dos tecidos epididimários através do protocolo Trizol (Ferreira, et. al., 2011). A quantificação de RNA purificado foi obtida utilizando espectrofotometria na faixa de absorbância de 260/280nm (NanoDrop spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A taxa de pureza foi considerada 1,8, sendo que todas as amostras ficaram acima desse limite. O RNA total foi tratado com 0.1U DNase (Invitrogen) a 37°C por 5 min para digerir qualquer DNA contaminante.

Após a inativação da DNase a 65°C por 10 min, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o *kit iScript cDNA Synthesis* (BioRad) num volume final de 20µl, seguindo o protocolo do fabricante. Esta reação de transcrição reversa foi realizada nas seguintes temperaturas: 25°C – 5min,

42°C – 30min e 85°C – 5min. A expressão gênica foi acessada por PCR em tempo real, sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada em relação à amplificação do gene *beta-actina* (pACTB; F: AGGCGGACTGTTAGTTGCAT; R: TGTCACCTTCACCGTTCCAG).

O PCR em tempo real (BioRad; CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Hercules, CA, EUA) foi realizado em dois passos: a) com a desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15seg e, b) anelamento/extensão a 58°C, para análises de 30 segundos da curva de fusão para verificar a identidade do produto. Para otimizar o ensaio de PCR em tempo real, diluições em série do cDNA foram usadas para gerar uma curva padrão.

A curva padrão foi construída representando o *log* da quantidade inicial do fator de diluição, contra o valor de Ct (número de ciclos) obtido durante a amplificação de cada diluição. Reações com um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,98 e eficiência entre 95 a 105% foram considerados otimizados. O método da curva padrão relativo foi usado para avaliar a expressão do gene paraoxonase tipo 1 (pPON1; F: TGAACCCGATAAGCCTGGAAA; R: CTGGATGGCTCACCACTAGC).

Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (4µl), com base no *ladder* (*Invitrogen*™ 100bp, Carlsbad, CA, EUA).

Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o Statistix 10 (*Analytical Software*, Tallahassee, FL, EUA), e para os dados apresentarem qualidade e funcionalidade, estes foram avaliados pelo teste de normalidade. A análise da atividade de paraoxonase foi realizada utilizando ANOVA para comparar os efeitos da variabilidade entre os machos e entre as porções de sêmen. Para medir a relação da atividade de paraoxonase (fração espermática e ejaculado total) com os parâmetros espermáticos do CASA foi utilizado o teste de correlação paramétrica de Pearson e para os parâmetros relativos a viabilidade espermática (IM, FM, IA e IDNA), concentração e motilidade total foi utilizado o

teste não paramétrico de Spearman. As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Resultados e Discussões

Ao analisar a tabela 1 observamos uma variação atividade de enzimática de PON1 ($P < 0,05$) na fração espermática (FE) do ejaculado dos diferentes doadores em relação as variáveis analisadas. Porém, os machos 81, 80 e 79, apresentaram a maior atividade de PON1. De certa forma podemos estimar que estes machos apresentam uma qualidade espermática melhor, pois conforme Verit *et al.* (2009), em humanos, existe uma relação direta entre a baixa atividade de PON1 com parâmetros seminais anormais.

A variabilidade entres os ejaculados totais (ET) dos suínos não foi influenciada ($P > 0,05$) em relação a atividade da PON1, contudo o plasma seminal é um *pool* de fluídos que apresentam origem testicular, epididimária e das glândulas sexuais anexas (Saravia, *et al.* 2009) e, talvez, conforme Verit *et al.* (2009), em humanos, a diminuição da atividade de PON1 estaria relacionada com a produção de EROs. Já por outro lado, o estudo de Barranco *et al.* (2014; 2015), evidenciou diferenças entre os machos avaliados para os ET e entre as frações do ejaculado. Uma possível explicação para estes resultados estaria relacionada com a composição bioquímica do plasma seminal (Barranco, *et al.* 2014).

Tabela 1. Atividade enzimática da paraoxonase tipo 1 no plasma seminal nas frações espermática, pós-espermática, ejaculado total e do ejaculado diluído no sêmen de suíno.

