

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETRINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS EM  
ESPERMATOZOIDES DE SUÍNOS SUPLEMENTADOS COM  
VITAMINAS E MINERAIS**

Fernanda Maria de Almeida Celestino  
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Julho de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS EM  
ESPERMATOZOIDES DE SUÍNOS SUPLEMENTADOS COM  
VITAMINAS E MINERAIS**

Fernanda Maria de Almeida Celestino

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co- orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Galvão de Albuquerque

Co- orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Thomas

Co- orientador: Pof. Dr. Robson Carlos Antunes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em Genética e  
Melhoramento Animal

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Julho de 2012

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FERNANDA MARIA DE ALMEIDA CELESTINO** – nascida na cidade de Jaboticabal, em 19 de Novembro de 1978. Ingressou em março de 1996 no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” em Jaboticabal. Graduou-se em Zootecnia em maio de 2000, com os prêmios: **Prêmio Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, da Universidade Estadual Paulista, do Câmpus de Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista, e **Prêmio Dr. Henrique Francisco Raimo**, Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo. Iniciou em Março de 2006 o curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento Animal, em nível de mestrado na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias em Jaboticabal, concluindo em março de 2007. Ingressou em Agosto de 2008 no curso de doutorado (bolsista Cnpq) nesta mesma instituição.

## **DEDICO**

Aos meus pais, Bete e Renato

Aos meus irmãos Renata e João Ricardo

Aos amigos muito especiais que me ajudaram em momentos difíceis,  
que me deram as mãos e mostraram que existia uma luz.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter sido meu protetor, fortaleza e refúgio.

À Nossa Senhora, por sua intervenção, por ter me aberto o caminho e mostrado que não há nó na vida das pessoas que ela não possa desatar com suas mãos dedicadas.

Ao meus pais, por terem acreditado em mim e me ensinado a perseguir meus objetivos com afinco, respeitando e ajudando o próximo.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e souberam me acolher.

Aos amigos especiais, que me encontraram no fundo do poço e tiveram a coragem de me estender a mão e me convidar para caminhar junto com eles, confiando em mim, me acolhendo e suportando nos meus momentos de total angústia.

À professora Vera Hossepian de Lima, que mais que uma orientadora no sentido acadêmico, foi uma orientadora em minha vida, me dando força nos momentos em que pensei em desistir. Esta pessoa muito especial em minha vida acreditou no meu potencial e se dedicou ao máximo para a conclusão deste trabalho. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À Bia, sem a qual este trabalho nunca seria apresentado, a Vânia, por ter me ajudado no laboratório e ter me dado muita força, apesar de nos conhecermos por tão pouco tempo.

Aos técnicos do laboratório de Reprodução animal, por terem me ajudado em todas minhas dúvidas.

Ao professor João Ademir, pela preciosa ajuda nos resultados estatísticos.

Aos professores e técnicos dos departamentos de biologia e tecnologia, por terem aberto as portas para a realização deste trabalho.

Às pessoas que não acreditaram em mim, que apostaram que eu não conseguiria, que me abandonaram no meio do caminho, porque foi esta a minha força para enfrentar tantos problemas.

À CNpq pelas bolsas concedidas.

## SUMÁRIO

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE TABELAS.....                                                  | X   |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                  | IX  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                             | XII |
| RESUMO.....                                                            | 1   |
| ABSTRACT.....                                                          | 2   |
| <br>                                                                   |     |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                     | 3   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                          | 5   |
| 2.1. Nutrição de cachacos.....                                         | 5   |
| 2.1.1. Selênio e vitamina E.....                                       | 6   |
| 2.1.2. Cálcio e fósforo.....                                           | 8   |
| 2.1.3. Zinco e magnésio.....                                           | 9   |
| 2.2. Danos sofridos pelos espermatozoides após coleta.....             | 10  |
| 2.3. Análise convencional da qualidade dos ejaculados.....             | 12  |
| 2.4. Espermatogênese.....                                              | 13  |
| 2.5. O RNA dos espermatozoides.....                                    | 14  |
| 2.5.1. <i>Bcl-2</i> .....                                              | 16  |
| 2.5.2. Gene ativador da proteína de proteção ao choque térmico 90..... | 18  |
| 2.5.3. Gene da enzima peroxiredoxina 5.....                            | 19  |
| 2.5.4. Gene inibidor da acrosina .....                                 | 20  |
| 2.5.5. Protamina 1.....                                                | 21  |
| 2.5.6. C-kit.....                                                      | 22  |
| 2.5.7. E-caderina.....                                                 | 22  |
| 2.5.8. <i>CD45</i> .....                                               | 23  |
| 3. OBJETIVOS.....                                                      | 24  |
| 4. HIPÓTESE.....                                                       | 25  |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                           | 26 |
| 5.1. Nutrição dos machos.....                                                                                        | 27 |
| 5.2. Avaliação da qualidade espermática.....                                                                         | 27 |
| 5.3. Análise estatística dos dados.....                                                                              | 28 |
| 5.4. Eliminação de células somáticas dos ejaculados.....                                                             | 28 |
| 5.5. Extração do RNA dos espermatozoides .....                                                                       | 29 |
| 5.6. Síntese do cDNA.....                                                                                            | 30 |
| 5.7. Extração do RNA de sangue e síntese de cDNA.....                                                                | 30 |
| 5.8. Avaliação da pureza das amostras.....                                                                           | 31 |
| 5.9. Reação de amplificação.....                                                                                     | 32 |
| 5.10. Genes alvo escolhidos para acessar a qualidade do<br>espermatozoides.....                                      | 32 |
| 5.11. Análise dos dados do qPCR.....                                                                                 | 34 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                       | 35 |
| 6.1. Perfil de concentração de espermatozoides nos ejaculados dos machos<br>durante o período experimental.....      | 35 |
| 6.2. Concentração espermática e volume do ejaculado.....                                                             | 36 |
| 6.3. Resistência ao resfriamento dos espermatozoides diluídos.....                                                   | 38 |
| 6.4. Concentração e volume nas amostras de após o processo de eliminação<br>de células somáticas dos ejaculados..... | 42 |
| 6.5. Controle da contaminação das amostras por células somáticas.....                                                | 43 |
| 6.6. Controle de contaminação por DNA genômico.....                                                                  | 44 |
| 6.7. Genes analisados no RT-PCR.....                                                                                 | 46 |
| 6.8. Diferença na expressão dos transcritos.....                                                                     | 47 |
| 6.8.1. E-caderina.....                                                                                               | 51 |
| 6.8.2. C-kit.....                                                                                                    | 54 |
| 6.8.3. Gene inibidor da acrosina.....                                                                                | 57 |
| 6.8.4. Gene ativador da HSP90.....                                                                                   | 60 |
| 6.8.5. Gene peroxiredoxina 5.....                                                                                    | 63 |
| 6.8.6. Bcl-2l.....                                                                                                   | 66 |
| 6.8.7. CD45.....                                                                                                     | 68 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 7. CONCLUSÕES.....           | 69 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 70 |
| 9. BIBLIOGRAFIA.....         | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Níveis nutricionais da dieta dos cachacos do experimento                                                                                                                                                                                                                                                      | 27 |
| <b>Tabela 2:</b> Iniciadores utilizados para verificação da pureza das amostras de cDNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides suínos do experimento, tamanho do segmento e número de acesso no Genbank                                                                                                        | 31 |
| <b>Tabela 3:</b> Iniciadores a serem utilizados na verificação de diferenças entre as amostras de cDNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides suínos do experimento, tamanho do segmento e número de acesso no Genbank                                                                                         | 33 |
| <b>Tabela 4:</b> Comparação das médias de concentração e volume no sêmen <i>in natura</i> dos cachacos antes e depois da suplementação com vitaminas e minerais e dos três que permaneceram como controle após a aplicação das vitaminas e minerais                                                                            | 36 |
| <b>Tabela 5:</b> Resistência média dos espermatozoides de cachacos <i>in natura</i> diluídos em BTS, durante sete dias (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6), ao tempo de coleta antes e depois da suplementação de vitaminas                                                                                                           | 39 |
| <b>Tabela 6:</b> Comparação dos dados de concentração e volume do sedimento nas amostras dos cachacos antes e depois da suplementação com vitaminas e minerais e dos três que permaneceram como testemunha após a aplicação das vitaminas e minerais, após o processo de eliminação de células somáticas dos ejaculados        | 43 |
| <b>Tabela 7:</b> Amostras de RNA, extraídos de espermatozoides de suínos, contaminadas por DNA genômicos e seu respectivo Cq, com a diferença de expressão                                                                                                                                                                     | 45 |
| <b>Tabela 8:</b> Diferenças na expressão dos transcritos dos genes estudados, nos machos tratados e não tratados, antes e após os sessenta dias de adaptação as vitaminas e minerais, com relação a análise comparativa de expressão com as amostras calibradoras (antes do tratamento), com suas médias e desvios padrão (DP) | 48 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Acompanhamento da concentração espermática dos cachacos durante o período experimental. Os cachacos 1,2 e 3 permaneceram como controle                                                                       | 35 |
| <b>Figura 2:</b> Resultados de motilidade de cada macho nos sete dias de coleta, frente ao resfriamento entre 15 e 18°C, após diluição com diluente de sêmen BTS                                                              | 39 |
| <b>Figura 3:</b> Resistência dos espermatozoides de suínos diluídos em BTS e mantidas a temperatura da 15 a 18° C, medida pela motilidade das amostras em sete dias consecutivos                                              | 41 |
| <b>Figura 4:</b> Gel de agarose 1% contendo as amostras de RNAs extraídos dos espermatozoides e sangue, sendo 1: marcador molecular de 1kb; 2-19: RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos dos grupos tratado e controle | 44 |
| <b>Figura 5:</b> Curvas de amplificação das duplicatas do gene protamina 1 e das amostras de branco para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides                                  | 46 |
| <b>Figura 6:</b> Valores de diferenças de expressão entre os genes alvo e o gene nas amostras calibradoras                                                                                                                    | 49 |
| <b>Figura 7:</b> Valores de diferenças de expressão entre os genes alvo e o gene nas amostras calibradoras                                                                                                                    | 50 |
| <b>Figura 8:</b> Curvas de amplificação das duplicatas do gene <i>e-caderina</i> para todas as amostras de RNA extraídos de espermatozoides de cachacos                                                                       | 54 |
| <b>Figura 9:</b> Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachacos, para o gene <i>e-caderina</i>                                               | 55 |
| <b>Figura 10:</b> Curvas de amplificação das duplicatas do gene <i>c-kit</i> para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos                                             | 56 |
| <b>Figura 11:</b> Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachacos, para o gene <i>c-kit</i>                                                   | 57 |
| <b>Figura 12:</b> Curvas de amplificação das duplicatas do gene <i>inibidor da acrosina</i> para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos                              | 59 |

- Figura 13:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachacos, para o *gene inibidor da acrosina* 60
- Figura 14:** Curvas de amplificação das duplicatas do *gene ativador da HSP90* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos 62
- Figura 15:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachacos, para o *gene ativador da HSP90* 63
- Figura 16:** Curvas de amplificação das duplicatas do *gene PRDX5* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos 65
- Figura 17:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachacos, para o *gene PRDX5* 66
- Figura 18:** Curvas de amplificação das duplicatas do *gene Bcl-2l* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos 67
- Figura 19:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachacos, para o *gene Bcl-2l* 68

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**μL** - microlitro

**mM** - milimolar

**μM**- micromolar

**cDNA** – DNA complementar

**PCR** – reação da polimerase em cadeia

**qPCR** – PCR quantitativa em tempo real

**ng** – nanogramas

**pg** – picogramas

**RNA** – ácido ribonucléico

**mRNA** – RNA messageiro

**ROS** – espécies reativas de oxigênio

**mL** – mililitro

**IA** – inseminação artificial

**PRDX5** – gene peroxiredoxin 5

**Bcl-2l** – gene da família Bcl de genes anti-apoptóticos

**HSP90** – proteína de choque térmico 90

**Prm** – protamina

**CD45** – marcador de membrana de leucócitos

**DNA** – ácido desoxirribonucléico

**Cq ou Ct** – ciclo de quantificação

**Tm** – temperatura de melting

**C-kit** - gene receptor da tirosina quinase

**E-caderina** – molécula de adesão

**BTS** – diluente para sêmen suíno

**ATP** – adenosina tri-fosfato

**UI** - unidade internacional

**M-MLV** – Moloney Murine Leukemia Virus (enzima de transcriptase reversa)

## QUANTIFICAÇÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS EM ESPERMATOZOIDES DE SUÍNOS SUPLEMENTADOS COM VITAMINAS E MINERAIS

**RESUMO** - A suplementação de vitaminas e minerais pode melhorar a fertilidade do sêmen de suínos. No entanto, os resultados têm se mostrado contraditórios, pois as avaliações do sêmen normalmente são subjetivas. A avaliação mais precisa poderia ser obtida pela análise de transcritos relacionados a fertilidade dos espermatozoides. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a qualidade de sêmen e analisar a expressão de alguns transcritos pelo método de qPCR. Para tal, coletas de sêmen de nove machos foram avaliadas segundo a motilidade, concentração e resistência ao resfriamento e submetidas à extração do RNA. Após 60 dias, seis machos sofreram a aplicação de suplementos minerais-vitamínicos comerciais (Selenphós® e Zimag®). Outros três machos não receberam a suplementação e foram utilizados como controle. Os 60 dias foram considerados para respeitar o ciclo espermatogênico. Após este período, outras coletas de sêmen de cada macho foram realizadas e submetidas aos mesmos procedimentos. Os genes alvo escolhidos para acessar a qualidade dos espermatozoides foram: *Bcl-2l* que é um gene anti apoptótico; *gene ativador da proteína de proteção ao choque térmico* (HSP 90); *gene da enzima peroxiredoxina 5*, protetora contra danos oxidativos e *gene inibidor da acrosina*, relacionado a capacitação espermática. Os resultados mostraram aumento do número de dias em que as amostras de sêmen diluídas com diluente comercial, resfriadas a 15-18°C, permaneciam com motilidade acima de 70% após a suplementação com vitaminas e minerais. A concentração dos espermatozoides e volume dos ejaculados, após a suplementação, também melhorou, atingindo taxas de 52 e 57%, respectivamente. Porém, os transcritos para os genes estudados não apresentaram diferença de expressão antes e depois do tratamento com as vitaminas e minerais.

**PALAVRAS CHAVE:** concentração, espermatozoides, motilidade, qPCR, RNA, *Sus scrofa*.

## DIFFERENCIAL QUANTIFICATION OF SWINE SPERMATOZOA TRANSCRIPTS AFTER A VITAMIN AND MINERAL SUPPLEMENTATION

**ABSTRACT** - Vitamin and mineral supplementation could improve the swine semen fertility. However, the results, until now, are controversial because of the subjectivity of the analyses. A precise evaluation could be achieved by the analyses of the spermatozoa transcripts important for the boar fertility. The present work proposes to evaluate the effect of intramuscular vitamin and mineral supplementation on semen quality by analyzing some spermatozoa transcripts, using qPCR methodology. The semen collection of nine boars were evaluated for motility, concentration and resistance to cold, and then, submitted to RNA extraction. After this period, six of these boars received an intramuscular supplement of vitamins and minerals (Zimag® and Selenphos®). Another three animals did not receive the supplementation for control. After 60 days, other semen collections were done and submitted to the same processes of analyses and RNA extraction. The target genes to access spermatozoa quality was:: Bcl-2l, an ant apoptotic gene; gene that active the heat shock protein (HSP 90), a protein related to the capacity of the spermatozoa to react to heat stress; the gene for the ant oxidant enzyme PRDX5; the gene of acrosin inhibition, related to sperm capacitation. There was a improvement on the number of days that the semen samples, diluted on BTS and stored at the 15-18° C temperature, showed an acceptable motility above 70% after the treatment with vitamins an minerals. The concentration of the spermatozoids and volume of the ejaculation increased about 52 and 57 %, respectively, but there was no difference on transcripts expression for the studied genes after the vitamin and mineral treatment.

KEY WORDS: concentration; motility; qPCR, RNA, spermatozoa, *Sus scrofa*.

## 1. INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais produzida no mundo, sendo a China a maior produtora (50 milhões toneladas/ano), seguida pela União Européia (22 milhões toneladas/ano), EUA (10 milhões toneladas/ano), e Brasil (3 milhões toneladas/ano). O consumo per capita anual mundial de carne suína encontra-se por volta de 14,96 kg, seguida da carne de frango, com consumo per capita de 11,5 kg, e a carne de bovinos, 9,7 kg. Hong-kong é o maior consumidor, respondendo por 68,60 kg/habitante/ano. Enquanto isso, o consumo per capita de carne suína no Brasil encontra-se por volta de 14,7kg/habitante, enquanto a carne bovina e de frango têm consumo aproximado de 35 e 38 kg/habitante/ano, respectivamente (ABCS, 2010).

O rebanho suíno brasileiro possui aproximadamente 38 milhões de animais e 2,5 milhões de matrizes, concentrados principalmente na região Sul, com 43% do plantel nacional. No que diz respeito à exportação, o Brasil chegou à média de 625 mil toneladas de carne e, sendo a Rússia responsável pela compra de 64,75% do total exportado, seguida por Hong-Kong com 9,74%, Ucrânia com 3,54% e Cingapura, com 2,89%, entre outros. Há perspectivas de aumento das exportações, principalmente para mercados como Japão, Coreia do Sul, México, EUA e União Européia (ABCS, 2010).

Nos últimos 50 anos, pesquisas em genética, biotecnologia e nutrição tiveram impacto no aumento de produtividade. A inseminação artificial respondeu por progressos na suinocultura e com ela, surgiu a necessidade de melhorar as características quantitativas e qualitativas dos ejaculados, bem como aprofundar estudos sobre a nutrição dos machos para atender a necessidade de alta produção de sêmen.

Várias técnicas tem sido descritas para melhorar a qualidade do sêmen. A adição de vitaminas e minerais no momento da manipulação do sêmen ou mesmo na dieta dos machos nem sempre tem se mostrado vantajosa. No entanto, as análises apresentadas, até então, limitam-se a parâmetros subjetivos, sendo que estas análises conseguem detectar apenas 50% das alterações físicas e morfológicas dos espermatozoides (MOLDENHAUER et al., 2003). As alterações nas características seminais poderiam ser melhor detectadas pela análise do conjunto de RNAs dos

espermatozoides. Este tipo de análise dos transcritos gênicos tem sido estabelecido como um indicativo da fertilidade em humanos e alguns trabalhos tem sido realizados em animais.

Para melhorar a qualidade dos espermatozoides pode-se estudar os efeitos da suplementação vitamínico mineral injetável em cachacos e analisar o efeito das mesmas nos transcritos gênicos, já que a análise convencional do sêmen é subjetiva.

Com base nestas afirmações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros qualitativo do sêmen, tais como concentração espermática, volume do ejaculado, resistência ao tempo de armazenagem à temperatura de 15 a 18°C após a coleta e diluição dos ejaculados, medido pela motilidade dos espermatozoides, e comparar a expressão dos genes *Bcl-2l*, *gene ativador da proteína de choque térmico 90*, *gene ativador da enzima antioxidante PRDX5*, *gene inibidor da liberação da acrosina*. Estes genes podem estar relacionados a fertilidade dos espermatozoides.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Nutrição de cachaços**

Quando comparado com outras fases de produção de suínos, pesquisas focando a nutrição de cachaços são escassas (AUDET et al., 2004, MULLAN et al., 2006). Uma razão para isto é que estes machos representam uma pequena parte da população comercial. Outra razão é que o acasalamento por monta natural era predominante nos sistemas de criação, e um ejaculado suíno produz espermatozoides mais que suficientes para garantir a gestação de uma fêmea. Com a difusão da técnica de inseminação artificial, são necessárias estratégias de manejo e nutrição para aumentar a fertilidade dos machos e qualidade do sêmen (ESTIENE et al., 2005)

Deve-se considerar também que existem muitos fatores que podem interferir na biodisponibilidade de micro elementos fornecidos via dieta para suínos, entre eles: as micotoxinas; interação entre nutrientes; estresse térmico; armazenamento inadequado de ingredientes que compõem a dieta; doenças; entre outros (CLOSE, 2003).