Identificação	Atividade da Paraoxonase tipo 1 (UI mL ⁻¹)				DPR	
	Machos	FE	FP	ET		ED
79		3,140 ^{ab}	1,134	1,965	1,423	+0,787
80		3,302 ^a	1,772	2,067	1,860	+1,150
81		3,341 ^{aA}	1,358 ^B	2,212 ^A	1,394 ^B	+0,686
82		1,546 ^{bc}	0,957	1,289	0,812	+0,990
92		1,641 ^{bcA}	0,978 ^B	1,190 ^B	0,805 ^B	+0,290
96		1,003 ^C	0,907	1,167	1,058	+1,147
DPR		+0,450	+0,680	+0,5085	+0,428	

FE: Fração Espermática; FP; Fração Pós-Espermática; ET: Ejaculado Total; ED: Ejaculado Diluído 1:1; DPR: Desvio Padrão Residual. Letras ^{abc}: apresentam diferenças significativas na coluna. ($P < 0,05$). Letras ^{AB}: apresentam diferenças significativas na linha ($p < 0,05$)

Quando comparamos as diferentes amostras do ejaculado, nosso estudo demonstrou diferenças ($P < 0,05$) em dois (81 e 92) dos seis machos avaliados

quanto a FE e a FP. Entretanto, apesar dos demais ejaculados não terem apresentado diferenças estatísticas, nosso estudo apresentou resultados semelhantes aos estudos de Barranco *et al.* (2015) em que a fração espermática apresentou maior atividade de PON1 em relação a pós-espermática e isso poderia estar ligado às altas concentrações de colesterol (Barranco *et al.* 2014).

Ao avaliarmos a atividade de PON1 no ejaculado diluído (ED) 1:1, este demonstrou uma diminuição média de 45,8% e 25% ($P>0,05$) em relação a FE e ET, respectivamente, em todos os machos. Contudo os machos 81 e 92, apresentaram uma queda ($P<0,05$) de 54% e 34% em relação a FE e ET, respectivamente, na atividade de PON1 após a diluição. Esta redução drástica observada em nosso estudo, semelhante aos resultados Verit *et al.* (2009), pode estar relacionada a manipulação e processamento do ejaculado, que muitas vezes leva a um aumento nos níveis de EROs (Cerolini *et al.* 2000; Barranco *et al.* 2014).

Em relação aos coeficientes de correlações entre a atividade de PON1 com os parâmetros avaliados pelo CASA (Tab. 2), observamos que a paraoxonase tipo 1 apresentou associação positiva ($P<0,05$) com a distância curvilínea percorrida e também ($P<0,05$) com a velocidade curvilínea, considerada a velocidade da trajetória real do espermatozoide. Diversos estudos (Verstegen *et al.* 2002; Broekhuijse *et al.* 2012) demonstraram correlação positiva da VCL com a qualidade espermática e assim determinaram melhores taxas reprodutivas e isso corrobora com os encontrados por Barranco *et al.* (2015), que correlacionaram a alta atividade da enzima PON1 no plasma seminal de doses inseminantes ($2,5 \times 10^9$ espermatozoides mL^{-1} em 80mL, 2 a 3 inseminações cervicais por estro) com o aumento na taxa de partos do rebanho avaliado.

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre a atividade da enzima paraoxonase tipo 1 (PON1), na fração espermática e no ejaculado total, em associação com os parâmetros de avaliação do Computer Assisted Sperm Analise (CASA).

Parâmetros	Média (n=36 ejaculados)	Desvio Padrão	Atividade Paraoxonase Tipo 1			
			Fração Espermática	P-valor	Ejaculado Total	P-valor
MP	61,96	13,95	0,0986	0,5913	-0,2631	0,1457
DAP	20,87	2,99	0,2850	0,1139	-0,1016	0,5800
DCL	40,26	5,83	0,3542	0,0467	-0,0072	0,9687
DSL	14,83	1,72	0,1254	0,4942	-0,2753	0,1273
VAP	45,25	7,38	0,2896	0,1079	-0,0822	0,6547
VCL	86,98	13,40	0,3702	0,0370	-0,0023	0,9898
VSL	32,16	4,03	0,1637	0,3707	-0,2476	0,1718
STR	0,71	0,05	-0,3580	0,0442	-0,2059	0,2582
LIN	0,37	0,03	-0,3691	0,0377	-0,3178	0,0763
WOB	0,52	0,03	-0,1688	0,3557	-0,2148	0,2379
ALH	2,71	0,61	0,3159	0,0782	0,0646	0,7253
BCF	33,28	2,31	0,1686	0,3564	-0,1224	0,5045

MP: Motilidade Progressiva; DAP: Distância Média Percorrida; DCL: Distância Curvilínea; DSL: Distância em Linha Retas; VAP: Velocidade Média de Trajeto; VCL: Velocidade Curvilínea; VSL: Velocidade Linear Progressiva; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF: Frequência de Batimentos Flagelar; STR: Retilinearidade; LIN: Linearidade; WOB: Coeficiente de Oscilação.

Diferentes estudos (Arruda *et al.* 2002; Matos 2008; Vertengen *et al.* 2009, Gallego 2010) demonstram que os parâmetros de STR e LIN poderiam refletir em melhora da capacidade de movimentação retilínea das células espermáticas, melhor migração, penetração no muco cervical, correlação positiva para taxa de prenhez e com relação ao sêmen criopreservado, melhora a qualidade espermática, mas em outros estudos a correlação é negativa. Contudo, quando observamos a correlação da atividade de PON1 com a STR e LIN, esta associação acabou sendo negativa ($P < 0,05$), ou seja, podemos estimar que a enzima atuou diminuindo esses parâmetros. Entretanto, como o parâmetro de VCL apresentou associação positiva conforme já abordado, e este, juntamente com STR e LIN poderiam, apresentar associações positivas com a qualidade espermática. Portanto, a atividade de PON1 com relação aos parâmetros do sistema CASA deve ser melhor elucidada e ainda, se possível associar as múltiplas variáveis de movimento geradas pelo sistema CASA mostraria, talvez, a maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas uma característica de movimento (Arruda *et al.* 2011).

Conforme o estudo do Barranco *et al.* (2014) foi observada uma alta correlação entre a atividade de PON1 no plasma seminal e a concentração espermática no ejaculado. Em nosso trabalho (Tab. 3), conseguimos demonstrar o mesmo efeito, contudo, somente com a FE, a qual apresentou uma associação expressiva ($P < 0,0001$) da concentração espermática em relação a atividade de PON1. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Verit *et al.* (2009), ao utilizar sêmen humano e, isso poderia estar relacionado à menores níveis de EROs em amostras de sêmen com alta concentração de espermatozoides ou devido a com concentração de colesterol (Barranco *et al.* 2014) que poderia ser mais elevada na cauda do epidídimo.

Tabela 3. Coeficientes de correlação (não paramétrica) entre a atividade de paraoxonase tipo 1 (PON1), na fração espermática e no ejaculado total, em associação com a concentração espermática, motilidade total, integridade de DNA, integridade de acrossoma, integridade de membrana e funcionalidade de mitocôndria.

Parâmetros	Média (n=36 ejaculados)	Desvio Padrão	Atividade Paraoxonase Tipo 1			
			Fração Espermática	P-valor	Ejaculado Total	P-valor
Concentração	$3,5 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$	0,7000	0,0001	0,2636	0,1441
MT	78,64	10,59	0,1135	0,5343	-0,1423	0,4359
IDNA	0,95	0,10	0,3793	0,0328	0,4863	0,7568
IA	0,87	0,18	0,1815	0,3179	0,0567	0,1884
IM	0,84	0,10	0,1543	0,3963	0,2535	0,1608
FM	0,78	0,15	0,1938	0,2863	0,2440	0,1776

MT: Motilidade total; IDNA: Integridade de DNA; IA: Integridade de acrossoma; IM: Integridade de membrana FM: Funcionalidade de mitocôndria;