Devido a estes fatores, a suplementação extra de vitaminas e minerais pode apresentar resultados na qualidade e quantidade do sêmen, como demonstrado em muitas espécies animais (MARIN-GUZMAN et al., 1997; FRANCHINI et al., 2001; YOSEF et al., 2003), seja pela inativação de danos oxidativos ou interação com processo biológicos e enzimáticos.

Na nutrição de suínos seis minerais são conhecidos como macro-minerais (cálcio, sódio, fósforo magnésio, cloro e potássio) e estão envolvidos com componentes estruturais e fluídos corporais. Outros oito são os micro-minerais (cobalto, cobre, iodo, ferro, manganês, selênio, enxofre e zinco) e são ativadores de enzimas, coenzimas e hormônios (KOPINSKI, 2005).

A suplementação de minerais normalmente está associada à suplementação vitamínica (MARIN-GUZMAN et al., 1997; 2000). As vitaminas normalmente desempenham papel como antioxidante celular. Células vivas requerem oxigênio para sustentar sua atividade metabólica, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), que são moléculas de oxigênio com elétrons não pareados (FUNDERBURKE & SHIPP,

2007), que podem causar danos celulares (THUWANUT et al., 2008). As células espermáticas são altamente sensíveis aos ROS devido a sua estrutura particular de membrana lipídica.

Os organismos desenvolvem diversos mecanismos para proteger-se dos danos causados pelos ROS. Pequenas moléculas como a vitamina E são capazes de reagir com estes radicais (BURTON & INGOLD, 1986). Os mecanismos para neutralizar os efeitos da oxidação incluem a vitamina E e enzimas antioxidantes, dependentes de minerais (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007).

### **2.1.1. Selênio e vitamina E**

O selênio é essencial para o desenvolvimento normal dos espermatozoides, já que é incorporado a membrana mitocondrial. Também é componente da enzima glutathione peroxidase, que atua como antioxidante celular (KOPINSKI, 2005). Em geral, pesquisas têm demonstrado que a administração de suplementos de selênio em suínos aumenta os níveis da glutathione peroxidase e as concentrações de selênio nos espermatozoides e no plasma seminal (SEGERSON et al., 1981; MARIN-GUZMÁN et al., 1997). No entanto, KOLODZIEJ & JACYNO (2004) observaram que a adição do selênio diminui a glutathione peroxidase no plasma seminal. CALVIN (1979) notou que a maior parte do selênio injetado em ratos se localizava na peça intermediária do espermatozoide, sugerindo que o mineral deve estar envolvido na manutenção da integridade estrutural e função locomotora do gameta masculino.

Muitos experimentos foram conduzidos para investigar os efeitos da suplementação por selênio nas características reprodutivas em cachorros (GUZMÁN-MARÍN et al., 1997, 2000; JACYNO et al., 2002; KOLODZIEJ & JACYNO, 2004) e existem fortes evidências que sustentam a inclusão deste mineral nas dietas dos machos. LIU et al. (1982) sugeriram que a deficiência de selênio prolongada em cachorros poderia resultar em diminuição da concentração e motilidade espermática, além de aumentar a incidência de gotas citoplasmáticas.

Fontes orgânicas de selênio são mais eficientemente aproveitadas que inorgânicas para suínos (MAHAN & PARRETT, 1996). ESTIENE et al. (2005), usando

uma fonte de selênio orgânico na dieta de cachacos encontraram melhora na motilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides quando comparado com a fonte inorgânica de selênio. No entanto, JACYNO et al. (2002), avaliando fontes orgânicas e inorgânicas de selênio aliadas a vitamina E em cachacos, não encontraram efeito dos tratamentos sobre a motilidade ou volume do ejaculado, porém, a concentração espermática e porcentagem de espermatozoides com acrossomos normais foi maior para a fonte orgânica, que também diminuiu a porcentagem de espermatozoides com anormalidades morfológicas. Na realidade, os minerais orgânicos, em geral, são menos reativos e apresentam maior biodisponibilidade (MULAN et al., 2006).

A associação de selênio e vitamina E é comum em muitos trabalhos. BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al. (1995), sugerem que a vitamina E pode atuar como um antioxidante no sêmen de suínos. MARIN-GUZMAN et al. (1997), usaram dietas com concentrações de Se inorgânico de 0 a 0,5 ppm e vitamina E de 0 a 220 UI/kg de dieta em cachacos para avaliar, entre outros parâmetros, a qualidade do sêmen e a taxa de fertilização. Os autores concluíram que dietas com baixos níveis de Se e vitamina E provocam redução da motilidade espermática e a porcentagem de espermatozoides anormais aumenta. Não encontraram efeito da suplementação no volume ou concentração espermática. Para os machos suplementados com selênio, foi encontrado aumento da concentração de selênio no sêmen e da atividade da enzima glutathione peroxidase e a diminuição de incidência de gotas citoplasmáticas, bem como espermatozoides sem cauda ou com anormalidades na cauda. Em relação a taxa de fertilização, o número de oócitos fertilizados pelo grupo de cachacos que receberam a dieta sem selênio foi menor.

Em outro experimento, MARIN-GUZMAN et al. (2000), usando as mesmas dietas de 1997, avaliaram a morfologia estrutural e a concentração de ATP dos espermatozoides suínos. Também testaram a adição de selenito de sódio diretamente ao diluidor do sêmen. Os animais alimentados com a dieta pobre em selênio apresentaram: anormalidades estruturais nas mitocôndrias, sendo estas mais ovais; morfologia anormal da cauda e diminuição da concentração de ATP no espermatozoide. Estes efeitos em conjunto podem reduzir a motilidade espermática e

diminuir as taxas de fertilização. A adição do selenito de sódio no diluente de conservação foi prejudicial, diminuindo a motilidade espermática.

Foi demonstrado que amostras de sêmen com alta viabilidade após o processo de congelação e descongelação eram caracterizadas por alta atividade de superóxido dismutase (SOD) e alta proporção de atividade da enzima glutathione peroxidase (CEROLINE et al., 2001).

Acredita-se que a vitamina E tenha papel fundamental no processo de espermatogênese (MASON, 1954; MARIN-GUZMAN et al., 1997). Deficiência de vitamina E pode causar degeneração testicular em ratos, cachorros, gatos, suínos e macacos, e pode provocar baixo número de células germinativas e conseqüente redução na produção espermática (MASON, 1940; MASON & MANER, 1957; COOPER et al, 1987). A vitamina E parece não ter efeito sobre as anomalias estruturais nos espermatozoides, mas provavelmente serve como antioxidante nas células espermáticas (MARÍN-GUZMÁN et al., 2000; BRZEZINSKA-STEBODZINSKA et al., 1995). CEROLINI et al. (2000) demonstraram que a vitamina E é capaz de prevenir danos oxidativos nas membranas espermáticas do sêmen líquido de suínos. PEÑA et al. (2004), usando vitamina E (100 µM e 200 µM – Trolox) no diluente de sêmen suíno, encontraram aumento da motilidade espermática após descongelação na maior concentração da vitamina.

### **2.1.2. Cálcio e fósforo**

O fósforo e o cálcio desempenham um papel muito importante no desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético, realizando também outras funções fisiológicas. CROMWELL et al. (1998) indicaram que a nutrição adequada de cálcio e fósforo para todas as classes de suínos é dependente da proporção destes minerais disponível na dieta e da presença de vitamina D, já que a absorção dos dois minerais é dependente desta vitamina (HANCOCK et al., 1986; JONGBLOED, 1990). Na reprodução, se administrados na fase de crescimento do animal, contribuem para a longevidade reprodutiva (KOPINSKI, 2005).

A função primária do fósforo inclui a mineralização dos tecidos conjuntivos, função e estrutura dos ácidos nucleicos, transporte de energia pelo diéster fosfatos, componentes estruturais dos fosfolipídeos e balanço osmótico (LEWIS & LE SOUTHERN, 2000).

O cálcio é um dos mais importantes elementos constitucionais do organismo e da fisiologia celular, sendo que suas funções podem ser divididas em extra e intracelular, dependendo do seu sítio de ação (GILMAN et al., 1991). O cálcio intracelular no espermatozoide tem um papel fundamental no processo de capacitação, reação acrossomal, hiperatividade (movimento flagelar típico no sítio de fecundação), motilidade flagelar e a fusão da vesícula acrossomal (TONIOLLI & COMBARNOUS, 1999; SUAREZ & HO, 2003). A membrana plasmática apresenta canais de cálcio voltagem-dependente que iniciam e mantêm o aumento intracelular deste íon na hiperativação (BOOTMAN et al, 2001). LIMA et al. (2007), avaliando a adição de diferentes dosagens de cloreto cálcio no sêmen suíno concluíram que as amostras que receberam maiores níveis (5,0 e 7,0 mM) apresentaram motilidade espermática melhor e não encontraram diferenças quanto ao vigor espermático.

### **2.1.3. Zinco e magnésio**

O zinco e o magnésio são minerais componente das DNA e RNA sintetases e transferases, enzimas digestivas e insulina. Também tem função na produção espermática de cachaaos (KOPINSKI, 2005). LIAO et al., (1985), suplementando cachaaos com diferentes níveis de zinco (32,89,146 e 197 ppm) encontraram maior produção de espermatozoides nos animais que receberam os níveis mais altos, porém não encontraram efeito do tratamento sobre o total de espermatozoides com anormalidades morfológicas.

LIPTRAP et al., (1970), reportaram que cachaaos tem maior exigência de Zn que fêmeas e machos jovens. No entanto, a quantificação do requerimento de Zn para machos na está bem estabelecida, especialmente durante épocas intensas de colheita de sêmen. Atrofia dos túbulos seminíferos e do epitélio germinal testicular acompanhada de retardo no desenvolvimento de testículos, epidídimo, próstata de

glândula pituitária foram observadas em machos de diferentes espécies (MASON & MANER, 1957). WEGGER & PALLUDAN (1977) encontraram degeneração do testículo, aumento do tecido conectivo das células de Leydig em cachorros alimentados com uma dieta pobre em Zn por 10 semanas.

O magnésio é co-fator de muitos sistemas enzimáticos e também faz parte da constituição dos ossos (KOPINSKI, 2005). O magnésio é importante na transmissão de impulsos nervosos. Ele estabiliza a estrutura do ATP e tem papel fundamental em mais de 300 sistemas enzimáticos incluindo a iniciação de  $\beta$ -oxidação das gorduras, ativação de aminoácidos na síntese protéica, síntese e degradação de DNA e formação de cAMP. O requerimento de Mg por suínos em reprodução não está bem definido (LEWIS & LE SOUTHERN, 2000).

## **2.2. Danos sofridos pelos espermatozoides após coleta**

Células vivas, estocadas em condições aeróbicas, requerem oxigênio para sustentar sua atividade metabólica. O resíduo desta atividade metabólica são as espécies reativas de oxigênio (ROS). O excesso de ROS pode causar danos oxidativos celulares (THUWANUT et al., 2008). ROS são radicais com moléculas de oxigênios com um ou mais elétrons não pareados (BURTON & INGOLD, 1986), que tendem a se ligar a outras moléculas, alterando-as (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007). Os radicais danosos são: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxidos ( $H_2O_2$ ) e os radicais hidroxila livres (OH). Os peróxidos são os que apresentam maior potencial de danos (VISHWANATH & SHANNON, 1997; BILODEUA et al., 2002).

As células espermáticas são altamente sensíveis aos ROS devido a sua estrutura particular. O espermatozoide tem uma única membrana lipídica cobrindo sua cabeça, e esta membrana está envolvida com a fixação na zona pelúcida do óvulo, bem como nas mudanças importantes que ocorrem durante o processo de capacitação espermática. A peça intermediária do espermatozoide gera a energia necessária para a movimentação do espermatozoide pelas mitocôndrias aí presentes. Estas mitocôndrias são as principais fontes geradoras de ROS (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007). Os danos de ROS na membrana espermática ou DNA são causados por acúmulo de

peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o produto final do radical superóxido, em espermatozoides humanos (AITKEN et al., 1989; AITKEN et al., 1998; AITKEN & BAKER, 2006) e bovinos (CHATTERJEE & GAGNON, 2001). Estes danos têm sido propostos como a maior causa da queda de função dos espermatozoides (ERASMUS et al., 1992). A presença de excesso de ROS no sêmen são altamente associada com baixas concentrações e motilidade e piora na morfologia do espermatozoide em humanos (AGARWAL et al., 2004, AITKEN & BAKER, 2006).

O sêmen de suínos parece ser particularmente sensível aos danos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio devido ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e fosfolípidos de membrana (STUBBS & SMITH, 1984). A peroxidação dos lípidos dos ácidos graxos pode ser um dos mecanismos responsáveis para as mudanças bioquímicas e fisiológicas negativas durante a estocagem deste sêmen (CEROLINI, et al., 2000) associadas à baixa capacidade antioxidante do plasma seminal suíno (BRZEZINSKA-SLEVBODZINKA et al., 1995). O processo de criopreservação aumenta a peroxidação de lipídios em muitas espécies animais (SLAWETA et al., 1988, JEONG et al., 2009).

Os organismos desenvolvem diversos mecanismos de defesa para proteger-se dos danos causados por estas espécies de oxigênio reativas. Pequenas moléculas como a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) são capazes de reagir com estes radicais diretamente (BURTON & INGOLD, 1986). A vitamina E atua na reação de peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (DIEBER-ROTHENEDER et al., 1991). No plasma seminal e espermatozoides os mecanismos para neutralizar os efeitos da oxidação incluem a vitamina E e certas enzimas, dentre elas, a glutathione peroxidase tanto dentro como no plasma seminal, que é dependente de selênio, a superóxido dismutase, dependente de cobre (FUNDERBURKE & SHIPP, 2007) e as da família das peroxiredoxinas, em especial a peroxiredoxina 5, também dependente de selênio (MIRANDA-VIZUETE et al., 2004; RHEE et al., 2005).

### 2.3. Análise convencional da qualidade dos ejaculados

Os métodos tradicionais de avaliação do sêmen geralmente incluem porcentagem de espermatozoides vivos, morfologia e principalmente motilidade e vigor, que são parâmetros altamente subjetivos (MOLDENHAUER et al., 2003; BISSONETTE et al., 2009). As alterações nas características seminais poderiam ser melhor detectadas pela análise do conjunto de RNAs dos espermatozoides. Em geral, o perfil de mRNA apresentado pelos espermatozoides são resquícios do processo de espermatogênese (RAUBER 2008). Este tipo de análise dos transcritos gênicos tem sido estabelecido como um indicativo da fertilidade em humanos (CARREAU et al., 2007; MILLER et al., 2005) e alguns trabalhos tem sido realizados em animais (GILBERT et al., 2007; YANG et al., 2009). JEONG et al. (2009), estão entre os primeiros autores a aliar a análise de transcritos gênicos com alteração na qualidade de sêmen devido a um tratamento específico. Os autores avaliaram o efeito da adição de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) no diluente de sêmen suíno sobre a expressão da proteína do estresse (HSP 70) e dos genes pró apoptóticos (*Bax* e *Bak*) e anti apoptóticos (*Bcl-2l* e *Bcl-xl*) no espermatozoide. Existem poucos trabalhos na área de produção animal relacionando fatores externos ao genoma e a mudança na expressão gênica, principalmente, em relação a nutrição, campo conhecido como genômica nutricional.

A genômica nutricional, ou nutrigenômica, tem como objetivo elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre nutrientes e genótipo e a maneira como estas afetam o fenótipo. (KAPUT & RODRIGUEZ, 2004) A nutrigenômica é a parte da genômica nutricional voltada ao entendimento dos efeitos dos nutrientes sobre a expressão gênica. Estas alterações, conhecidas como epigenéticas, não estão relacionadas com mudanças na sequência primária do DNA, mas, com os mecanismos que controlam a expressão gênica. Estes estudos serão de grande valia para o aperfeiçoamento das normas de nutrição animal (FURLAN et al., 2007).

Para melhorar a qualidade dos espermatozoides pode-se estudar os efeitos da suplementação vitamínico mineral de cachaços e analisar o efeito das mesmas nos transcritos gênicos (MILLER et al., 1999; WANG et al., 2004; LAMBARD et al., 2004;

JEONG et al., 2009; YANG et al., 2009), já que a análise convencional do sêmen é subjetiva e permite detectar apenas 50% das alterações físicas e morfológicas dos espermatozoides (MOLDENHAUER et al., 2003).

#### **2.4. Espermatogênese**

O espermatozoide é o produto final do processo de espermatogênese, que se inicia nos túbulos seminíferos com as espermatogônias indiferenciadas e termina com a produção de espermatozoides. Durante este processo ocorrem sucessivas mitoses, meioses e fases pós-meióticas nos túbulos seminíferos do testículo. Durante a fase mitótica ou spermatogonial, uma progênie de células germinativas sofre uma série de divisões mitóticas para expandir a população de espermatogônias. Nesta fase se encontram todos os tipos de espermatogônias A até B. A fase meiótica ou spermatocitária, é dividida em duas, que ocorrem sem duplicação de DNA com o objetivo de produzir células haplóides. Nestas fases anteriores é que se encontram os spermatócitos primários e secundários. Estas duas fases são essenciais para produzir os espermatozoides na fase pós-meiótica final. Esta fase final, também conhecida como spermiogênese, é a fase de diferenciação, na qual as células são denominadas spermatídes, que se caracteriza pela formação do acrossomo, condensação nuclear, perda da maior parte do citoplasma, desenvolvimento do flagelo e rearranjo das mitocôndrias. Como resultado tem-se uma célula altamente diferenciada e especializada em estrutura e função, capaz de se combinar com o óvulo para dar origem às próximas gerações (HECHT, 1998; SENGGER, 2002; KLEENE, 2003; NEILL, 2006; BOERKE et al., 2007; GALERAUD-DENIS et al., 2007). A duração deste processo em suínos é de aproximadamente 41 dias (FRANÇA et al., 2005).

Os componentes principais do espermatozoide são a cabeça, a cauda e a peça intermediária. A cabeça contém o núcleo, a estrutura do citoesqueleto e uma pequena porção de citoplasma. Anteriormente à cabeça existe uma membrana com uma vesícula citoplasmática que contém enzimas hidrolíticas, denominada acrossomo (NEILL, 2006).

Durante a espermiogênese, ou diferenciação das espermatídes em espermatozoides, as células são submetidas a mudanças na estrutura da cromatina, levando a um grande nível de compactação do DNA. Este fato é acompanhado pela substituição da maior parte das histonas por protaminas além de uma grande perda de citoplasma (WYKES et al., 1997). Existe uma grande atividade transcricional nos espermátócitos, da fase A até B, antes da primeira divisão meiótica, porém esta atividade diminui gradualmente quando aparecem as espermatídes esféricas até a fase de espermatócitos secundários (DADOUNE et al., 2004. RAUBER, 2008). Esta atividade transcricional termina quando as células passam pela fase de alongamento, quando ocorre a substituição total das histonas por protaminas (DADOUNE et al., 2004; GRUNEWALD et al., 2005). Não havendo atividade transcricional durante a diferenciação (RAUBER, 2008).

A presença de mRNA em espermatozoides já se encontra bem estabelecida, porém muito pouco se sabe ainda sobre sua função (DADOUNE et al., 2005). Devido a inabilidade do espermatozoide em sintetizar RNA, assume-se que o RNA encontrado nestas células são conservados deste o processo de espermatogênese, sendo, por conseqüência, resquícios da mesma, representando os eventos passados (LAMBARD et al., 2004).

## **2.5. O RNA dos espermatozoides**

Recentemente, foi demonstrada a existência de moléculas de RNA nas células espermáticas maduras. Inicialmente, se acreditou que este RNA era um resquício não funcional da expressão de genes da fase de espermatídes da espermatogênese (PESSOT et al., 1989; DADOUNE, et al., 2004; MILLER & OSTERMEIER, 2006), porém foi demonstrado que essas moléculas podem ser transmitidas ao óvulo durante a fecundação permanecendo estáveis até o início da expressão do genoma embrionário (ALBERTSON, 1974; EDDY, 2002; CUMMINS, 2001; MILLER, et al., 2005; BOERKE et al., 2007; AVENDAÑO et al., 2009). MILLER et al., (2005) revisou sobre o papel do RNA espermático concluíram que, mesmo que seja apenas um resíduo da

espermatozoides, este RNA pode ser uma “marca molecular” do fenótipo infértil em humanos.