Quanto aos coeficientes de correlações entre a atividade de PON1 e os parâmetros de viabilidade espermática como: integridade de membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, integridade de acrossoma e integridade de DNA espermático, somente a integridade de DNA apresentou associação positiva ($P < 0,05$) com a atividade de PON1 na FE. Conforme Barranco *et al.* (2015), a PON1 no plasma seminal do suíno apresenta propriedades antioxidantes quando está em alta atividade e Barranco *et al.* (2014), também observou-se uma correlação positiva entre a atividade de PON1 e a concentração de colesterol total no plasma seminal, contudo, a PON1 só realiza sua função de antioxidante quando está associada ao HDL

(Aşkar; Büyükleblebici, 2012), e assim essa associação, protege as células espermáticas da peroxidação lipídica (Verit *et al*, 2009), em virtude disso a menor taxa fragmentação de DNA, preservando um melhor qualidade seminal.

Um dos objetivos de nosso estudo foi investigar a expressão de RNAm de PON1 nos tecidos testicular e epididimário. Com base no PCR em tempo real, nossos resultados indicam que há uma baixa expressão de PON1 nos tecidos avaliados (aproximadamente 35 ciclos) no epidídimo direito (corpo; Fig. 1). Confirmou-se que o produto amplificado era compatível com 176 pares de base (pb), tamanho esperado para o qual os *primers* de PON1 foram delineados (Fig. 2). Não foi possível verificar a expressão do RNAm para a PON1 nos demais tecidos. Mackness *et al* (2010), também não encontraram expressão de RNAm no testículo de pacientes humanos; em contraste ao estudo de Marsillach *et al*. (2010), que encontraram altos níveis de expressão da PON1 em tecido testicular de pacientes humanos inférteis. Embora o estudo de Xie *et al*. (2009) não tenha avaliado este tecido, encontrou a expressão de PON1 no rim, fígado, pulmões e intestino em suínos (raça Dahuabai).

Quanto ao nosso estudo, podemos descartar a hipótese de que estes tecidos tenham se deteriorado, pois houve expressão do gene beta-actina (*housekeeping*). Embora os valores obtidos na curva padrão para o gene PON1 não foram satisfatórios ($R^2 < 0,98$ e eficiência $> 105\%$), e que não houve amplificação de PON1, no intestino de um suíno adulto em nosso estudo (tecido considerado positivo na literatura, Xie *et al*. 2009), não podemos descartar um problema no anelamento do primer. São necessários mais testes com outros tecidos considerados positivos em suínos para a expressão de PON1, como os tecidos avaliados por Xie *et al*. (2009). Portanto, não podemos afirmar que estes tecidos não expressam a PON1. Mas, os dados obtidos até o momento sugerem que o gene PON1 é expresso no epidídimo de suínos. No entanto, essa expressão não é compatível com as concentrações encontradas no plasma seminal, principalmente na FE, indicando assim que a PON1 seja derivada de outros órgãos, atingindo os testículos/epidídimos/trato reprodutivo por via endócrina.

Figura 1. Expressão do gene da enzima paraoxonase tipo 1 (PON1), em tecido testicular e epididimário do suíno através de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