Em relação à fertilidade dos espermatozoides, existem duas características principais que devem ser levadas em conta: primeiro, a competência destes em alcançar o local de fecundação do óvulo e penetrar a zona pelúcida, uma vez que existem várias barreiras no trato reprodutivo da fêmea para prevenir que espermatozoides com alguma anormalidade completem sua jornada até o oócito. Segundo, a habilidade do espermatozoide de iniciar e sustentar o desenvolvimento do zigoto, embrião ou feto. Uma vez que o espermatozoide penetra a oolema, ele deve emitir um sinal suficiente para ativar o oócito (OSTERMEIER et al., 2005).

Já foi encontrada uma imensa variedade de transcritos nos espermatozoides de ratos e humanos, entre eles: c-myc, localizado na peça intermediária e cauda (KUMAR et al., 1993); protamina 1 (Prm1), protamina 2 (Prm2), proteínas de choque térmico 70 e 90 (HSP), B-integrinas, isoformas de fosfodiesterase, receptores de progesterona, aromatases e receptores de estrógenos (EDDY, 2002; MILLER et al., 2005; MILLER et al., 1994; WYKES et al., 1997; DADOUNE et al., 2005; CARREAU et al., 2007). A partir destes estudos, muitos outros mRNAs já foram descritos no ejaculado humano, incluindo HLA (CHIANG et al., 1994), canais e cálcio tipo-L e N-caderina (GOODWIN et al., 2000). No entanto, o papel de cada um destes vários transcritos não está bem elucidado. CARREAU et al., (2007) citam que as protaminas (1 e 2) estão envolvidas com a condensação nuclear; os eNOS (*endothelial nitric oxide synthetase*), os nNOS (*neuronal nitric oxid syntetase*) e o c-myc estão envolvidos com a capacitação espermática; e as aromatases estão envolvidas com a motilidade e sobrevivência espermática. Espermatozoides humanos contêm aproximadamente 0,015 pg de mRNA (GALERAUD-DENIS et al., 2007).

Especificamente em espermatozoides de suínos, YANG et al. (2009), concluíram que cada célula possui uma quantidade de 0,005 pg de transcritos, predominantemente de pequeno tamanho, como os observados por GILBERT et al. (2007), em espermatozoides bovinos. Os autores encontraram transcritos para a protamina 1 (PRM1) e sugerem que este transcrito pode estar relacionado com a fertilidade do macho, porém não descartam a hipótese de que esteja ligado ao desenvolvimento

embrionário. Também encontraram pequenas quantidades de transcritos para a protamina 2 (PRM2).

O fornecimento de vitaminas e minerais aos cachacos pode afetar a expressão dos genes, uma vez que o cálcio, sódio, fósforo magnésio, cloro e potássio estão envolvidos com componentes estruturais e fluídos corporais e os micro-minerais cobalto, cobre, iodo, ferro, manganês, selênio, enxofre e zinco são ativadores de enzimas, coenzimas e hormônios (KOPINSKI, 2005).

Entre os genes estudados nos espermatozoide de suínos estão: *Bcl-2l* (número de acesso no genbank MN\_214285) que é um gene anti apoptótico (JEONG et al., 2009); *gene ativador da proteína de choque térmico 90* (Número de acesso no genbank AY609691) (CASAS et al., 2010) que é uma proteína relacionada a capacidade de reação ao choque térmico; *gene da enzima antioxidante PRDX5* (número de acesso no genbank NM\_214144) (RAUBER 2008) que é um gene que tem papel protetor contra danos oxidativos; *gene inibidor da acrosina* (número de acesso no genbank NM\_213877) (RAUBEN 2008), relacionado a capacitação espermática e proteção dos locais de ligação com a zona pelúcida no momento de fecundação.

### **2.5.1. *Bcl-2l***

O *Bcl-2l* é um gene anti apoptótico da família de genes *Bcl*. O processo de apoptose ocorre normalmente durante a espermatogênese, tendo papel crítico na determinação da produção de espermatozoides em um ejaculado (HENINGER et al., 2004). Em suínos, acredita-se que aproximadamente 15% das células germinativas são perdidas durante a espermatogênese (ALMEIDA et al., 2006). Aproximadamente 2% dos transcritos encontrados em espermatozoides de suínos estão relacionados com o processo apoptótico (RAUBER, 2008).

A regulação de uma célula entrar ou não em um processo de apoptose é controlado pelos genes responsáveis pela regulação de morte celular que pertencem à família de genes *Bcl* (VAUX et al., 1992). Os genes pro e anti apoptóticos da família *Bcl-2l* atuam como marcadores de disfunções mitocondriais (CHAO & KORSMEYER,

1998). Os genes pró apoptóticos *Bax* e *Bak* induzem degradação do DNA depois de induzir a liberação do citocromo c das suas membranas.

JEONG et al. (2009) estão entre os primeiros autores a relacionar o uso de vitaminas e a expressão gênica dos espermatozoides. Os pesquisadores avaliaram o efeito da adição de alfa-tocoferol (vitamina E) em diferentes concentrações, no diluente de sêmen suíno para congelação sobre a expressão da proteína do estresse (HSP 70) e expressão dos genes pro-apoptóticos (*Bax* e *Bak*) e anti apoptóticos (*Bcl-2l* e *Bcl-xl*). Encontraram melhora na motilidade após descongelação nos grupos que receberam 100 e 200 mM e vitamina E. Em relação a expressão do gene ao *Bax*, encontraram menor concentração do transcrito no sêmen tratado com alfa-tocoferol. Já em relação aos transcritos para *Bak* os autores não encontraram diferença na concentração no sêmen tratado com alfa tocoferol. Em relação ao *Bcl 2l* a concentração do transcrito foi maior no grupo não suplementado e suplementado com 100 mM de vitamina E. Os autores concluíram que a adição da vitamina na concentração de 200 mM/mL previne os danos oxidativos provenientes do processo de congelação, melhorando a motilidade das amostras e protegendo a célula espermática contra a peroxidação lipídica, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e diminuindo a expressão dos genes relacionados a apoptose.

### **2.5.2. Gene ativador da proteína de proteção ao choque térmico 90**

A proteína de proteção ao choque térmico (HSP 90) é uma proteína presente no espermatozoide capaz de prevenir danos causados quando estes são submetidos a estresses térmicos.

A presença desta proteína nos espermatozoides pode estar relacionada com a capacidade de tolerar as alterações de temperatura no processo de crioconservação para inseminação artificial. CASAS et al. (2010), estudando sêmen de cachacos que apresentavam maior e menor resistência a congelação, encontraram alta concentração da proteína HSP 90 no sêmen dos machos que apresentavam boa congelabilidade, em dois passos do processo de congelação, a 17°C e 5°C. Os resultados encontrados para o sêmen refrigerado sugerem que esta proteína pode interferir na futura resposta do

espermatozoide ao choque térmico após a congelação. Os autores concluíram que esta proteína pode ser uma marca molecular da capacidade de proteção do espermatozoide contra danos oxidativos e apoptose. Eles também sugerem que esta proteína pode fazer parte do processo de reparação das ligações entre DNA e protaminas.

YANG et al. (2010), encontraram abundância do transcrito com número de acesso no Genbank AY609691, que é ativador da HSP 90 no sêmen de cachacos que foram coletados durante o período de verão.

CADAVID (2010), avaliou o uso de suplementos minerais e vitamínicos aplicados de forma intramuscular coletando e congelando o sêmen de cachacos para posterior uso em inseminações artificiais. Para o sêmen congelado/descongelado, a suplementação de minerais e vitaminas se mostrou vantajosa, melhorando significativamente ( $p < 0,05$ ) os parâmetros de motilidade, espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, com cauda túrgida e enrolada. Os autores concluíram que a suplementação melhorou a criotolerância dos espermatozoides. A melhora na criotolerância pode ser devida a maior expressão do gene de proteção contra o choque térmico (HSP90).

FENG et al. (2001), consideraram as proteínas da família HSP (70 e 90) relevantes para a toxicologia da reprodução pois podem atuar em grande variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos que podem causar danos no DNA, danos na síntese protéica, interrupção no ciclo celular e apoptose inapropriada, que podem resultar em espermatogênese ou desenvolvimento embrionário anormais. .

### **2.5.3. Gene da enzima peroxiredoxina 5**

A peroxiredoxin 5 (PRDX5) tem sido revista como uma das principais enzimas antioxidantes protetoras de células, agindo contra o ataque de peróxidos exógenos e endógenos. Ela está representada dentro de uma família de peroxiredoxinas, capaz de reduzir os peróxidos de hidrogênio, podendo atuar intracelularmente nos peroxissomos, no citosol e potencialmente nas mitocôndrias (KNOOPS et al., 2007). Estas enzimas são dependentes de selênio (MIRANDA-VIZUETE et al., 2004; RHEE et al., 2005).

O'FLAHERTY & SOUZA (2011) usando imunohistoquímica, caracterizou a PRDX5 na peça intermediária e cabeça dos espermatozoides, concluindo que esta isoforma pode estar envolvida com o controle do efeito dos ROS nas mitocôndrias e núcleo espermáticos. Os autores ainda sugerem que, pela presença na cabeça do espermatozoide, a PRDX5 pode estar envolvida com os eventos de fusão do oócito com espermatozoide.

A mitocôndria é a estrutura do espermatozoide mais sensível ao processo de congelação de descongelação (CUMMINS et al., 1994). A presença de PRDX5 nas mitocôndrias também foi confirmada por (BANMEYER et al., 2004; KINNULA et al., 2002). RAUBER et al. (2008) encontraram transcritos para o gene *PRDX5* nos espermatozoides suínos, e concluíram que podem ser devido ao seu papel como antioxidante celular.

No experimento de CADAVID (2010), após a suplementação intramuscular com as vitaminas e minerais, tanto para o sêmen *in natura* quanto após a congelação, o autor encontrou aumento da porcentagem de espermatozoides vivos e com acrossoma íntegro, sugerindo que esta suplementação pode ter auxiliado na proteção contra danos de oxidativos de membrana dos espermatozoides e melhor motilidade, sugerindo também a proteção das membranas das mitocôndrias presentes na peça intermediária destes, responsáveis pela geração de ATPs para o processo de locomoção espermática. A PRDX5 pode ser uma das enzimas que pode ter auxiliado no processo de proteção contra estes danos oxidativos, uma vez que ela é dependente de Selênio livre, e os animais do experimento de CADAVID (2010) foram suplementados de forma intramuscular com este mineral.

#### **2.5.4. Gene inibidor da acrosina**

O sistema de proteinases e seus inibidores tem papel primordial na reprodução. A manutenção das proteinases em seu estado inativa é crucial para a manutenção da célula espermática (UHRIN et al., 2000). O principal papel dos inibidores de proteinases no trato reprodutivo é a proibição da liberação prematura de enzimas hidrolíticas e a proteção do trato reprodutivo e espermatozoides contra a degradação

proteolítica, causados pela liberação de acrosina por espermatozoides com acrossoma danificado (FRIZ et al., 1975), além de papel importante no desenvolvimento e maturação espermática (CHARRON & WRIGHT, 2005) e capacitação (SCHILL et al., 1975). No trato reprodutivo de cachorros, os inibidores de acrosina foram encontrados no líquido seminal e espermatozoides.

A acrosina é a proteinase de maior função dentro da família das serinas, que se expressam nos espermatozoides e testículos. Ela é estocada no acrossoma em sua forma inativa, de proacrosina. A conversão de proacrosina em acrosina ocorre durante a reação acrossomal (BABA et al., 1989). A maior função da proacrosina é a alta afinidade de ligação com os grupamentos sulfato das glicoproteínas da zona pelúcida durante a ligação secundária do espermatozoide com o óvulo, colaborando desta forma com o trabalho de penetração na zona pelúcida (GABORIAU et al., 2007).

Os inibidores de acrosina podem ser encontrados em muitas formas no plasma seminal e nos espermatozoides. Nos espermatozoides três isoformas podem ser isoladas, e elas estão ligadas à proteção dos espermatozoides contra a liberação prematura da acrosina (reação acrossomal), mas também podem estar ligados a estabilização dos locais de ligação da superfície espermática, bem como na interação oócito/espermatozoide (SANZ et al., 1992).

Em CADAVID (2010) a suplementação intramuscular de minerais e vitaminas também se mostrou vantajosa para o sêmen congelado/descongelado melhorando significativamente ( $p < 0,05$ ), vivos com acrossoma íntegro. Estes resultados podem estar envolvidos com maior expressão do gene inibidor de acrosina, que impediu a liberação prematura desta enzima, impedindo a capacitação espermática durante o processo de manipulação para congelamento e descongelamento deste sêmen.

### **2.5.5. Protamina 1**

As protaminas são as proteínas mais importantes relacionadas ao DNA do espermatozoide, pois estão envolvidas no processo de condensação do DNA, fazendo o papel das histonas no DNA somático (GRIMES, 1989; HECHT, 1998). Elas são relativamente pequenas (27 a 65 aminoácidos) altamente básicas, ricas em arginina e

cisteína. Em humanos, a espermiocromatina condensada se divide em 85% ligadas a protaminas e 15 % ligadas a histonas (WYKES et al., 1997). A maioria dos mamíferos possui apenas um tipo de protamina, porém, algumas espécies, incluindo o homem e o rato possuem dois tipos de protaminas (HECHT, 1984; BALHORN et al., 1999). Em humanos, as duas protaminas são importantes para fertilidade e a estabilidade de formação nuclear é interrompida na diminuição dos níveis de qualquer um das duas (CHO et al., 2001; CHO et al., 2003).

CARREAU et al. (2007) concluíram que a análise dos arquivos de mRNA dos espermatozoides em humanos pode ajudar na avaliação da fertilidade masculina, uma vez que eles refletem a expressão gênica da espermatogênese.

#### **2.5.6. *C-kit***

O receptor da tirosina kinase (*C-kit*) é um gene da família *Kit*, que é uma família de receptores de fatores de crescimento com atividade na tirosina kinase, que traduz os sinais de regulação de crescimento através da membrana plasmática (MITHRAPRABHU & LOVELAND, 2009)

Segundo WITTE (1990) e DOLCI et al., (1991), na gônadas embrionárias, o receptor da tirosina kinase (*c-kit*) e seu ligante, chamado de fator de célula germinativa (SCF) são essenciais para a sobrevivência e proliferação das células primordiais germinativas.

A síntese da proteína e mRNA de *kit* durante o desenvolvimento testicular em ratos está ligada ao desenvolvimento das primeiras espermatogônias em diferenciação, o que ocorre aproximadamente no sétimo dia de vida. Entre os dias 0 e 5 de vida, durante o período de migração do centro dos gonócitos do centro dos cordões seminíferos até a periferia, o mRNA para *kit* também pode ser detectado (HASTHORPE et al., 1999; PRABHU et al., 2006). Esta expressão pode persistir até seu período proliferativo (ORR-URTREGER et al., 1990; MANOVA & BACHAVAROVA, 1991).

YANG et al., (2009) propôs o uso de iniciadores específicos para c-kit para controle da contaminação das amostras de espermatozoides purificados com células testiculares germinativas.

#### **2.5.7. E-caderina**

As caderinas, foram originalmente identificadas como glicoproteínas presentes na superfície celular, responsáveis pela resposta de adesão entre as células, dependente da cálcio, inicialmente durante a compactação do estágio de mórula em embriões préimplantados de ratos (YOSHIDA & TAKEICHI 1982; VESTWEBER & KEMLER, 1984). A e-caderina está dentro desta família de moléculas de adesão, que participam na orientação cromossômica pela participação na formação de fusos durante a divisão celular. (MARTHIENS et al., 2010). Elas são abundantes em células germinativas do sistema nervoso (n-caderinas) (LOULIER et al., 2010) e epitelial (e-caderinas) em mamíferos (LECHLER, et al., 2005).

YANG et al. (2009), propôs o uso de iniciadores específicos para *e-caderina* para controle da contaminação das amostras de espermatozoides purificados com células epiteliais. LALANCETTE et al. (2008), também utilizou a e-caderina como controle por contaminação por células epiteliais trabalhando com espermatozoides de bovinos.

#### **2.5.8. CD45**

Os leucócitos dos mamíferos compartilham um antígeno que está presente em todas as células nucleadas de origem mielóide e está ausente nos eritrócitos, o antígeno leucocitário comum CD45+ (BINNS et al., 1995).

O antígeno CD45+, constitui uma família de glicoproteínas expressadas exclusivamente em células de origem hematopoiética e que pode incluir mais de oito isoformas, devido à emenda variável de três exons (A, B e C) localizados perto do terminal 5' do mRNA (THOMAS, 1989).

O anticorpo monoclonal CD45+ é o marcador de escolha para o total de leucócitos e foi testado durante os workshops de suíno em 1995 e 1998. No DC45 suíno, predominam três isoformas que incluem CD45R0, CD45RC e CD45RAC. Tais isoformas em células hematopoiéticas de suínos apresentam pesos moleculares de 190, 210, e 226 kDa, respectivamente (ZUCKERMANN et al.,1998).

### 3. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da suplementação vitamínico mineral via intramuscular na qualidade dos espermatozoides, através dos parâmetros de volume, concentração e resistência ao resfriamento entre 15 e 18°C, medido pela motilidade das amostras diluídas em BTS e avaliar a diferença na expressão de genes relacionados a qualidade espermática (*Bcl-2l*, *inibidor da acrosina*, *peroxiredixina 5*, *ativador da proteína de proteção ao choque térmico*), pela técnica de PCR em tempo Real;

#### **4. HIPÓTESE**

A suplementação vitamínico-mineral via intramuscular melhora os parâmetros qualitativos do sêmen e aumenta a expressão dos transcritos de genes relacionados a qualidade dos espermatozoides em cachorros.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma granja comercial de produção de suínos com animais da linhagem Topigs®. Todos os machos reprodutores utilizados estavam com idade entre 1,5 a 2,5 anos. O sêmen dos animais experimentais foi coletado segundo a técnica da mão enluvada em recipiente estéril coberto por gaze e protegido por copo térmico, sendo utilizado o ejaculado total após a separação da fração gelatinosa.

Nove machos tiveram seu sêmen coletado, avaliado e manipulado para a obtenção de espermatozoides puros, sem contaminação por células somáticas. Após este período inicial, os seis machos sofreram a aplicação, por via intramuscular, de suplementos minerais-vitamínicos com a seguinte composição (Selenphós®: 0,375 g selenito de sódio; 6000000 UI vitamina D2; 25000 UI vitamina E; 20 g glicerol fosfato de sódio; 15 g de fosfato tricálcico, em cada 100 ml de produto e Zimag®: lactobionato de magnésio 30 g; lactobionato de Cálcio 15 g; lactobionato de zinco 8 g; lactobionato de cobre 1 g; lactobionato de cobalto 0,5 g; lactobionato de manganês 0,45 g; glicerofosfato de sódio 5 g em 100 ml do produto), na concentração de 0,7ml de Zimag®/100 kg de peso vivo e 0,5 ml de Selephós® para cada 50 kg de peso vivo. A aplicação foi realizada somente uma vez, segundo a recomendação do fabricante (FormilVet®). Três machos permaneceram sem receber os suplementos e receberam soro fisiológico para simular o estresse da aplicação. Estes machos constituíram o grupo controle. Durante 60 dias, o sêmen destes animais foi avaliado somente em relação a motilidade, concentração e volume, constituindo este o período de adaptação. Este período foi considerado para que seja possível que o produto testado tenha seu máximo efeito nas características seminais, uma vez que a espermatogênese e transporte no epidídimo levam 34 e 10 dias, respectivamente (SENGER, 2002). Após estes 60 dias, outras coletas de sêmen dos nove machos (controle e tratados) foram realizadas.

### 5.1. Nutrição dos machos

As dietas dos grupos controle e tratado foram as mesmas, compostas principalmente por milho, farelo de soja, farelo de trigo, para minimizar um possível efeito da dieta sobre o resultado do experimento. A água foi fornecida á vontade. Na Tabela 1 observa-se os níveis nutricionais da dieta dos machos.