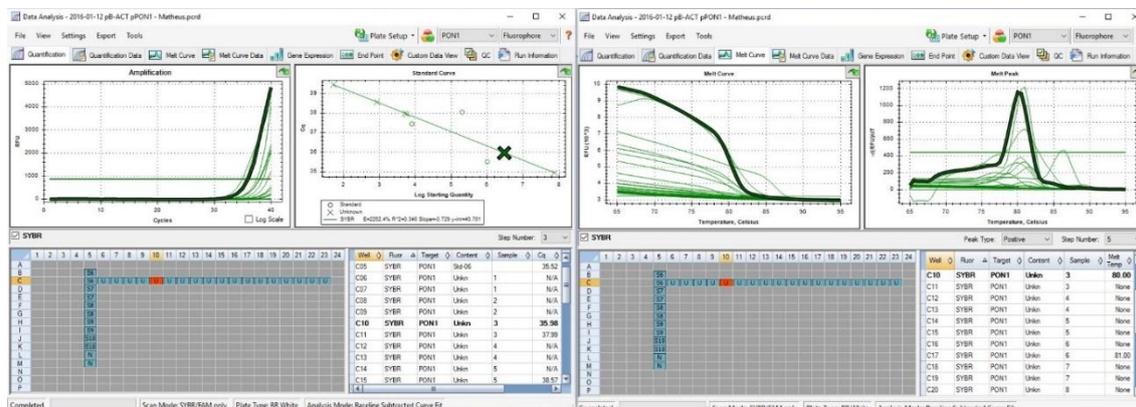
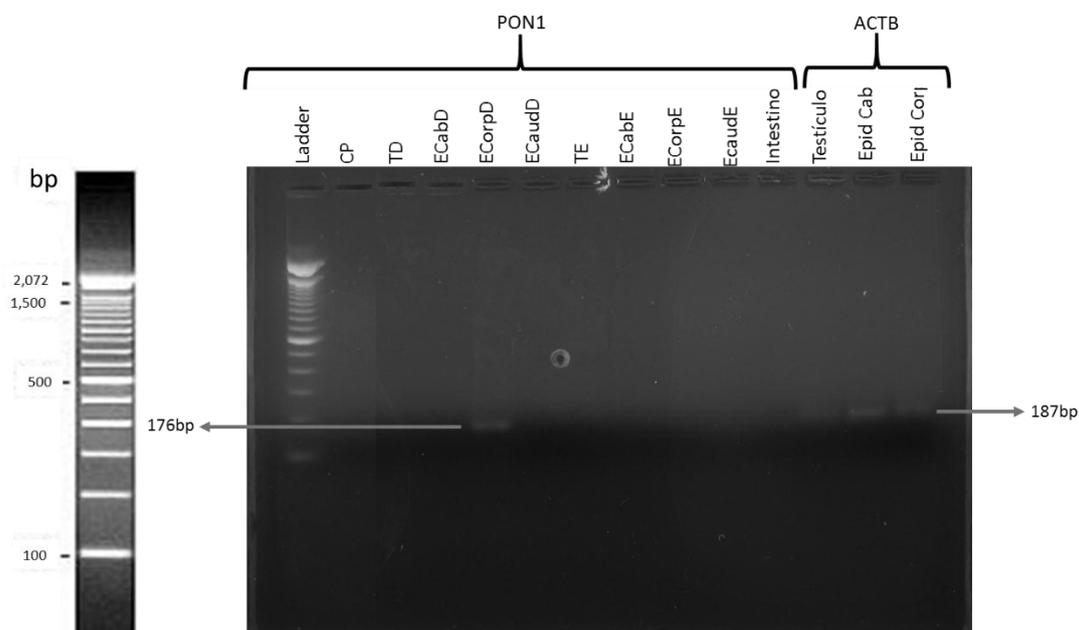


Figura 2. Expressão do RNAm para enzima paraoxonase tipo 1 (PON1), em tecido testicular e epididimário do suíno.



Legenda: PON1: Paraoxonase Tipo 1; ACTB: Beta-actina; CP: Curva Padrão; TD: Testiculo Direito; ECabD: Epidídimo Cabeça Direito; ECorpD: Epidídimo Corpo Direito; EcaudD: Epidídimo Cauda Direito; TE: Testiculo Esquerdo; ECabE: Epidídimo Cabeça Esquerdo; ECorpE: Epidídimo Corpo Esquerdo; EcaudE: Epidídimo Cauda Esquerdo.

Conclusões

A FE é a porção do ejaculado que mais apresentou atividade de PON1 e os parâmetros DCL, VCL, STR e LIN, assessorados pelo CASA, são os que apresentaram a maior associação com está enzima. A atividade de PON1 também está associada positivamente com a concentração e viabilidade

espermática (integridade de DNA). Já a PON1 foi somente expressa (RNAm) no corpo de epidídimo do reprodutor suíno.

Referências

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fert. Develop.*, v.7, p. 659-668, 1995.

ARRUDA, R.P.; GUTHRIE, A.F.C.; PERES, K.R.; et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE C.G.; et al. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology.*, v.58, p.253-256, 2002.

AŞKAR, T. K. E BÜYÜKLEBLEBICI, O. Paraoxonase: A new biochemical marker of oxidant-antioxidant status in atherosclerosis. In__Lushchak, V. Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects. Croacia: In Tech (Ed.), University Campus. p.145-154, 2012.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic. Biol. Med.*, v.37, n.9, p.1304-1316, 2004.

BARRANCO, I.; ROCA, J.; TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Measurement of activity and concentration of Paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. *Mol. Reprod. Dev.*, v.82, p.58-65, 2014.

BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATIÑO, C. et al. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and *in vivo* fertility. *Andrology*, v.3, p.315-320, 2015.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J.; SOSTARIC, E.; FEITSMA, H. et al. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci.*, v.90, p.779-789, 2012.

BROWNE, R.W. Accuracy and biological variation of human serum Paraoxonase1 activity and polymorfism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clin. Chem.*, v.53, n.2, p.310-317, 2007.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, v.58, p.99-111, 2000.

DEDEOĞLU, N.; ARSLAN, M.; ERZENGIN, M. Purification of holstein bull semen Paraoxonase 1 (PON1) by hydrophobic interaction chromatography and investigation of its inhibition kinetics by heavy metals. *Biol. Trace Elem. Res.*, v.158, n.1, p.29-35, 2014.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, v.14, n.4, p.1039-1049, 1999.

FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; SANTOS, J. et al. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone Syst.*, v.12, n.4, p.475-82, 2011.

GALLEGO, A.M. *Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo*. 2010. 117p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo.

GARNER, D.L.; THOMAS A.C.; JOERG, H.W. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1401-06, 1997.

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

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

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.88, p.343-352, 1990.

KAWAMOTO, A. KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; et al. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil. Steril.*, v.71, p.497-501, 1999.

KNOX, R.V. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, v.30. p.1-11. 2015.

MAIA, M.S. *Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase*. 2006. 185p Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu.

MACKNESS, B.; BELTRAN-DEBON, R.; ARAGONES, G.; et al. Human tissue distribution of Paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life*, v.62, n.6, p.480-482, 2010.

MATOS, D. L. *Sobrevivência in vitro e fertilidade do sêmen suíno diluído a diferentes taxas de diluições e conservado a 17°C*. 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal). – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza.

MARSILLACH, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.*, v.45, p.146-157, 2008.

MARSILLACH, J.; LAFUENTE, R.; CHECA, M.A. *et al.* Paraoxonase-1 is only present in traceable amounts in seminal fluid and does not show any relationship with male subfertility. *BJU International.*, v.108, p.566-570, 2010.

OVERVELD, F.W.P.C.; HAENEN, G.R.M.M.; RHEMREV, J.; *et al.* Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact.*, v.127, p.151-161, 2000.

PEÑA, F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, v.12, p.117–124, 2004.

RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAIVIA, F.; WALLGREN, M. *et al.* Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, p.514- 535, 2005.

SARAIVIA F., WALLGREN M., JOHANNISSON, A. *et al.* Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology*, v.71, p.662-675, 2009.

VERIT, F.F.; VERIT, A; CIFTCI, H.; *et al.* Paraoxonase -1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. *J Androl.*, v.30, n.2 p.183-189, 2009.

VERSTEGEN, J. IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p.149-179, 2002.

XIE, S.; LI J.; CHEN, Y. *et al.* Sequence identification, chromosomal mapping and tissue specific expression of the porcine paraoxonase 1 (PON1) gene. *Mol Biol Rep.*, v.37, p.1347-1353, 2010.

REFERÊNCIAS

- AALBERS, J. G.; MANN, T.; POLGE, C. Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**, v. 2, p. 42-53, 1961.
- ABIPECS. **Relatório 2012/2013**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acessado em: 09/12/15.
- ABRAHÃO, A. A. F. **Vitamina A na nutrição de cachaços: I - Fatores relacionados ao condicionamento de machos reprodutores suínos para a colheita de sêmen. II - Análise qualitativa e quantitativa do sêmen de cachaços submetidos à suplementação de vitamina A na dieta**. 2006. 125p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2006.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M. et al. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415-2426, 2010.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-86, 2010.
- AREND, L. S.; MAGNABOSCO, D.; WENTZ, I. et al. Avaliação do custo de doses inseminantes suínas em diferentes cenários. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 116-120, 2014.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

ASHDOWN, R. R.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Masculina. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 6. ed. 1996. p. 03-20.