**Tabela 1:** Níveis nutricionais da dieta dos cachos do experimento.

| Nutrientes       | Quantidade  | Nutrientes        | Quantidade  |
|------------------|-------------|-------------------|-------------|
| Proteína Bruta   | 15%         | Metionina         | 1485mg/kg   |
| Extrato etéreo   | 2,00%       | Vitamina E        | 144mg/kg    |
| Fibra Bruta      | 7,00%       | Vitamina D        | 5032UI/kg   |
| Cálcio           | 1,00%       | Lisina            | 1317mg/kg   |
| Fósforo Total    | 0,45%       | Vitamina K3       | 4,42mg/kg   |
| Umidade          | 13%         | Ácido pantotênico | 17,44mg/kg  |
| Material mineral | 8,00%       | Iodo              | 1,4mg/kg    |
| BHT              | 1000mg/kg   | Ácido fólico      | 1,93mg/kg   |
| Ácido propiônico | 1500mg/kg   | Selênio           | 0,8mg/kg    |
| Bentonita        | 3500mg/kg   | Cobalto           | 0,176mg/kg  |
| Vitamina C       | 210mg/kg    | Colina            | 600mg/kg    |
| Ferro            | 85mg/kg     | Biotina           | 0,20mg/kg   |
| Manganês         | 50mg/kg     | Niacina           | 26,164mg/kg |
| Vitamina B12     | 33,55mcg/kg | Vitamina B1       | 2,6838mg/kg |
| Cobre            | 95mg/kg     | Vitamina B6       | 2,6838mg/kg |
| Vitamina A       | 20125UI/kg  | Vitamina B2       | 5,1526mg/kg |
| Zinco            | 283mg/kg    | E.M. Suínos       | 2.944,91    |
| Cromo            | 0,2mg/kg    | Kcal/Kg           |             |
|                  |             | Lisina Total      | 0,65%       |

### 5.2. Avaliação da qualidade espermática

Todos os machos envolvidos no experimento (controle e tratados, antes e após a suplementação) tiveram seu sêmen coletado e avaliado segundo motilidade e concentração em câmara de Neubauer. Amostras de cada ejaculado foram retirada ( $1,75 \times 10^9$  espermatozoides) e diluída em diluente comercial BTS (Beltsville Thawing

Solution: 60 g/l de glicose; 1,2 g/l de bicarbonato de sódio; 3,7 g/l de EDTA; 3,7 g/l de citrato de sódio; 1 g/l de estreptomicina; 0,5 g/l de penicilina, com pH 6.6–6.7). Estas amostras foram divididas em 7 tubos de côneicos de polipropileno ( $35 \times 10^8$  sptz/tubo), com volume de 15 ml e conservadas à temperatura de 15 a 18°C. Cada um dos seis tubos representou um dia de análise sendo o dia de colheita o dia zero (D0) e os demais, D1, D2, D3, D4, D5 e D6. Em cada dia foi feita análise de motilidade para determinar a resistência frente ao resfriamento (15 a 18°C).

A motilidade espermática foi analisada por microscopia de luz em três amostras de 20 microlitros, de cada ejaculado, em uma ampliação de 200 vezes. A escala utilizada foi por notas de 0 a 100. A concentração foi determinada em câmara de Neubauer.

As coletas dos machos *in natura* foram submetidos a purificação para descontaminação por células somáticas e posterior extração de RNA.

### **5.3. Análise estatística dos dados**

A comparação entre as variáveis foi feita por um teste não paramétrico denominado teste do sinal. Este teste foi escolhido, pois ele considera que os dados consistem em pares de informações no mesmo indivíduo, representando uma situação “pré” e “pós”, estabelecida no presente experimento. A análise de significância é feita com base na diferença entre as médias das variáveis analisadas. O nível de significância aceito foi de 5%.

### **5.4. Eliminação de células somáticas dos ejaculados**

As amostras dos nove cachacos que foram avaliadas *in natura* foram coletadas na granja e transportadas a 37°C até o laboratório para processamento, segundo protocolo de YANG et al. (2009), com modificações, dentro de fluxo de ar para evitar contaminação. Cada amostra foi diluída na proporção de 1:1 em diluente de sêmen BTS em tubos côneicos de 15 ml (Corning) livres de RNase e DNase e incubada por 30

minutos a temperatura de 37° C para que células somáticas, leucócitos e outros resquícios celulares pudessem sedimentar.

Após estes período, a metade de cima do sobrenadante foi transferida para outro tubo de 15 ml livre de RNase/ DNase, e o volume completado com diluente para sêmen BTS. Estas amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 500g, em temperatura ambiente. Mais uma vez, a metade de cima do volume dos tubos foi transferida para outros tubos de 15 ml livres de Rnase/Dnase e o procedimento de centrifugação repetido novamente. Após esta última centrifugação, metade de cima dos tubos foi retirada e transferida para outros de 15 ml tubos livres de RNase/DNase e estes foram centrifugados a 1000g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e descartado e o sedimento de espermatozoides formados foi submetido a congelamento súbito em nitrogênio e depois transferido para freezer -20°.C.

## **5.5. Extração de RNA dos espermatozoides**

As amostras congeladas de espermatozoides foram descongeladas em um banho maria por 3 minutos imediatamente antes da extração do RNA. A concentração de espermatozoides de cada amostra foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer, após diluição de 1:500. Segundo BISSONNETTE et al. (2009), quando se faz extração de RNA de espermatozoide por kits, o sistema de membranas de ligação do RNA das colunas não permite a recuperação de quantidade suficiente de RNA devido a pouca quantidade deste contida em cada célula. Devido a isto, um teste foi realizado com os espermatozoides de suínos. Em uma primeira amostra (A), a quantidade de espermatozoides suportada pela coluna, segundo instruções do fabricante, foi adicionada (aproximadamente  $10^7$  espermatozoides). Em uma segunda amostra (B) foi adicionado aproximadamente  $2 \times 10^7$  espermatozoides (20 vezes mais o recomendado), o que promoveu saturação da coluna. Com o aumento da concentração imposta na coluna, há um risco bem maior de contaminação das amostras de RNA com DNA genômico (BISSONNETTE et al., 2009)

O número de espermatozoides foi padronizado para todas as amostras. O RNA total foi extraído dos espermatozoides purificados usando o RNeasy lipid mini Kit (Qiagen), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

Usando a quantidade de espermatozoides da amostra B, rendimento de extração variou de 0,6 a 19,8 ng/mL de RNA, quantificadas por análise em espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific), para a padronização das quantidades na etapa posterior de síntese de cDNA

#### **5.6. Síntese do cDNA**

As amostras de RNA foram padronizadas pela diluição ou não com água livre de DNase e RNase para conterem aproximadamente 50 ng de RNA. A síntese do cDNA seguiu protocolo para enzima MMLV (transcriptase reversa, Invitrogen), conforme descrito pelo fabricante.

As amostras de cDNA foram colocados no freezer -20°C para posterior utilização.

Para cada amostra de sêmen foi feita uma amostra como branco, com o RNA das amostras, porém, sem a enzima MMLV, para se certificar da não contaminação por DNA genômico (brancos não devem amplificar).

#### **5.7. Extração de RNA de sangue e síntese de cDNA**

Foi utilizada uma amostra de sangue de suínos para testar a amplificação dos iniciadores, construção das curvas padrão para cada gene sob estudo e testar a eficiência de amplificação, que deve estar sempre em torno de 100%.

A extração de RNA foi realizada segundo protocolo de extração por TRIzol. O RNA total foi extraído à partir de uma amostra de 2 ml de sangue coletada na veia jugular dos animais do experimento.

#### **5.8. Avaliação da pureza das amostras**

Foi feito um gel de agarose a 1%, com todas as amostras de RNA espermático para avaliar a presença de contaminação por células somáticas. A ausência de

bandamento 18 e 28S significa que as amostras estavam puras de células somáticas. Para tal, no gel de agarose foi adicionado a cada poço 10µl de RNA da amostra e 2µl de azul de bromofenol como carreador, e submetidos a eletroforese.

Para se certificar da ausência de contaminação por leucócitos e células epiteliais e células germinativas testiculares, foram selecionados iniciadores de marcadores de superfície específicos para serem utilizados em PCR em tempo real: CD45, e-caderina e c-kit, respectivamente e para se certificar da presença de RNA espermático nas amostras, foram utilizados iniciadores específicos para protamina 1 (tabela 2), segundo protocolo descrito por YANG et al., (2009). BISSONNETTE et al., (2007) também usou iniciadores específicos para e-caderina (CDH1) e c-kit em amostras de espermatozoides de bovinos, purificadas por gradiente de Percoll, para verificação de contaminação por células somáticas.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados para verificação da pureza das amostras de cDNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides suínos do experimento, tamanho do segmento e número de acesso no Genbank.

| Gene              | Iniciador                                                        | tamanho do produto | número de acesso |
|-------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------|
| <i>CD45</i>       | 5'- AGAATACTGGCCGTCGATGG -3'<br>5'- GCTGAACGCATTCACTCTCCT -3'    | 238bp              | CB288124         |
| <i>c-kit</i>      | 5-GTTGATGACCTCGTGGAATGC- 3'<br>5-CTGCTACTGCTGTCATTCCTAAGG-3'     | 648bp              | L07786           |
| <i>E-caderina</i> | 5'- GAAGCACAGAATCCCCAAGTG - 3'<br>5'- GGCGTGTTTGTCTTCCATTTC - 3' | 156bp              | BX672333         |
| <i>protamina1</i> | 5'- TCACCATGGCCAGATACAGAT - 3'<br>5'- AGTGCGGTGGTCTTGCTACT - 3'  | 184bp              | ES446457         |

Para tal, foi realizado qPCR com os iniciadores descritos.

## 5.9. Reação de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas a partir de um volume final de 20µl, contendo 1X do mix SYBR Green (Quantitec SYBR Green PCR kit, qiagen cat.no. 204143), 10 µM de cada primer e 1 µl de cDNA. As reações em tempo real foram realizadas em termociclador Prism 7500 (Applied Biosystems).

Em todas as reações de amplificação a curva de padronização foi constituída de uma diluição serial de três vezes, em duplicata de cada gene, tanto no sangue como no sêmen. Esta curva foi construída para testar a eficiência de reação e dos iniciadores.

Para a quantificação da expressão dos genes sob estudo e os de controle de contaminação por células somáticas, foi escolhido o método de quantificação de expressão relativa, segundo o qual a expressão de um gene alvo é determinada pela razão entre a expressão deste em relação a expressão nas amostras calibradoras, no caso, a expressão do gene nas amostras antes da aplicação das vitaminas e minerais. A expressão nas amostras calibradoras recebe o valor relativo igual a 1 e a diferença de expressão é calculada com base neste valor. Para normalizar a expressão de todos estes genes é escolhido um gene constitutivo, no caso de sêmen, um gene normalizador, normalmente a *protamina 1* (FEUGANG et al., 2010).

## 5.10. Genes alvo escolhidos para acessar a qualidade dos espermatozoides

Os genes alvo escolhidos para acessar a qualidade dos espermatozoides foram: *Bcl-2l* (número de acesso no genbank MN\_214285) que é um gene anti apoptótico (JEONG et al., 2009); *gene ativador da proteína de choque térmico 90* (HSP 90) (número de acesso no genbank AY609691) (CASAS et al., 2010) que é uma proteína relacionada a capacidade de reação ao choque térmico; *gene ativador da enzima PRDX5* (número de acesso no genbank NM\_214144) (RAUBER 2008) que é uma enzima que tem papel protetor contra danos oxidativos; *gene inibidor da acrosina* (número de acesso no genbank NM\_213877) (RAUBER 2008), relacionado a capacitação espermática e proteção dos locais de ligação com a zona pelúcida no

momento de fecundação. O gene normalizador utilizado foi da promatrina 1 (FEUGANG et al., 2010). A Tabela 3 apresenta o conjunto de iniciadores utilizado para cada gene

**Tabela 3:** Iniciadores a serem utilizados na verificação de diferenças entre as amostras de cDNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides suínos do experimento, tamanho do segmento e número de acesso no Genbank.

| Gene                        | Iniciadoeres                                                    | tamanho do produto | número de acesso |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|------------------|
| <i>Protamina1</i>           | 5'- TCACCATGGCCAGATACAGAT - 3'<br>5'- AGTGCGGTGGTCTTGCTACT - 3' | 184bp              | ES446457         |
| <i>Blc-2l</i>               | 5'- GAAACCCCTAGTGCCATCAA - 3'<br>5'- GGGACGTCAGGTCACTGAAT -3'   | 196bp              | NM_214285        |
| <i>Ativador da HSP90</i>    | 5'- TCCGTCTCTCCGTTCTTGTC - 3'<br>5'- CTCCTGCGATGTTAGAAGCA - 3'  | 206bp              | AY609691         |
| <i>PRDX5</i>                | 5'- AGTGGTGGCATGTCTGAGTG - 3'<br>5'- CCATGGAGAACCTCTTGAGC - 3'  | 198bp              | NM_214144        |
| <i>Inibidor da acrosina</i> | 5'- TCTCTGTGCGCAGACCTGAAA - 3'<br>5'- AATATGCAGGGATTGGCGTA - 3' | 185bp              | NM_213877        |

Cada amostra de sêmen foi testada para cada um dos genes em placas para PCR, todas em duplicata. A cada corrida era adicionada a curva padrão de gene. Os genes que tinham expressão no sangue, a curva padrão utilizada foi a do sangue. Para os genes que a expressão era exclusiva dos espermatozoides foram utilizadas curvas padrão de espermatozoides.

A média das quantificações foi gerada automaticamente pelo Software Core Application, version 1,3 (Biosystems Applied).

Foi realizada uma placa com *protamina 1* e os brancos (amostras sem a MMLV) para verificar a completa ausência de DNA genômico nas amostras de sêmen.

### 5.11. Análise dos dados do qPCR

Para a quantificação das diferenças de expressão, foi utilizado o método comparativo de Cq ou Ct. A quantificação foi normalizada pela *protamina1* . O valor

de  $\Delta Cq$  foi determinado pela diferença entre valor do  $Cq$  do gene de interesse e o valor do  $Cq$  do gene de calibrador ( $=1$ ), obtido das amostras antes do tratamento. O cálculo de  $\Delta\Delta Cq$  foi realizado utilizando o valor médio de  $\Delta Cq$  do grupo calibrador, como uma constante ( $=1$ ) para subtrair de os outros valores médios de  $\Delta Cq$  das amostras para cada gene estudado. A quantificação da expressão gênica foi calculada através da formula  $2^{-\Delta\Delta Cq}$

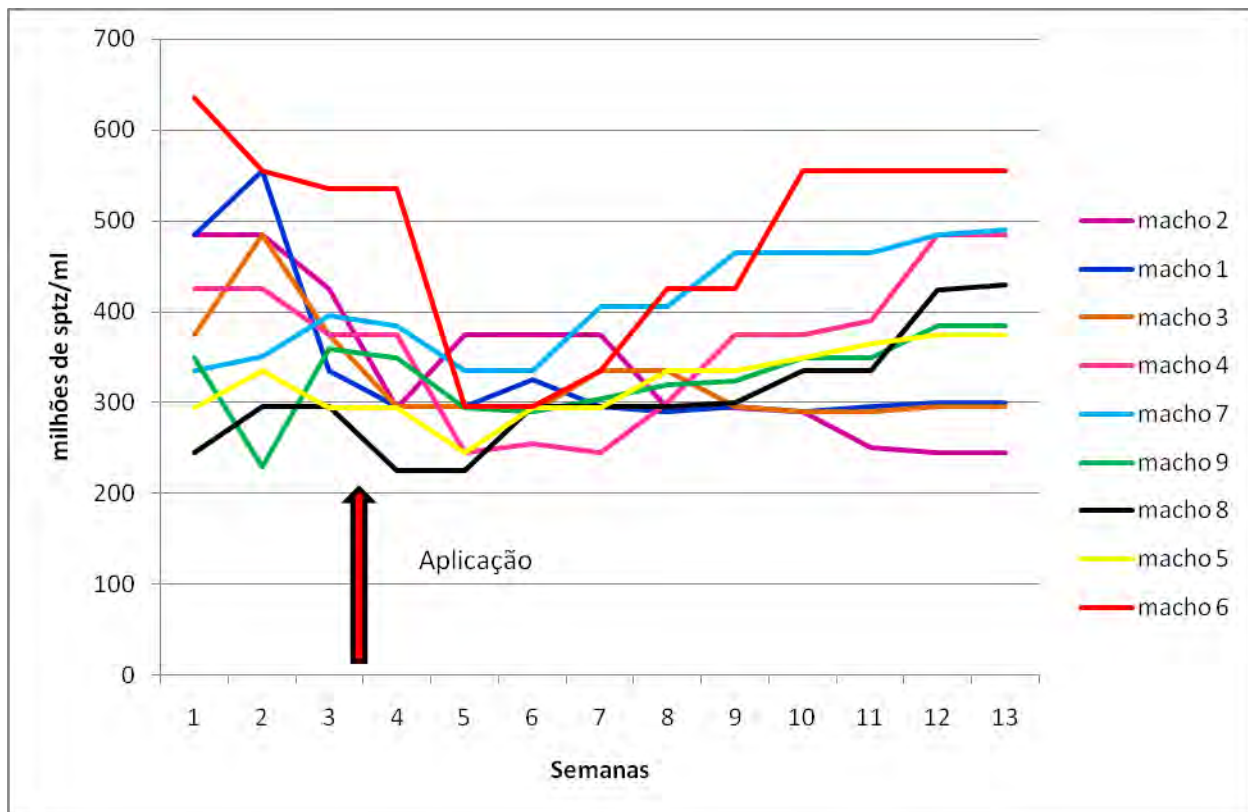
$$\text{Diferença de expressão} = 2^{-\Delta\Delta Cq \pm dp}$$

Onde  $dp$  é o desvio padrão de cada amostra.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Perfil de concentração de espermatozoides nos ejaculados dos machos durante o período experimental

Para avaliar o perfil de produção espermática durante o período do experimento, todas as coletas foram analisadas, durante 13 semanas, segundo a concentração de espermatozoides. Este parâmetro serviu como guia do efeito das vitaminas, apontando o momento ideal para começar as coletas após a aplicação das vitaminas e minerais. Estes dados estão representados na Figura 1.



**Figura 1:** Acompanhamento da concentração espermática dos cachos durante o período experimental. Os cachos 1,2 e 3 permaneceram como controle.

Em todos os animais, é possível observar queda na concentração espermática logo após a aplicação das vitaminas e minerais injetáveis. Este fato pode ser explicado

devido ao estresse de contenção e a própria aplicação dos suplementos. É importante salientar que, mesmo os machos que não receberam a suplementação, receberam aplicação de soro fisiológico para mimetizar o estresse sofrido pelos machos tratados.

Para avaliar possível efeito de ambiente na qualidade de sêmen devido aos 60 dias de adaptação ao qual os animais foram submetidos, três machos foram deixados como controle (machos 1, 2 e 3), sem aplicação dos suplementos.

No acompanhamento da produção espermática, nota-se que dois machos se sobressaíram na concentração (machos 5 e 6). Estes machos, aparentemente foram os que melhor responderam a administração de vitaminas e minerais intramusculares.

## 6.2. Concentração espermática e volume do ejaculado

Os resultados de concentração e volume apresentaram melhora significativa após a suplementação com vitaminas e minerais de forma intra muscular ( $p=0,033$  e  $p=0,05$ , respectivamente), conforme demonstrado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Comparação das médias de concentração e volume no sêmen *in natura* dos cachacos antes e depois da suplementação com vitaminas e minerais e dos três que permaneceram como controle após a aplicação das vitaminas e minerais.

| Tratamentos       | concentração<br>média<br>(sptz/ml) | média<br>volume     |
|-------------------|------------------------------------|---------------------|
| Sem suplementação |                                    |                     |
| Antes             | $295 \times 10^6^a$                | 153 ml <sup>a</sup> |
| Depois            | $280 \times 10^6^a$                | 140 ml <sup>a</sup> |
| Com suplementação |                                    |                     |
| Antes             | $295 \times 10^6^a$                | 156 ml <sup>a</sup> |
| Depois            | $451 \times 10^6^b$                | 245ml <sup>b</sup>  |

Letras diferentes significam diferença estatística com  $p<0,05$

Não houve diferença significativa entre as coletas dos nove machos antes dos sessenta dias e dos três machos controle após este período, mostrando que para os

parâmetros motilidade e concentração não houve efeito de ambiente devido ao período de adaptação. Estes resultados estão de acordo com HENMAN et al., (2001) que também não encontraram influencia de amplitude térmica e umidade sobre a qualidade do sêmen dos cachacos alojados em áreas de zona úmida e tropical. Este fato pode ser devido as coletas terem sido realizadas na mesma estação do ano, sem um período de tempo muito longo entre elas.