AŞKAR, T. K.; BÜYÜKLEBLEBICI, O. Paraoxonase: a new biochemical marker of oxidant-antioxidant status in atherosclerosis. In: LUSHCHAK, V. **Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects**. Rijeka: InTech 1.ºed. p. 145-154. 2012.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1304-1316, 2004.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**. v. 11. 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/>>. Acesso em: 9 dez. 2015. DOI: 10.4061/2011/686137.

BARRANCO, I.; ROCA, J.; TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Measurement of activity and concentration of Paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. **Molecular Reproduction & Development**, v. 82, p. 58-65, 2014.

BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATIÑO, C. et al. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and *in vivo* fertility. **Andrology**, v. 3, p. 315-320, 2015.

BRACKETT, B. G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 12. ed. p. 623-643. 2014.

BRINSKO, S. P. Reproductive physiology of the male. In: CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Veterinary Physiology**. St Louis: Saunders Elsevier. 4. ed. p. 517-527. 2007.

BUCAK, M.N.; SARIOZKAN, S.; TUNCER, P. B. et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 1, p. 24-30, 2010.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 188p. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo. São Paulo. 2005.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99-111, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed. Belo Horizonte: CBRA. p. 104. 2013.

CORRÊA, M. N.; MEINCKE, W.; LUCIA, JR. T. et al. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar Gráfica e Editora, 2001. 181p.

DEDEOĞLU, N.; ARSLAN, M.; ERZENGIN, M. Purification of holstein bull semen Paraoxonase 1 (PON1) by hydrophobic interaction chromatography and investigation of its inhibition kinetics by heavy metals. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 1, p. 29-35, 2014.

DIAS, A. V. **Ação de substâncias antioxidantes e a influência da ambiência sobre a qualidade do sêmen suíno**. 2013, 91p. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal.) - Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2013.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-06, 1997.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 6. ed. p. 167-190. 1996.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema reprodutor masculino. In: GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2. ed. 2003. p. 402-418.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press: New York. 3. ed. 936p. 1999.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H. et al. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 497-501, 1999.

KHAN, R. U.; LAUDADIO, V.; TUFARELLI, V. Semen traits and seminal plasma biochemical parameters in white leghorn layer breeders. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 190-195, 2012.

KNOX, R. The **Anatomy and Physiology of Sperm Production in Boars**. Department of Animal Sciences. University of Illinois, p. 11, 2003.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

MACKNESS, B.; BELTRAN-DEBON, R.; ARAGONES, G. et al. Human tissue distribution of Paraoxonases 1 and 2 mRNA. **Biochemistry and Molecular Biology for Life Scientists**, v. 62, n. 6, p. 480-482, 2010.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006. 185p Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu. 2006.

MAHFOUZ, R. Z.; DU PLESSIS, S. S.; AZIZ, N. et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 814-821, 2010.

MATOS, D. L. **Sobrevivência in vitro e fertilidade do sêmen suíno diluído a diferentes taxas de diluições e conservado a 17°C**. 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal). – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2008.

MARSILLACH, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 146-157, 2008.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D. S.; LIMA, D. et al. Alterações endócrinas em reprodutores suínos de alto desempenho: Relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n. 1, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/1769/8120>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.5216/cab.v11i1.1769.

OVERVELD, F. W. P. C.; HAENEN, G. R. M. M.; RHEMREV, J. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico-Biological Interactions**, v. 127, p. 151-161, 2000.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M. et al. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p. 514-535, 2005.

RONDON, R. M. M.; ARAÚJO, A. A.; TONIOLLI, R. et al. Perspectivas sobre o uso de antioxidantes na conservação do sêmen de suínos. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 365-375, 2012.

ROSENBLAT, M.; VAYA, J.; SHIH, D. et al. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, v. 179, p. 69-77, 2005.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V. A.; ESPOSITO, G. et al. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 48, p. 989-994. 2013.

SEAB. **Análise da Conjuntura Agropecuária**. In: (Ed.). Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Suinocultura. 2013. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf. Acesso em: 9 dez. 2015.

SENGER, P. The organization and function of the male reproductive system. In. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, Inc, 2003, p. 44-79.

SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D. E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press. 2. ed., v. 1. 1993 p. 1063-1143.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 851-862, 2001.

SILVEIRA, P. A. S. **Caracterização de polimorfismos na região do promotor do gene da paraoxonase 1 (PON1) e seu efeito sobre a atividade enzimática em vacas leiteiras**. 2014. 36p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2014.

SOUSA, D. B. **Variabilidade das subpopulações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. 2007. 122p. Tese (doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2007.

TONIOLLI, R. Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 365-375, 2012.

VERIT, F. F.; VERIT, A; CIFTCI, H. et al. Paraoxonase -1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 2 p. 183-189, 2009.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

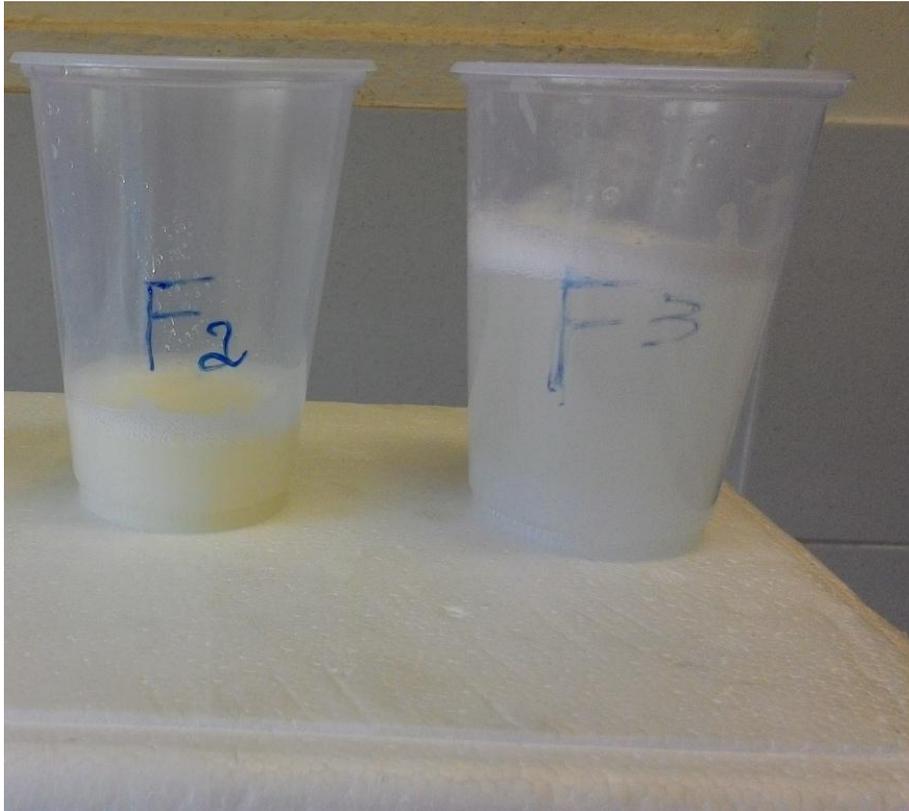
WENTZ, I.; BORTOLOZZO F.P. Inseminação artificial em suínos. In: **Suinocultura intensiva: Produção, manejo e saúde do rebanho**. 1.ed. Brasília: Serviço de produção de informação, cap.10, p.209-220, 1998.

APÊNDICES

**APÊNDICE A – INSTALAÇÃO DE ALOJAMENTO E COLETA DE SÊMEN UFPEL -
REPROPEL**



APÊNDICE B – COLETA DE SÊMEN PELO MÉTODO DA MÃO ENLUVADA

APÊNDICE C – FRAÇÕES DO EJACULADO SUÍNO.

F2: Fração espermática; F3: Fração pós-espermática

APÊNDICE D – SISTEMA CASA DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.