O aumento das médias de concentração dos espermatozoides e volume dos ejaculados dos machos tratados pode ser devido a suplementação orgânica e intramuscular, que promoveu aproveitamento total das vitaminas e minerais, por apresentarem maior biodisponibilidade. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por JACYNO et al. (2002), que, avaliando fontes orgânicas e inorgânicas de selênio aliadas a vitamina E em cachacos, encontraram maior concentração espermática e porcentagem de espermatozoides com acrossomos normais para a fonte orgânica de selênio. Os autores também encontraram diminuição na porcentagem de espermatozoides com anormalidades morfológicas. Na realidade, os minerais orgânicos, em geral, são menos reativos e apresentam maior biodisponibilidade (MULAN et al., 2006).

LIU et al. (1982) sugeriram que a deficiência de selênio prolongada em cachacos poderia resultar em diminuição da concentração e motilidade espermática, além de aumentar a incidência de gotas citoplasmáticas.

No entanto, MARIN-GUZMAN et al. (1997), usaram dietas com concentrações de Se inorgânico de 0 a 0,5 ppm e vitamina E de 0 a 220 UI/kg de dieta em cachacos para avaliar, entre outros parâmetros, a qualidade do sêmen e a taxa de fertilização. Não encontraram efeito da suplementação no volume ou concentração espermática. Estes resultados podem sugerir que, pelo fato do mineral ser inorgânico e da vitamina terem sido administrados por via oral, sua biodisponibilidade pode ter sido menor.

Acredita-se que a vitamina E tenha papel fundamental no processo de espermatogênese (MASON, 1940; MARIN-GUZMAN et al., 1997). Deficiência de vitamina E pode causar degeneração testicular em ratos, cães, gatos, suínos e macacos, o que pode provocar em baixo número de células germinativas e conseqüente

redução na produção espermática (MASON, 1940; MASON & MANER, 1957; COOPER et al., 1987)

O zinco e magnésio, que são componentes das DNA e RNA sintetases e transferases, enzimas digestivas e insulina, também tem função na produção espermática de cachacos (KOPINSKI, 2005) por diminuir o número de células com danos no DNA, que entrariam em processo de apoptose. Este fato também pode contribuir para a maior concentração de espermatozoides encontrada no presente experimento. LIAO et al. (1985), suplementando cachacos por via oral com diferentes níveis de zinco inorgânico (32, 89, 146 e 197 ppm) encontraram uma maior produção de espermatozoides nos animais que receberam os níveis mais altos, porém, não encontraram efeito do tratamento sobre o total de espermatozoides com anormalidades morfológicas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente experimento, em relação a concentração espermática.

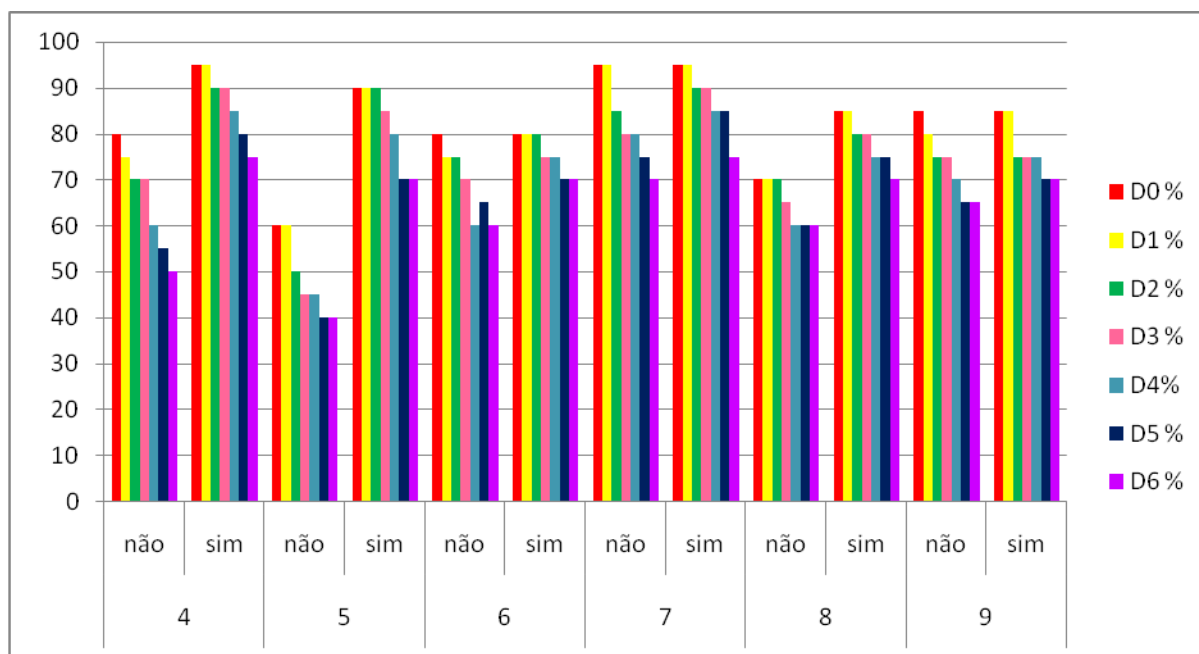
### 6.3. Resistência ao resfriamento dos espermatozoides diluídos

Os ejaculados dos machos suplementados de forma intramuscular com vitaminas e minerais e os do grupo controle foram diluídos em BTS e mantidos a temperatura de armazenamento de 15 a 18°C e a resistência dos ejaculados foi avaliadas pela motilidade observada a cada dia, sendo o dia zero (D0) o dia da coleta do sêmen. As amostras dos cachacos que receberam a suplementação vitamínico mineral de forma intramuscular apresentaram maior resistência, permanecendo com motilidade acima de 70% (aceitável para uso em inseminações artificiais) por período de tempo maior, conforme demonstrado na Tabela 5.

**Tabela 5:** Resistência média dos espermatozoides de cachacos *in natura* diluídos em BTS, durante sete dias (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6), ao tempo de coleta antes e depois da suplementação de vitaminas.

| Suplementados | Motilidade média (%) |       |       |       |       |       |       |
|---------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|               | D0                   | D1    | D2    | D3    | D4    | D5    | D6    |
| não           | 79,16                | 77,08 | 71,25 | 67,08 | 59,16 | 56,25 | 52,08 |
| sim           | 88,33                | 88,33 | 84,16 | 82,5  | 79,16 | 75    | 71,66 |

Com base nos dados coletados dos machos ante e após a suplementação com vitaminas e minerais, foi montada a Figura 2, para ilustrar diferenças de respostas inerentes a cada machos. Foram usados apenas os machos antes o após a suplementação. Não foram colocados na figura os machos controle.



**Figura 2:** Resultados de motilidade de cada macho nos sete dias de coleta, frente ao resfriamento entre 15 e 18°C, após diluição com diluente de sêmen BTS.

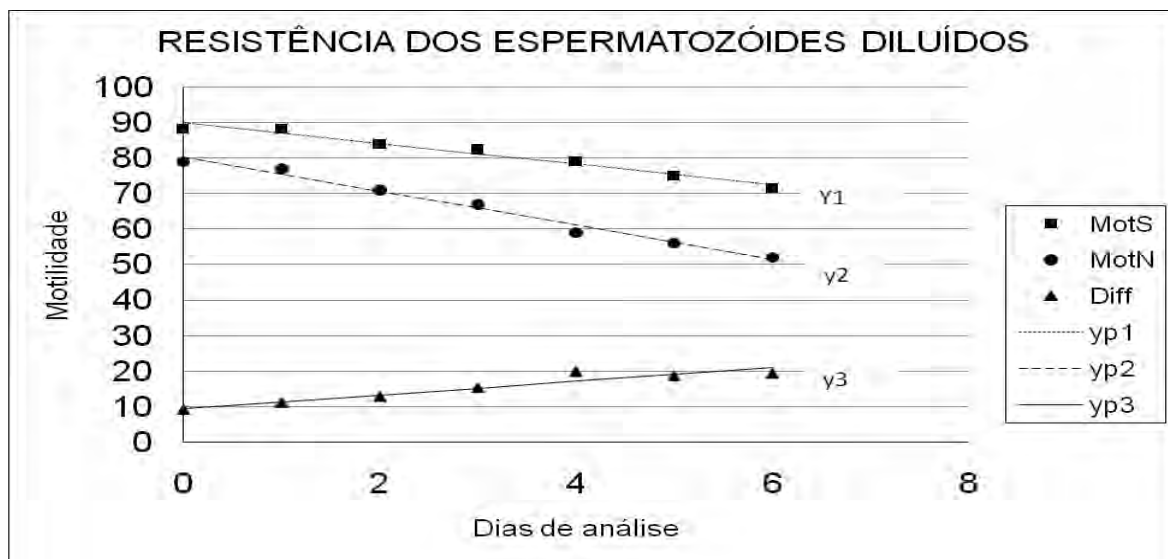
Os machos 4, 5, 7 e 9 apresentaram motilidade no último dia de avaliação superior a 75%, sendo que foram os que melhor responderam ao tratamento com vitaminas e minerais. Estes resultados de variação entre machos eram esperados, caracterizando bons respondedores e maus respondedores aos tratamentos (ANTUNES, 2006; CASAS et al., 2010).

Foram construídos perfis de regressão para análise da significância dos resultados. A Figura 2 demonstra as tendências e suas respectivas equações de regressão. As retas  $yp_1$ ,  $yp_2$  e  $yp_3$  são os valores preditos ou esperados para as equações de regressão. Os pontos marcados são as média de motilidade observadas nos diferente dias de avaliação. A equação  $y_1$  representa a regressão das observações

realizadas nos machos após a suplementação com as vitaminas e minerais (MotS). A Equação  $y_2$  representa a regressão das observações nos machos antes da suplementação com vitaminas e minerais (MotN). A equação  $y_3$  representa a diferença observada antes e após a suplementação com as vitaminas e minerais (Diff).

O coeficiente de regressão  $b$  para a equação  $y_1$  da motilidade com a suplementação com as vitaminas e minerais (MotS:  $y_1 = 90,03 - 2,92x$ ) teve  $p < 0.01$ . O coeficiente de regressão  $b$  para a equação  $y_2$ , sem a suplementação de vitaminas e minerais (MotN:  $y_2 = 80,44 - 4,82x$ ) teve  $p < 0.01$  e o coeficiente de regressão  $b$  para a equação  $y_3$ , referente a diferença encontrada entre as médias de motilidade dos grupos suplementados e não suplementados (Diff:  $y_3 = 9,59 + 1,9x$ ) teve  $p < 0.01$ . O valor de  $x$  representa o dia da análise.

A motilidade no grupo dos animais após receberam a suplementação foi maior desde o dia da coleta de sêmen (Dia zero) e tenderam a permanecer com motilidade mais alta, geralmente acima dos 70% por um período maior de tempo, em comparação com os dados destes animais antes de receberem a suplementação. A diferença de motilidade entre os grupos antes e depois da suplementação tendeu a aumentar, conforme demonstra a equação de regressão  $y_3$ .



**Figura 3:** Resistência dos espermatozoides de suínos diluídos em BTS e mantidas a temperatura da 15 a 18° C, medida pela motilidade das amostras em sete dias consecutivos.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os apresentados por MARIN-GUZMAN et al., (1997) que também observaram melhora de motilidade espermática com a suplementação oral cachaços com Se (0,5 ppm). A maior motilidade pode ser devido a fato do selênio estar envolvido diretamente na movimentação flagelar do gameta, uma vez que BROWN & BURK (1973) e CALVIN (1979) observaram aumento da concentração de Selênio na peça intermediária de espermatozoides de ratos previamente suplementados com esse mineral na forma inorgânica, via injetável. É na peça intermediária que se encontram as mitocôndrias responsáveis pela geração de energia (ATP) no processo de movimentação flagelar. MARIN-GUZMAN et al., (2000) avaliando quatro tipos de dietas, suplementadas com Selênio (0 e 0,5 ppm) ou com vitamina E (0 e 220UI/kg de dieta) observaram redução na concentração de ATP na dieta não suplementada com Selênio. Este efeito pode diminuir a motilidade espermática e reduzir as taxas de fecundação.

PEÑA et al., (2004), usaram análogo de vitamina E (100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M – Trolox) adicionado ao diluente de sêmen suíno e submeteram ao processo de congelação. Os autores concluíram que a adição do antioxidante proporcionou aumento significativo de espermatozoides exibindo alta atividade mitocondrial. A mitocôndria é a estrutura do espermatozoide mais sensível ao processo de manipulação do sêmen (CUMMINS et al., 1994). A vitamina E, associada a enzimas antioxidantes pode explicar a maior resistência dos espermatozoides encontrada no presente trabalho no grupo de animais que recebeu a suplementação.

Entre estas enzimas antioxidantes, podem estar glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Esta última enzima é dependente de Zn e Cu (LEWIS & LE SOUTHERN, 2000) Estes minerais foram acrescentados na suplementação dos machos do presente experimento, o que pode explicar a maior viabilidade das amostras de sêmen após descongelação quando os machos foram suplementados.

MARIN-GUZMAN et al. (1997) encontraram aumento da concentração desta enzima no plasma seminal de suínos quando estes foram suplementados com Selênio inorgânico. CEROLINI et al. (2001) demonstraram que amostras de sêmen com alta

viabilidade após a descongelação apresentavam alta atividade da enzima glutathione peroxidase e superóxido dismutase

#### 6.4. Concentração e volume nas amostras de após o processo de eliminação das células somáticas dos ejaculados

Após o processo de purificação, que consistiu em sedimentação e sucessivas centrifugações e remoção de sobrenadante, houve aumento significativo da concentração dos espermatozoides nas amostras ( $p=0,05$ ), porém não houve alteração significativa no volume ( $p=0,34$ ), conforme demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Comparação dos dados de concentração e volume do sedimento nas amostras dos cachaaos antes e depois da suplementação com vitaminas e minerais e dos três que permaneceram como testemunha após a aplicação das vitaminas e minerais, após o processo de eliminação de células somáticas dos ejaculados.

| Tratamentos       | concentração<br>media<br>(sptz/ml) | média<br>volume      |
|-------------------|------------------------------------|----------------------|
| Sem suplementação |                                    |                      |
| Antes             | $2,53 \times 10^6$ <sup>a</sup>    | 1,26 ml <sup>a</sup> |
| Depois            | $2,82 \times 10^6$ <sup>a</sup>    | 0,66 ml <sup>b</sup> |
| Com suplementação |                                    |                      |
| Antes             | $2,82 \times 10^6$ <sup>a</sup>    | 1,43 ml <sup>a</sup> |
| Depois            | $3,01 \times 10^6$ <sup>b</sup>    | 1,08ml <sup>a</sup>  |

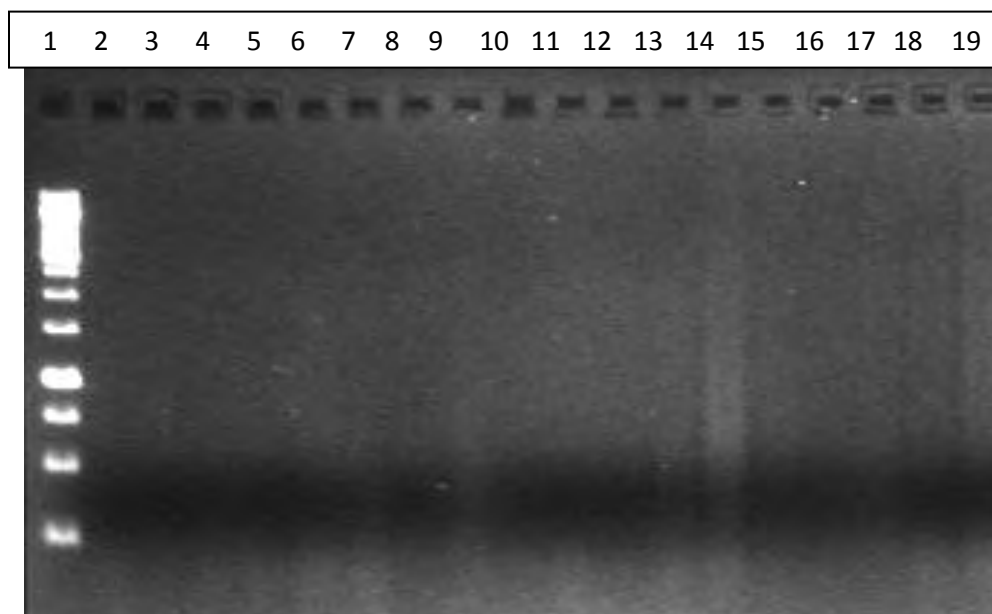
Letras diferentes significam diferença estatística com  $p<0,05$

Não existe na literatura dados sobre as taxas de recuperação de espermatozoides após qualquer processo de purificação utilizado. O método mais encontrado para purificação é em gradiente de “Percoll” ou pela técnica de “swim up”, porém, para espermatozoides de suínos, estas técnicas foram testadas no presente experimento, sem resultados satisfatórios, pois, em sua maioria, os espermatozoides encontravam-se mortos após o processo.

### 6.5. Controle da contaminação das amostras por células somáticas

Para verificar a contaminação das amostras por células somáticas, foi realizado gel de agarose 1%.

Como se verifica na Figura 4, as amostras de RNA dos espermatozoides analisadas pelo gel de agarose normal a 1%, foram devidamente purificadas. A ausência de RNA de ribossomos (rRNA)(BETLACH & ERICKSON, 1976), uma vez que espermatozoides não apresentam ribossomos, conforme demonstrado por OSTERMEIER et al., (2002), quando comparou RNA extraído de amostras de sêmen e fígado. GILBERT et al., (2007) também associa a pureza das amostras extraídas de espermatozoides pelo método Percoll com a ausência de bandas 28 e 18s, que são caracterizadas como RNA ribossômico.



**Figura 4:** Gel de agarose 1% contendo as amostras de RNAs extraídos dos espermatozoides e sangue, sendo 1: marcador molecular de 1kb; 2-19: RNA extraídos dos espermatozoides de cachaaos dos grupos tratado e controle.

Além disso, foram realizadas amplificações com genes marcadores de superfície para células somáticas (e-caderina); células germinativas testiculares (c-kit) e células leucocitárias (CD45). As reações mostraram amplificação para e-caderina e c-kit. A presença destes transcritos nas amostras será discutida posteriormente.

## 6.6. Controle da contaminação por DNA genômico

Para cada conjunto de transcrição reversa foi feita uma amostra controle. Esta amostra contém todos os reagentes utilizados na síntese de cDNA com exceção da enzima MMLV (transcriptase reversa), impossibilitando assim a síntese de cDNA.

Para cada gene sob estudo, foram amplificadas duplicatas das amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA extraído dos espermatozoides. As quantificações abaixo representam a média gerada automaticamente pelo software 7500 System SDS Software Core Application , version 1,3 (Applied Biosystems). Em todos os casos, a normalização (igualar as quantidades de amostras) da expressão gênica deu-se com a utilização do gene de referência para *protamina 1*.

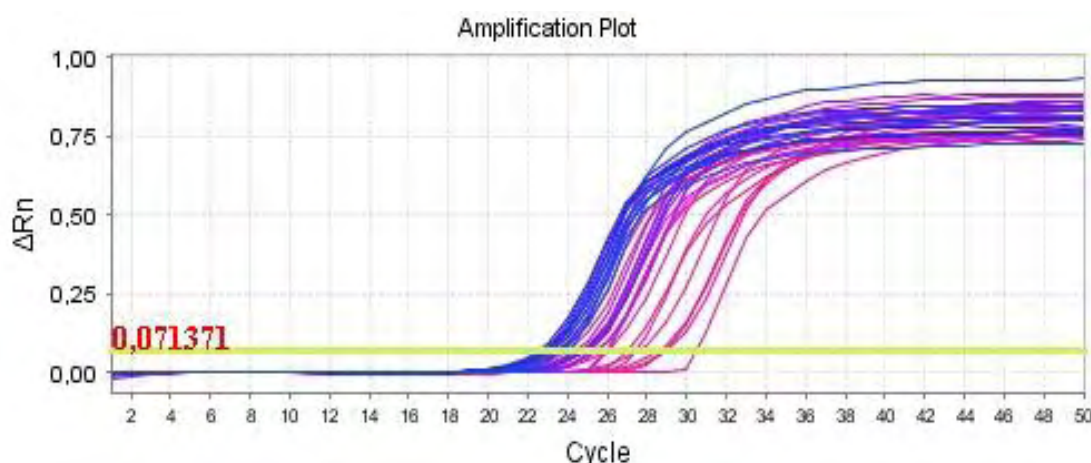
Estas amostras controle foram submetidas a amplificação por PCR, juntamente com as amostras de cDNA. A presença de qualquer produto de amplificação no PCR indica contaminação por DNA genômico. No entanto, quando as amostras de branco foram analisadas por qPCR, método mais sensível de detecção, algumas amostras mostraram contaminação por DNA genômico, na proporção de 16.000 vezes ( $2^{\text{diferença de } C_q}$ ) menor que o RNA para protamina 1 nas amostras, o que permite desconsiderar esta contaminação. As amostras que apresentaram contaminação estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7:** Amostras de RNA, extraídos de espermatozoides de suínos, contaminadas por DNA genômicos e seu respectivo Cq, com a diferença de expressão.

| Amostras com<br>contaminação<br>de gDNA | Cq<br>DNA<br>genômico | Cq<br>protamina | Diferença<br>Cq |
|-----------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 1                                       | 44,6                  | 27,8            | 16,8            |
| 5                                       | 45,6                  | 26,99054        | 18,60946        |
| 7                                       | 45,7                  | 28,78991        | 16,91009        |
| 8                                       | 43,1                  | 28,71393        | 14,38607        |
| 13                                      | 43,4                  | <b>29,87657</b> | <b>13,52343</b> |
| 14                                      | 46,3                  | 31,5395         | 14,7605         |
| 17                                      | 48                    | 28,08876        | 19,91124        |

Segundo BISSONNETTE et al. (2009), quando se faz extração de RNA de espermatozoides por kits, o sistema de membranas de ligação do RNA das colunas não permite a recuperação de quantidade suficiente de RNA devido a pouca quantidade deste contida em cada célula. Devido a isso, costuma-se supersaturar a coluna, predispondo assim a contaminação por DNA genômico, como foi feito no experimento, em que a concentração máxima de células permitida era de  $10^7$  e foi usada concentração de  $2 \times 10^7$ , para permitir a extração de quantidade suficiente de RNA para as análises.

O resultado de amplificação para as placas de amostras de branco e protamina 1 demonstram esta contaminação através da determinação dos Cqs das curvas de amplificação, conforme demonstrado na Figura 5.



**Figura 5:** Curvas de amplificação das duplicatas do gene protamina 1 e das amostras de branco para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides

### 6.7. Genes analisados no qPCR

Para análise da expressão dos genes, foram delineadas curvas de amplificação em qPCR e as curvas da temperatura de melting de cada gene. Nos gráficos de amplificação, a linha reta representa a linha de quantificação, que é definida como o nível de fluorescência no início dos ciclos, normalmente do ciclo 3 ao 15, que

normalmente é um nível de referência da união do fluoróforo SYBR Green as fitas duplas do cDNA construído a partir das amostras de RNA. A curva da amplificação de um gene normalmente responde a uma fase linear em que é caracterizada a linha de quantificação e uma fase exponencial. No início desta fase exponencial, onde a curva de amplificação cruza com a linha de quantificação está o ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Este ponto indica que a intensidade de fluorescência emitida pelos produtos de amplificação dos genes supera a fluorescência emitida na linha de quantificação. Quanto menor o Cq, maior a quantidade de transcritos amplificados para o determinado gene, pois o Cq é proporcional ao número de cópias iniciais de cada gene, portanto, pode ser usado como uma comparação quantitativa entre as amostras.

A temperatura de melting (Tm) representa o ponto em que metade dos fragmentos de cDNA estão desnaturados e não pareados e a outra metade está pareada. Esta temperatura deve ser a mesma para cada uma das amostras de cada gene. Isto significa que existe um produto único de amplificação, ou seja, que os iniciadores só amplificaram na região do gene alvo. A Tm é específica para o fragmento amplificado que se está procurando. Os resultados são obtidos por curvas de dissociação das amostras de cDNA analisadas.

## **6.8. Diferença na expressão dos transcritos**

Como pode ser observado na Tabela 8, segundo teste estatístico do sinal, realizado após a quantificação da diferença de expressão relativa de cada gene, nenhum dos genes estudados apresentou diferenças significativas de expressão quando comparados com suas amostras calibradoras (expressão do gene antes do tratamento com vitaminas e minerais). O gene normalizador das reações foi a protamina 1. Esta normalização garante que se houverem diferenças estas são realmente devidas a diferenças de expressão e não de quantidade de amostras, por exemplo.

A ausência de diferenças de expressão significativas pode ser devido ao pequeno número de amostras, embora este número esteja em concordância com a maioria dos trabalhos que analisam expressão gênica em espermatozoides, que se

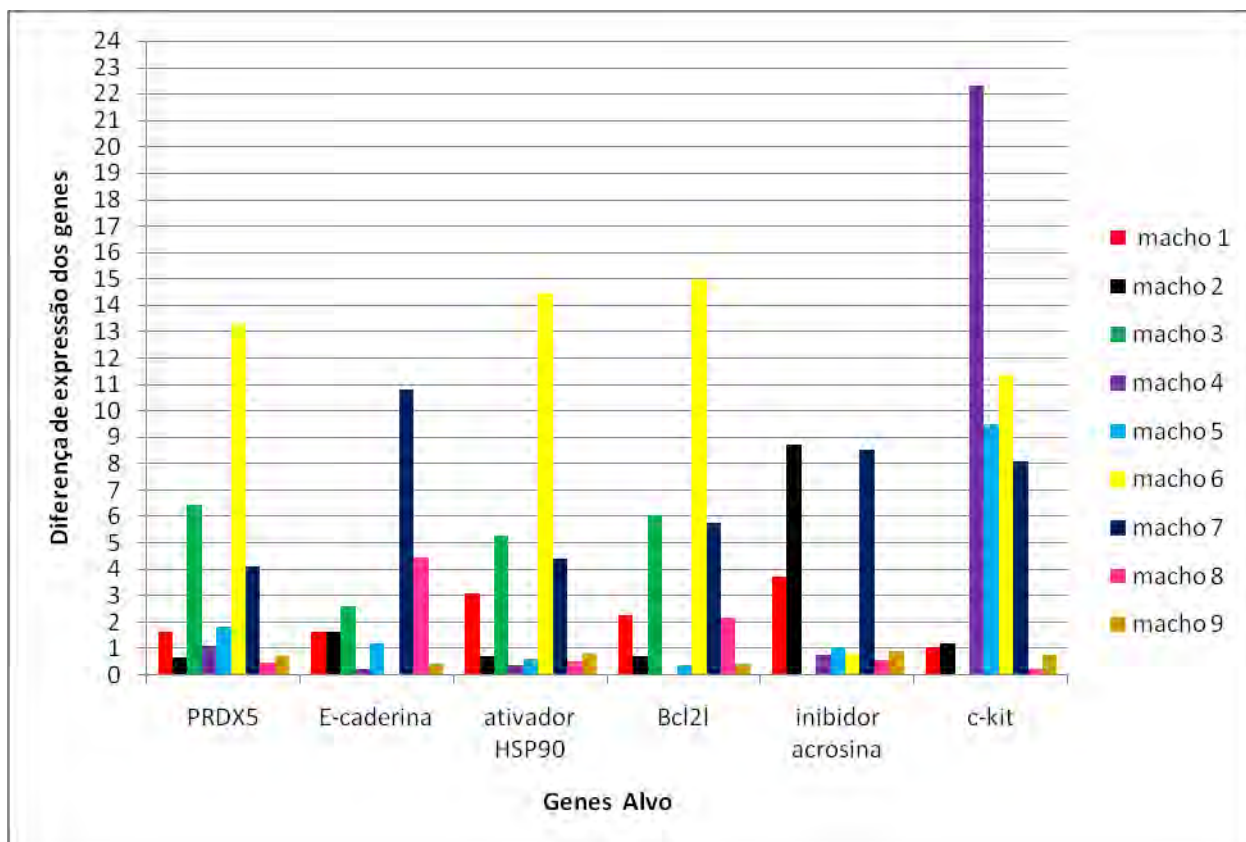
utilizam basicamente de três, cinco, dez ou doze animais ou humanos (OSTERMEYER et al., 2002; OSTERMEYER et al., 2005; GILBERT et al., 2007; RAUBER 2008; LALANCETTE et al., 2008; BISSONNETTE et al., 2009; CASAS et al., 2010;) foi pequeno, mostrando grandes variações entre animais, demonstrado principalmente pelos altos desvios padrão para cada análise.

**Tabela 8:** Diferenças na expressão dos transcritos dos genes estudados, nos machos tratados e não tratados, antes e após os sessenta dias de adaptação as vitaminas e minerais, com relação a análise comparativa de expressão com as amostras calibradoras (antes do tratamento), com suas médias e desvios padrão (DP).

| Tratamentos  |                       | GENES                 |                       |                       |                          |                       |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Com vitamina | <i>PRDX5</i>          | <i>E-caderina</i>     | <i>Ativador HSP90</i> | <i>BCL2L</i>          | <i>Inibidor acrosina</i> | <i>c-kit</i>          |
| Macho 4      | 1,1 (1,06 - 1,14)     | 0,25 (0,23 - 0,26)    | 0,37 (0,36 - 0,38)    | 0,04 (0,04 - 0,04)    | 0,79 (0,77 - 0,81)       | 22,31 (21,85 - 22,78) |
| Macho 5      | 1,86 (1,70 - 2,04)    | 1,20 (1,10 - 1,30)    | 0,65 (0,60 - 0,71)    | 0,41 (0,38 - 0,44)    | 1,05 (0,96 - 1,16)       | 9,49 (8,61 - 10,45)   |
| Macho 6      | 13,32 (12,87 - 13,79) |                       | 14,46 (13,96 - 14,97) | 14,96 (14,45 - 15,49) | 0,84 (0,83 - 0,86)       | 11,34 (10,65 - 12,07) |
| Macho 7      | 4,13 (3,99 - 4,28)    | 10,79 (10,07 - 11,57) | 4,43 (4,28 - 4,59)    | 5,76 (5,61 - 5,93)    | 8,53 (8,24 - 8,83)       | 8,09 (7,87 - 8,32)    |
| Macho 8      | 0,50 (0,46 - 0,53)    | 4,48 (4,57 - 5,11)    | 0,51 (0,47 - 0,55)    | 2,16 (2,0 - 2,33)     | 0,60 (0,55 - 0,65)       | 0,24 (0,22 - 0,26)    |
| Macho 9      | 0,72 (0,71 - 0,73)    | 0,43 (0,43 - 0,44)    | 0,81 (0,78 - 0,83)    | 0,42 (0,39 - 0,45)    | 0,94 (0,92 - 0,95)       | 0,77 (0,74 - 0,81)    |
| MÉDIA        | 3,6                   | 3,5                   | 3,53                  | 3,96                  | 2,12                     | 8,71                  |
| DP           | ±4,9                  | ±4,48                 | ±5,57                 | ±5,8                  | ±3,14                    | ±8,1                  |
| Sem vitamina |                       |                       |                       |                       |                          |                       |
| 1            | 1,65 (1,61 - 1,70)    | 1,67 (1,62 - 1,73)    | 3,09 (2,88 - 3,31)    | 2,27 (1,97 - 2,60)    | 3,71 (3,34 - 4,11)       | 1,05 (0,98 - 1,14)    |
| 2            | 0,68 (0,64 - 0,72)    | 0,65 (0,62 - 0,68)    | 0,71 (0,70 - 0,72)    | 0,72 (0,70 - 0,73)    | 8,74 (8,62 - 8,86)       | 1,20 (1,12 - 1,28)    |
| 3            | 6,47 (6,34 - 6,61)    | 2,60 (2,50 - 2,71)    | 5,29 (5,18 - 5,40)    | 6,04 (5,84 - 6,25)    |                          |                       |
| MÉDIA        | 2,9                   | 1,64                  | 3,03                  | 3,01                  | 6,22                     | 1,13                  |
| DP           | ±3,1                  | ±0,98                 | ±2,29                 | ±2,54                 | ±3,56                    | ±0,1                  |

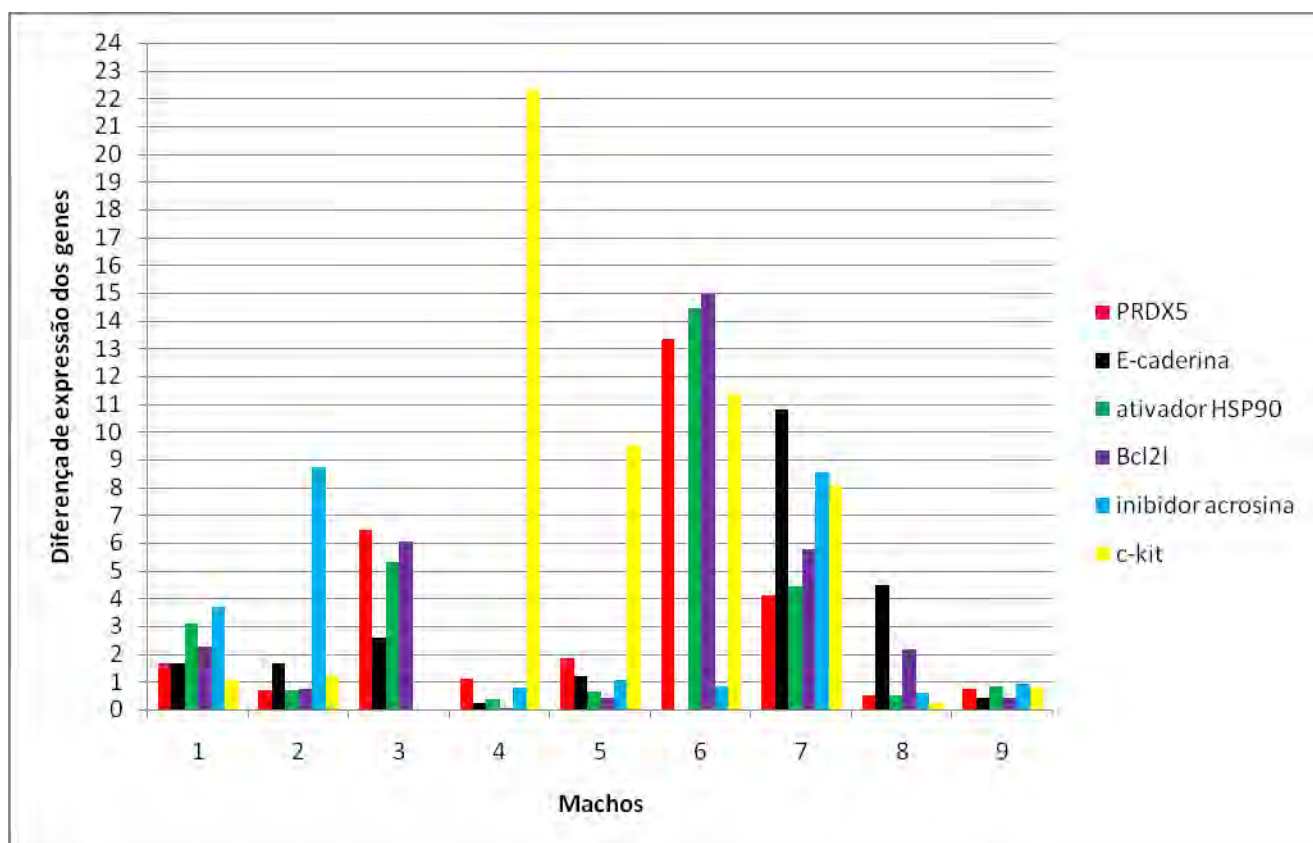
As Figuras 6 e 7 podem elucidar estas diferenças individuais de cada macho para cada gene. Os machos 1,2 e 3 são os que permaneceram sem a aplicação das vitaminas e minerais intramusculares. As grandes diferenças observadas na expressão de cada gene em cada macho podem ser devidas a grande número de fatores, inclusive diferenças no genótipo dos machos. Nem mesmo o intervalo de adaptação mostrou os mesmos padrões de expressão gênica antes e após os sessenta dias,

mostrando que cada ciclo espermático pode ter variações inerentes ao clima, animal, entre outros (fatores epigenéticos).



**Figura 6:** Valores de diferenças de expressão entre os genes alvo e o gene nas amostras calibradoras.

As amostras calibradoras receberam valor estipulado igual a 1 e as diferenças de expressão foram calculadas com base neste valor de referência. Houve uma grande heterogeneidade de expressão entre os genes nas diferentes amostras de cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA espermático, apesar dos cuidados no procedimento de padronização da quantidade de RNA utilizada por amostra. Estes dados são indicativos de que existe grande variação entre resposta dos machos, dados que podem ser confirmados pela Figura 7.



**Figura 7:** Valores de diferenças de expressão entre os genes alvo e o gene nas amostras calibradoras.

Como pode ser observado na figura 5, alguns machos responderam melhor ao tratamento com as vitaminas e minerais, mostrando maior diferença de expressão entre os transcritos como o caso dos machos 6 e 7, que podem ser considerados como bons respondedores no caso de nutrigenômica (FURLAN et al., 2007). CASA et al. (2010), também encontraram diferenças individuais em cada macho testando a presença da proteína de choque térmico. Os autores classificaram os machos como bons congeladores e maus congeladores. Como a seleção de machos não foi realizada com base na fertilidade devido a predominância, até então de monta natural como sistema de acasalamento, é compreensível que exista grande variação, tanto nas características fenotípicas quanto na expressão gênica destes animais (ANTUNES, 2006). Os machos que apresentaram maiores diferenças na expressão dos genes alvos também foram aqueles que apresentaram melhora nas características seminais, como pode ser observado na figura 1. Os machos 6 e 7 também foram os que

apresentaram maior aumento na concentração de espermatozoides por ml de ejaculado após a suplementação intra-muscular com vitaminas e minerais.

#### **6.7.1. E-caderina**

A análise obtida dos dados de PCR em tempo real mostraram amplificação para o gene da e-caderina em todas as amostras de sêmen e de sangue, mostrando que esta não é um bom controle para verificação da contaminação das amostras por células somáticas, em contraste com o encontrado por YANG et al. (2009).

A e-caderina está dentro desta família de moléculas de adesão, que participam na orientação cromossômica pela participação na formação de fusos durante a divisão celular. (MARTHIENS et al., 2010). Elas são abundantes em células epiteliais em mamíferos (LECHLER, et al., 2005). No entanto, DELPRAT et al. (2006), pelo uso da técnica de detecção por anticorpos monoclonais, detectaram a presença desta molécula na região acrossomal de espermatozoides intactos e capacitados, da mesma maneira que MARÍN-BRIGGILER et al. (2008), por análise imunológica também encontraram esta molécula na região acrossomal de espermatozoides humanos, em 75% das células, sugerindo possível papel na interação espermatozoide/oócito. RUFAS et al. (2000) e PUROHIT et al. (2004), também propõem que a e-caderina esteja envolvida com a interação entre gametas, uma vez que os autores também detectaram a presença de e-caderina em espermatozoides humanos. TAKEICHI et al. em 1995 já sugeriam que a interação cálcio dependente entre gametas necessitava da presença de moléculas de adesão. O cálcio intracelular no espermatozoide tem um papel fundamental no processo de capacitação, reação acrossomal, hiperatividade (movimento flagelar típico no sítio de fecundação), motilidade flagelar e a fusão da vesícula acrossomal (TONIOLLI & COMBARNOUS, 1999; SUAREZ & HO, 2003). A membrana plasmática apresenta canais de cálcio voltagem-dependente que iniciam e mantêm o aumento intracelular deste íon na hiperativação (BOOTMAN et al, 2001).

Resultados obtidos no presente trabalho também estão de acordo com os obtidos por CARLOMAGNO et al. (2010). Os autores encontraram níveis de mRNA para e-cadherin em espermatogônias tipo A<sub>s</sub>, A<sub>pr</sub>, A<sub>al</sub>, usando PCR em tempo real. Os

autores testaram um fator de crescimento *in vitro* em espermatogônias e este tratamento influenciou na quantidade de transcritos para e-caderina, concluindo desta forma, que a e-cadherina está envolvida no processo de migração e diferenciação espermatogonial.

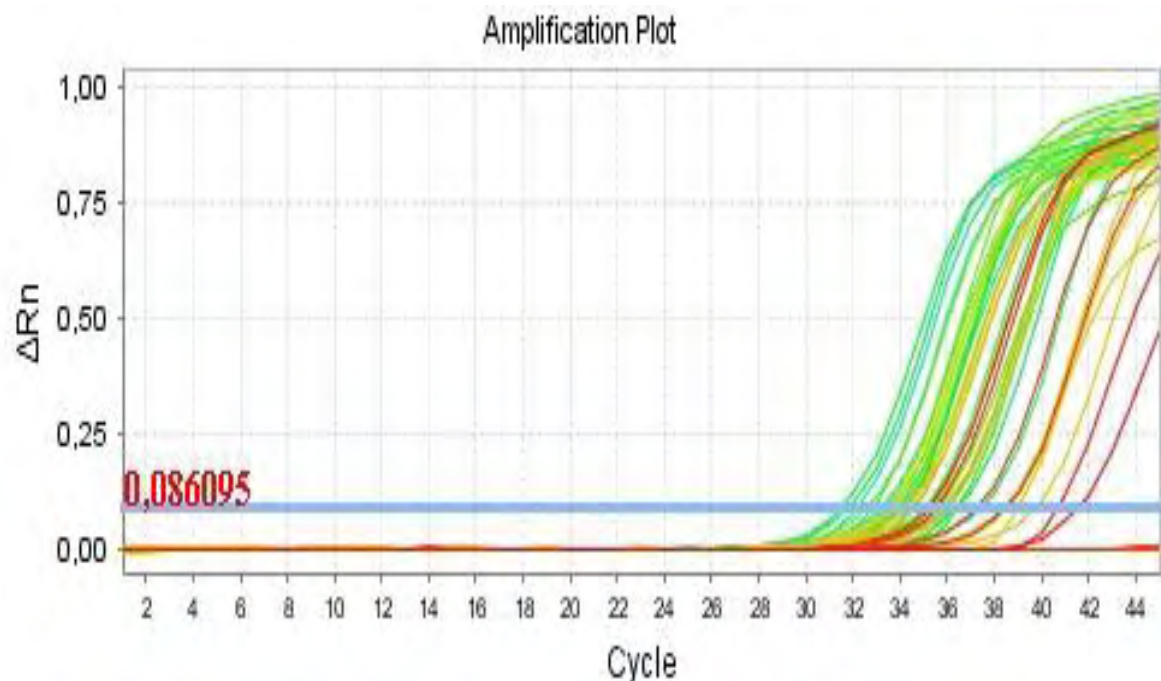
Assumindo que os RNAs presentes no espermatozoide são resquícios do processo de espermatogênese, é esperado que estes transcritos estejam presentes nos espermatozoides maduros. GORIELY et al. (2005), também constataram a expressão de e-caderina no trato reprodutivo e espermatozoides de humanos pelo uso da técnica de detecção por anticorpos monoclonais. LALANCETTE et al. (2008), apesar de terem usado *e-caderina* como controle de contaminação por células epiteliais, também encontraram transcritos para caderina nos espermatozoides de bovinos, mais precisamente a *n-caderina*. GOODWIN et al. (2000), estudando espermatozoides humanos, também encontrou expressão de gene da família das caderinas em suas amostras, a *n-caderina*.

BISSONNETTE et al. (2007), também usaram iniciadores específicos para *e-caderina* (CDH1) em amostras de espermatozoides de bovinos, purificadas por gradiente de Percoll, para verificação de contaminação por células somáticas. Porém, não há relatos da amplificação deste gene nas amostras de sêmen. Porém devido a separação com Percoll não conseguir recuperar o número de células desejado, os autores utilizaram um método de amplificação do RNA. Este método de amplificação pode aumentar a massa de RNA recuperado, mas pode prejudicar a integridade do mesmo. Pode ser devido a esta fato que os autores não encontraram expressão para os genes *Kit* e *e-caderina*.

KANATSU-SHINOHARA et al. (2008) ainda sugerem que a CDH1 ou e-caderina está envolvida na diferenciação das células tronco espermatogoniais. CDH1 tem um domínio extracelular que é responsável pela adesão da e-caderinas nas células vizinhas. O complexo formado por e-cadherin/b-cadherin/a-catenin é capaz de se ligar a actina do citoesqueleto, sendo assim, responsável pela organização do esqueleto, formato celular e motilidade, que processos essenciais na formação do espermatozoide.

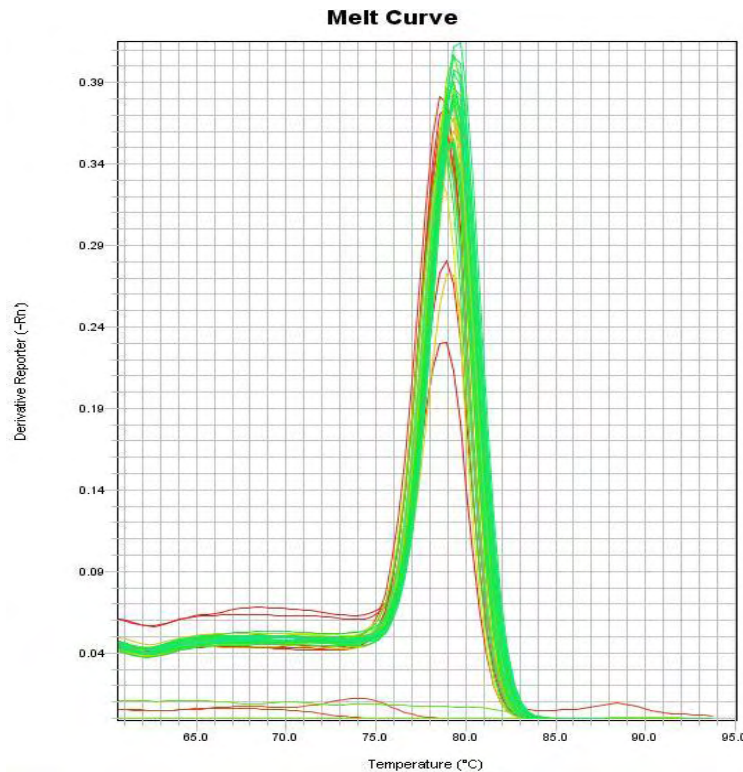
INABA et al. (2010) trabalhando com *Drosophila melanogaster* encontraram envolvimento da e-caderina na formação dos fusos na meiose de células germinativas testiculares.

A Figura 8 corresponde ao gráfico de amplificação do gene nas amostras em duplicata do cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas de espermatozoides de suínos, obtido por qPCR. O ponto onde a curva inicia sua fase de crescimento exponencial e cruza a linha de fluorescência de base é definido como ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Que é uma medida relativa de quando o programa iniciou a detecção do aumento de fluorescência, significando início da amplificação do gene alvo.



**Figura 8:** Curvas de amplificação das duplicatas do gene *e-caderina* para todas as amostras de RNA extraídos de espermatozoides de cachorros.

A Figura 9 representa o ponto de melting ou de desnaturação das cadeias duplas. O pico único significa único produto de amplificação, comprovando a qualidade de amplificação.



**Figura 9:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachaaos, para o gene *e-caderina*

### 6.7.2. *C-kit*

Todas as amostras de sêmen mostraram expressão para o gene *c-kit*, indicando que este gene não é um bom marcador para contaminação dos espermatozoides ejaculados puros por células testiculares, em contraste com o sugerido por YANG et al. (2009).

*C-kit* é um gene da família Kit, que é uma família de receptores de fatores de crescimento com atividade da tirosina kinase, que traduz os sinais de regulação de crescimento através da membrana plasmática (MITHRAPRABHU & LOVELAND, 2009)

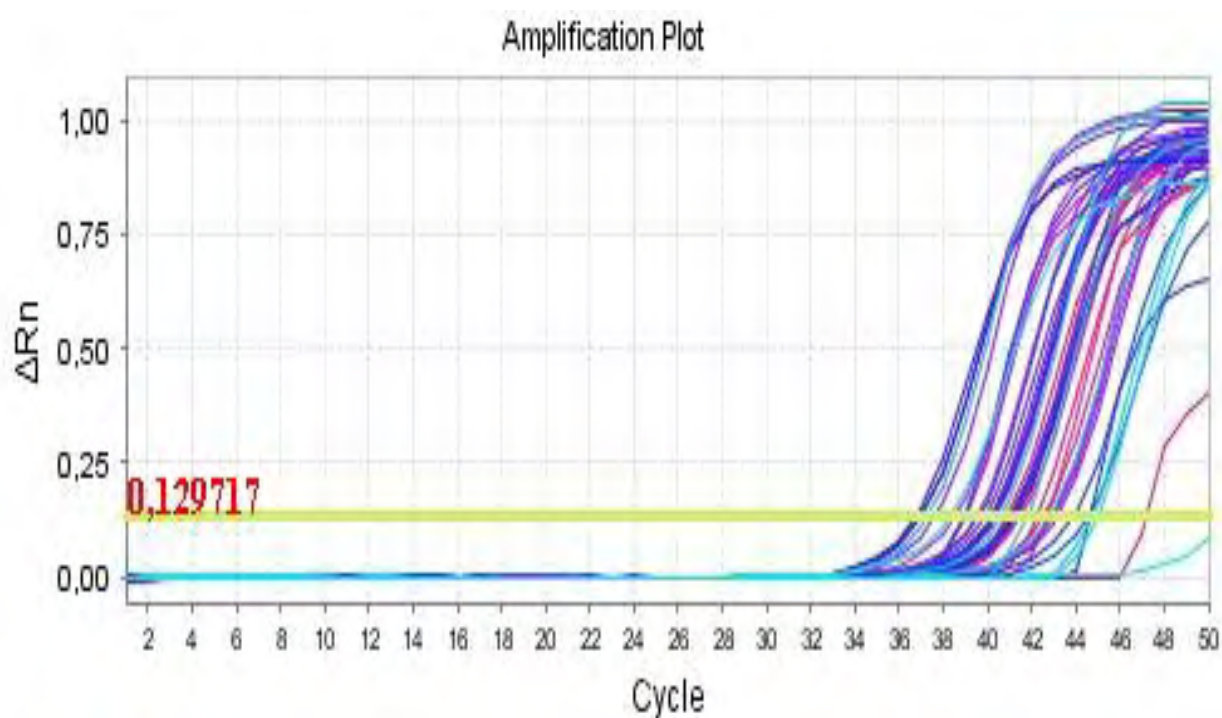
Nas gônadas embrionárias, o receptor da tirosina kinase (*c-kit*) e seu ligante, chamado de fator de célula germinativa (SCF) são essenciais para a sobrevivência e proliferação das células primordiais germinativas. A expressão do receptor kit e a interação com seu ligante kit (*kitL*) é de extrema importância para a proliferação,

migração sobrevivência e maturação das células germinativas nas gonadas embrionárias e pós natais. (WITTE, 1990; DOLCI et al., 1991; OHTA et al., 2000; GUERIF et al., 2002; RUNYAN et al., 2009). A sinalização do c-kit é crítica para a progressão e sobrevivência das células espermatogoniais durante o estágio de paquíteno na fase meiótica da espermatogênese (PACKER et al., 1995; VICENT et al., 1998; YAN et al., 2000). Dois transcritos específicos para *c-kit*, um de 3,5 e outro de 2,3 kb foram descritos em células germinativas haplóides pós meióticas. Mais recentemente, foi demonstrada a expressão do receptor c-kit nos grânulos acrossomais de espermátides circulares e na região acrossomal de espermatozoides em ratos, e humanos (SANDLOW et al., 1997), mostrando que a presença de transcritos de *c-kit* em espermatozoides maduros pode ocorrer, devido a estes RNA serem resquícios do processo de espermatogênese. Os resultados do presente trabalho também encontram embasamento no trabalho de FENG et al. (2010), que encontraram expressão do receptor c-kit em espermatozoides humanos maduros, e correlacionou esta presença com a capacitação e reação acrossomal, dois eventos fundamentais relacionados a fertilidade do indivíduo.

A expressão do *c-kit* é conhecidamente baixa ou ausente em espermatogônias do tipo A<sub>s</sub>, A<sub>pr</sub> e nas fases iniciais de A<sub>al</sub>, portanto, nas fases finais de espermatogônias A<sub>al</sub>, sua expressão é proeminente (SCHRANS-STASSEN et al., 1999). Algumas formas da proteína kit, originadas de transcritos de 2,3 e 3,2kb são sintetizadas unicamente em espermátides (SORRENTINO et al., 1991). TR-kit é o receptor para estas formas, tornando as espermátides independentes da estimulação pela kitL. Esta isoforma da kit pode ser encontrada como forma residual no citoplasma espermático e existem evidências de estar envolvida com a ativação do oócito após a fertilização em ratos (SETTE et al., 1997).

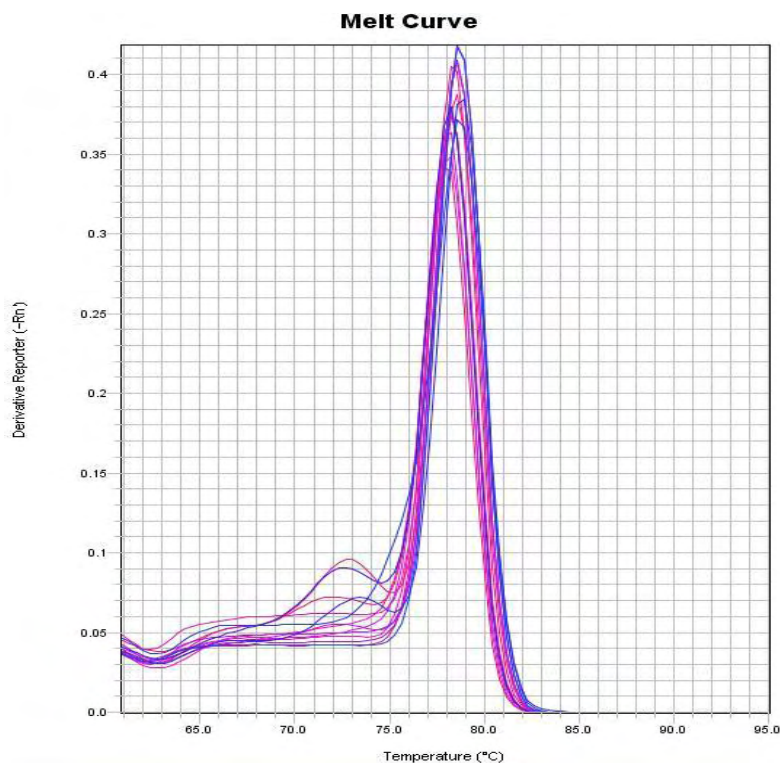
A Figura 10 corresponde ao gráfico de amplificação do gene nas amostras em duplicata do cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas de espermatozoides de suínos, obtido por qPCR. O ponto onde a curva inicia sua fase de crescimento exponencial e cruza a linha de fluorescência de base é definido como ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Que é uma medida relativa de quando o programa

iniciou a detecção do aumento de fluorescência, significando início da amplificação do gene alvo.



**Figura 10:** Curvas de amplificação das duplicatas do gene *c-kit* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachorros.

A Figura 11 representa o ponto de melting. O pico único significa único produto de amplificação, comprovando a qualidade de amplificação.



**Figura 11:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachaaos, para o gene *c-kit*

### 6.7.3. Gene inibidor da acrosina

O gene inibidor da acrosina inibe a liberaaõ pematua da acrosina da liberaaõ da acrosina, que é estocada no acrossoma em sua forma inativa, de proacrosina. A conversão de proacrosina em acrosina ocorre durante a reaçaõ acrossomal (BABA et al., 1989). A maior funçaõ da proacrosina é a alta afinidade de ligaçaõ com os grupamentos sulfato das glicoproteínas da zona pelúcida durante a ligaçaõ secundária do espermatozoide com o óvulo, colaborando desta forma com o trabalho de penetraçaõ na zona pelúcida (GABORIAU et al., 2007). RAUBER (2008), também caracteriza este gene com funçaõ na motilidade espermática.

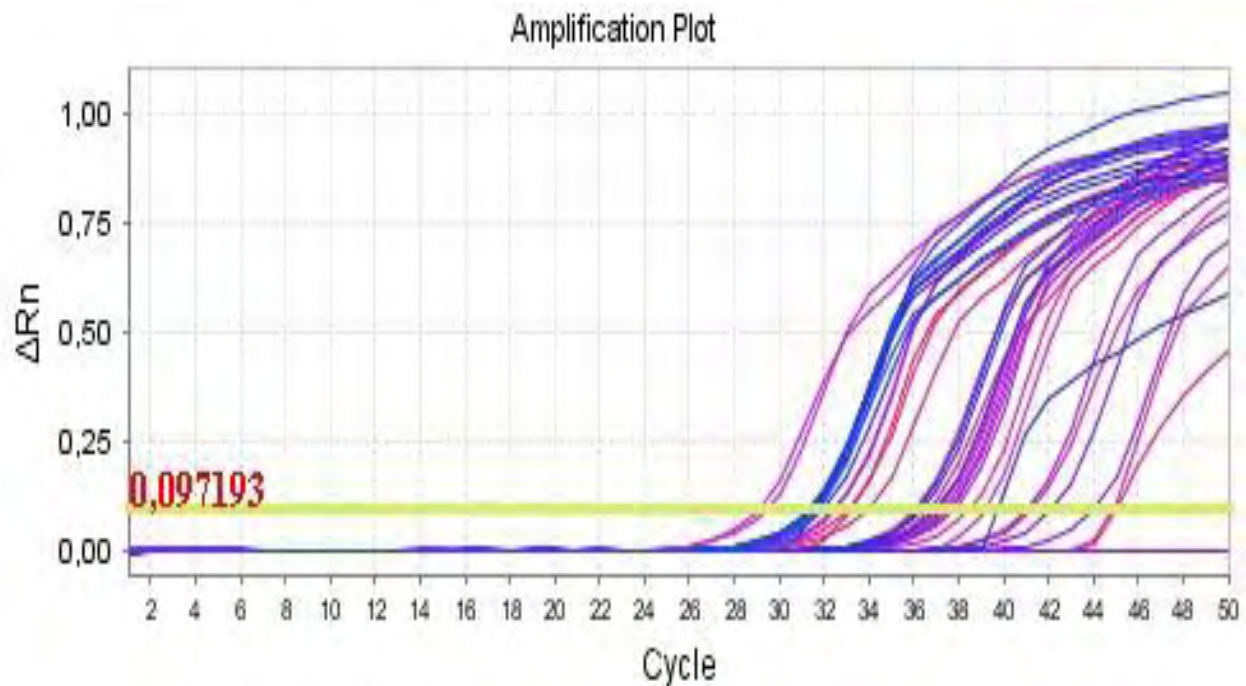
DAVIDOVÁ et al., (2011) encontraram mRNA para inibidores de acrosina no epidídimo, vesículas seminais, próstata, e na cabeça, corpo e cauda do epidídimo. Os autores também encontraram pela técnica de imunoflorescência indireta, o inibidor de

acrosina em espermatozoides contidos no epidídimo, na peça intermediária e flagelo dos espermatozoides. Com base nos resultados, os autores sugeriram que o inibidor de acrosina se liga a superfície espermática do suíno durante a maturação no epidídimo ou ejaculação. SANZ et al. (1992) descreveram a ligação do inibidor de acrosina na região acrossomal da cabeça dos espermatozoides. As moléculas presentes na superfície da membrana que permitem esta adesão são conhecidas como espermiodensinas. Esta ligação permite a proteção do espermatozoide necessária para que possa haver sua interação com o oócito no momento da fecundação, além de participar na reação acrossomal. RAUBER (2008) encontrou quantidades de transcritos para inibidores de acrosina em espermatozoides suínos.

As espermiodensinas são as maiores proteínas encontradas no plasma seminal (BERGERON et al., 2005). Elas são expressas em glândulas vesiculares, epidídimo em suínos, bovinos e cavalos. Tem sido encontradas perifericamente associadas a superfície dos espermatozoides (STREZEK et al., 2005). Transcritos para espermiodensinas também são encontrados em bibliotecas genômicas de cDNA de suínos

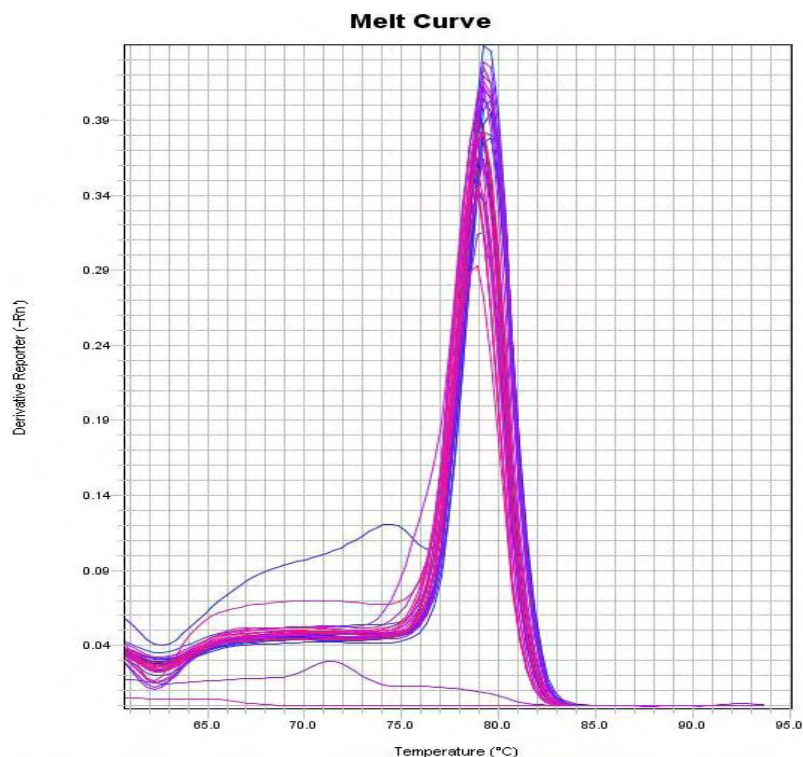
Apesar do aumento da motilidade das amostras encontradas no presente trabalho, este gene pode não ser o candidato a este processo. Outros genes podem estar mais envolvidos.

A Figura 12 corresponde ao gráfico de amplificação do gene nas amostras em duplicata do cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas de espermatozoides de suínos, obtido por qPCR. O ponto onde a curva inicia sua fase de crescimento exponencial e cruza a linha de fluorescência de base é definido como ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Que é uma medida relativa de quando o programa iniciou a detecção do aumento de fluorescência, significando início da amplificação do gene alvo.



**Figura 12:** Curvas de amplificação das duplicatas do *gene inibidor da acrosina* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos.

A figura 13 representa o ponto de melting. O pico único significa único produto de amplificação, comprovando a qualidade de amplificação.



**Figura 13:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachaaos, para o *gene inibidor da acrosina*.

#### **6.7.4. Gene de ativador da HSP90**

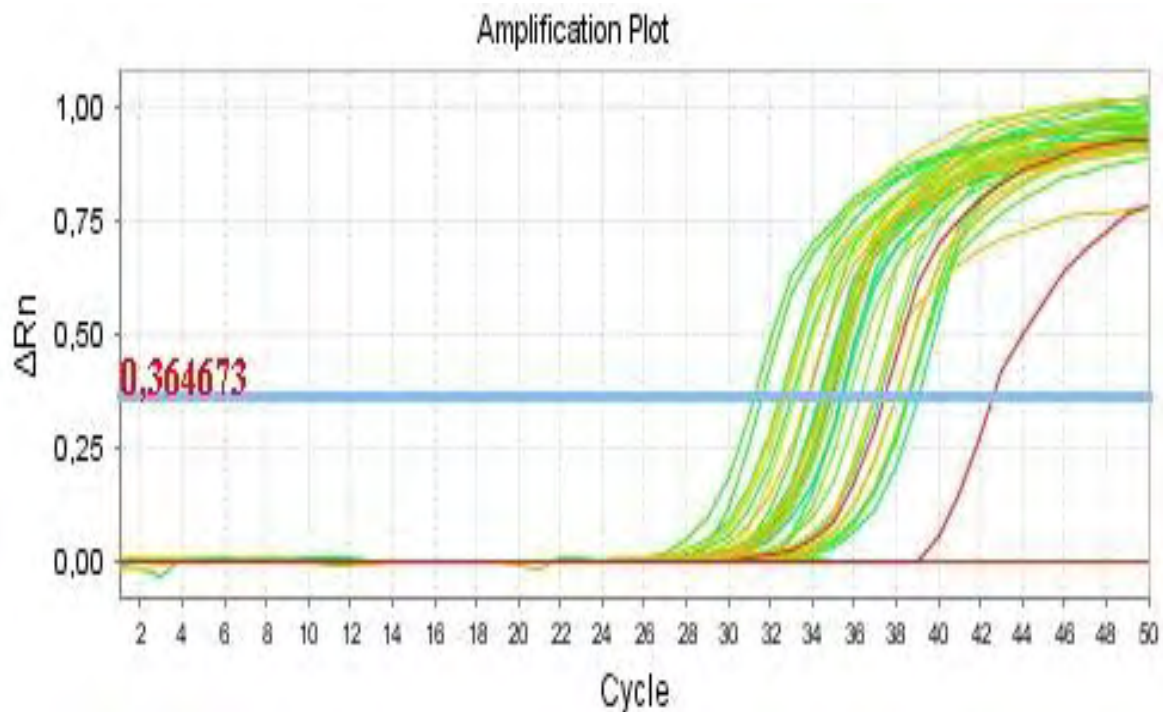
A HSP 90 é um marcador molecular que promove resistência contra estresse oxidativo (FUKUDA et al.1992), e apoptose (POWERS et al 2008) e media a proteção da célula durante estresses térmicos, entre outras funções (HUANG et al., 1999, PEITAO et al., 2005).

Não houve diferença estatística na expressão deste gene nas amostras de sêmen antes e após a suplementação com as vitaminas e minerais. Provavelmente este fato se deve ao fato de que o grupo de machos não foi submetido a diferenças significativas de temperatura ambiente durante o experimento. Após as coleta, mesmo os espermatozoides sendo submetidos a resfriamento, estes não produzem mRNA, que são resquícios do processo de espermatogênese.

CADAVID (2010) também encontraram criotolerância dos espermatozoides quando utilizaram as mesmas vitaminas e minerais injetáveis do presente experimento com fim de congelação do sêmen para uso em inseminação artificial. Porém, a melhora na criotolerância não deve ser devida a expressão do gene HSP 90. Pode ser devida a proteção contra os danos oxidativos proporcionadas pela vitamina E e enzimas dependentes de selênio, cobre e zinco. Ao contrário, YANG et al., (2010) encontrou abundância deste transcrito no sêmen de caçaços coletados durante o verão e não durante o inverno. Como acredita-se que os RNAs espermáticos são resquícios da espermatogênese a diferença de expressão encontrada por YANG et al (2010) pode ser explicada pelo estresse térmico dos machos.

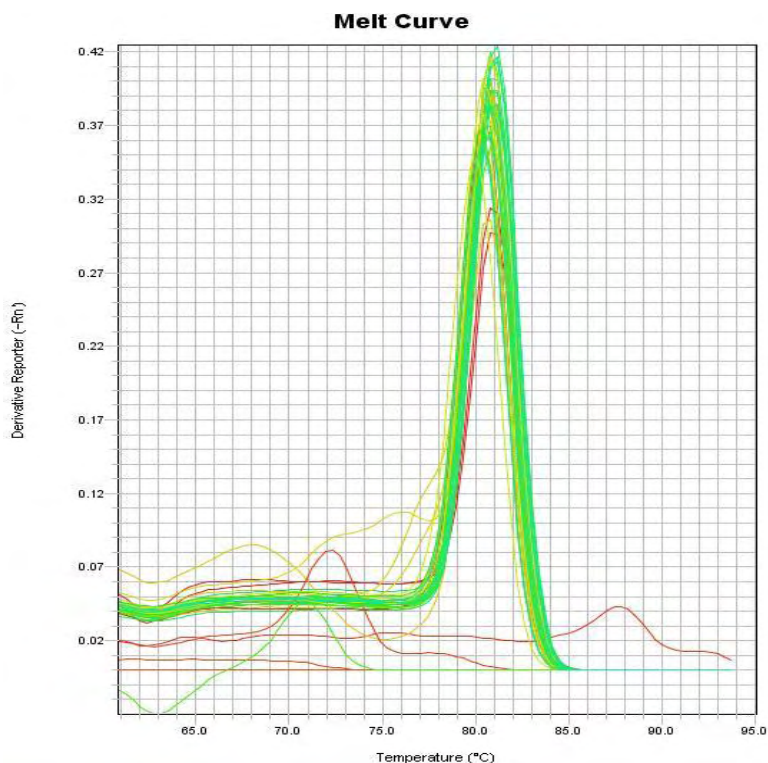
CASAS et al., (2010), encontraram alta concentração da proteína conhecida como proteína de choque térmico 90 (HSP 90) no sêmen dos machos que apresentavam boa congelabilidade, em dois passos do processo de congelação, a 17°C e 5°C. O sêmen de caçaço apresenta grande variação na sua resistência ao processo de congelação (ANTUNES, 2006). Os resultados encontrados por CASAS et al. (2010), para o sêmen refrigerado sugerem que esta proteína pode interferir na futura resposta do espermatozoides ao choque térmico após a congelação. Os autores concluíram que esta proteína pode ser uma marca molecular da capacidade de proteção do espermatozoide contra danos oxidativos e apoptose. Eles também sugerem que esta proteína pode fazer parte do processo de reparação das ligações entre DNA e protaminas. Como o grupo estudado era relativamente homogêneo, não foram observadas diferenças na expressão deste gene.

A Figura 14 corresponde ao gráfico de amplificação do gene nas amostras em duplicata do cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas de espermatozoides de suínos, obtido por qPCR. O ponto onde a curva inicia sua fase de crescimento exponencial e cruza a linha de fluorescência de base é definido como ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Que é uma medida relativa de quando o programa iniciou a detecção do aumento de fluorescência, significando início da amplificação do gene alvo.



**Figura 14:** Curvas de amplificação das duplicatas do *gene ativador da HSP90* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos.

A figura 15 representa o ponto de melting. O pico único significa único produto de amplificação, comprovando a qualidade de amplificação.



**Figura 15:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachorros, para o *gene ativador da HSP90*

#### 6.7.5. *Gene peroxiredoxina 5*

Não houve diferença de expressão do gene PRDX5 entre as amostras calibradoras e gene sob estudo

A peroxiredoxin 5 é uma enzima da família das peroxiredoxinas. Todas as enzimas pertencentes a esta família tem função antioxidante.(O'FLAHERTY & SOUZA, 2011)

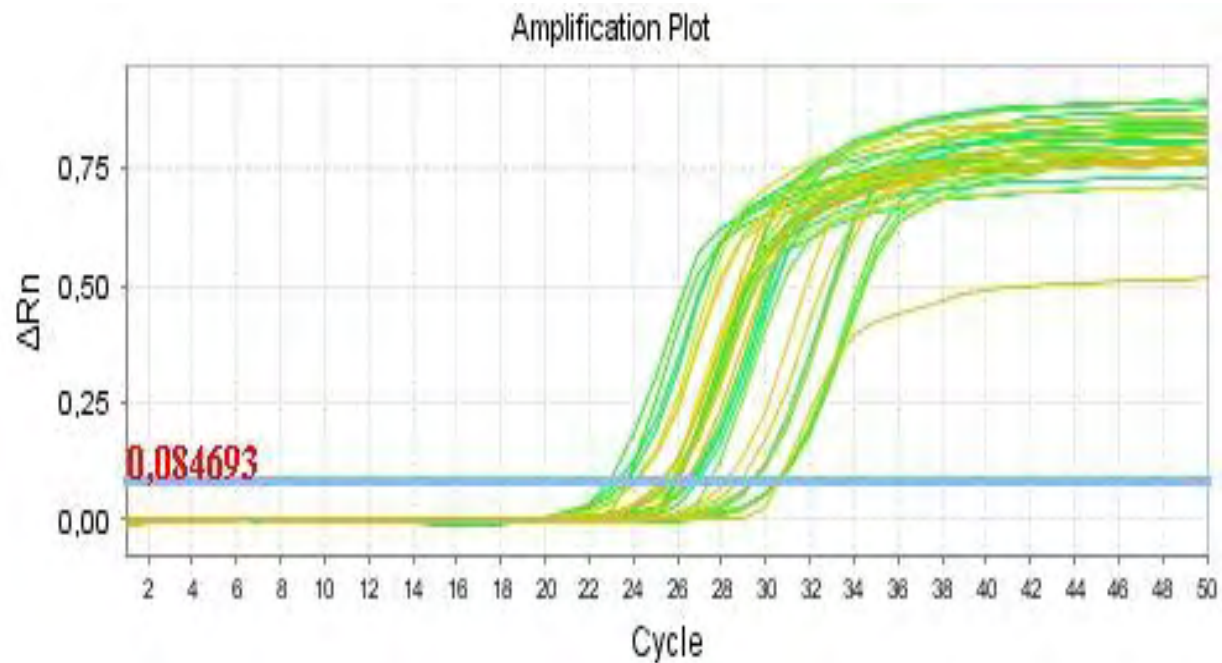
Durante do processo de espermatogênese até a fecundação, existe a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente o peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , produzido principalmente pelas mitocôndrias presente na peça intermediária dos espermatozoides, devido a serem responsáveis pela geração de energia para o processo de locomoção do gameta. Estes ROS podem estar associados com a infertilidade em humanos (ARGAWAL et al., 2006; AITKEN & BAKER, 2006).

Os danos causados pelo ROS podem ser peroxidação da membrana lipídica (STOREY, 1997), fragmentação do DNA e oxidação de bases (AITKEN et al., 1998), diminuição do potencial da membrana mitocondrial (GALLON et al., 2006; KOPPERS et al., 2008) e perda da motilidade e viabilidade (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992). MARIN-GUZMAN et al. (2007) citam que a adição da vitamina E proporcionou aumento significativo de espermatozoides exibindo alta atividade mitocondrial. A mitocôndria é a estrutura do espermatozoide mais sensível ao processo de congelação e descongelação (CUMMINS et al., 1994). Várias enzimas podem estar envolvidas no processo de proteção dos espermatozoides contra os danos produzidos pelos ROS, entre elas, as da família das peroxiredoxinas. Estas enzimas são dependentes de selênio (RHEE et al., 2005; MIRANDA-VIZUETE et al., 2004). Porém, a adição de selênio não alterou a quantidade do transcrito para a PRDX5

O'FLAHERTY & SOUZA (2011) usando imunohistoquímica, caracterizou a PRDX5 na peça intermediária e cabeça dos espermatozoides, concluindo que esta isoforma pode estar envolvida com o controle do efeito dos ROS nas mitocôndrias e núcleo espermáticos. Os autores ainda sugerem que, pela presença na cabeça do espermatozoide, a PRDX5 pode estar envolvida com os eventos de fusão do oócito com espermatozoide.

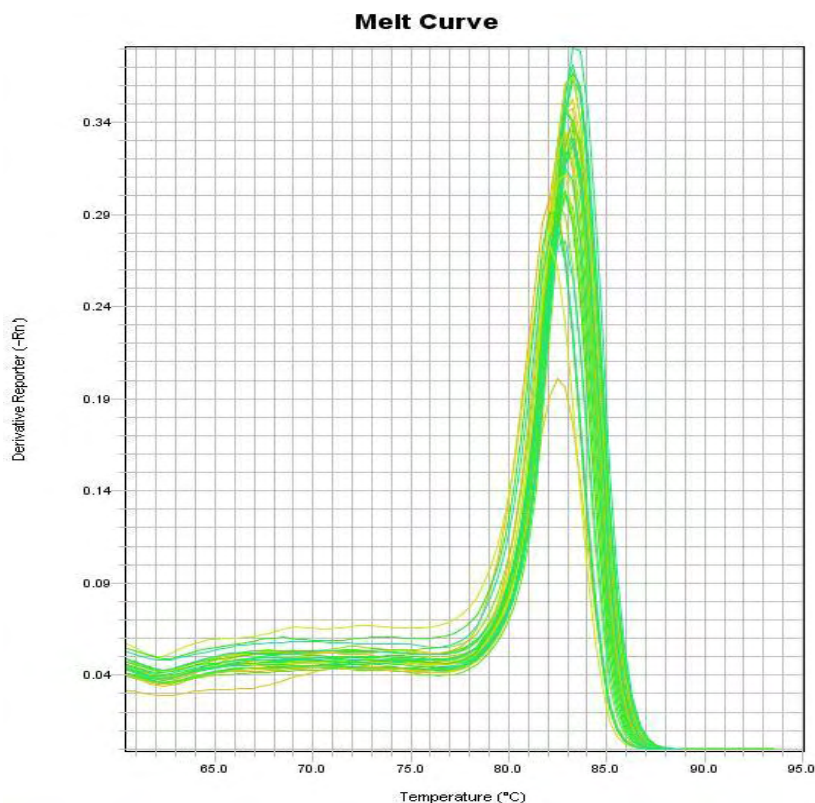
A presença de PRDX5 nas mitocôndrias também foi confirmada por (BANMEYER et al., 2004; KINNULA et al., 2002). RAUBER (2008) encontraram transcritos para o gene PRDX5 nos espermatozoides suínos, e concluíram que podem ser devido ao seu papel como antioxidante celular.

A Figura 16 corresponde ao gráfico de amplificação do gene nas amostras em duplicata do cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas de espermatozoides de suínos, obtido por qPCR. O ponto onde a curva inicia sua fase de crescimento exponencial e cruza a linha de fluorescência de base é definido como ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Que é uma medida relativa de quando o programa iniciou a detecção do aumento de fluorescência, significando início da amplificação do gene alvo.



**Figura 16:** Curvas de amplificação das duplicatas do gene *PRDX5* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachacos.

A Figura 17 representa o ponto de melting. O pico único significa único produto de amplificação, comprovando a qualidade de amplificação.



**Figura 17:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachaaos, para o gene *PRDX5*

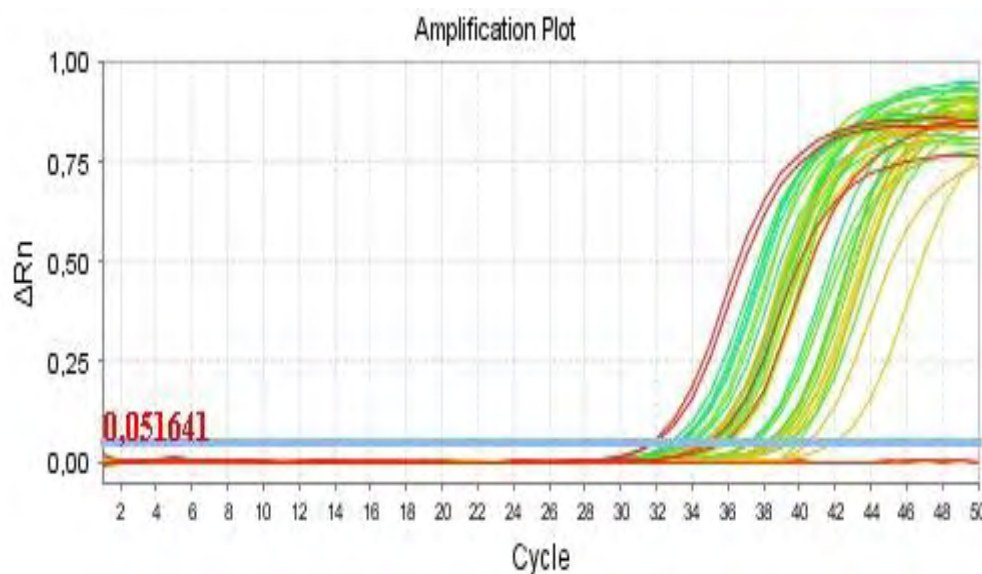
#### 6.7.6. *Bcl-2l*

Não houve expressão diferenciada do gene anti apoptótico *Bcl-2l* nas amostras de espermatozoides antes e após o tratamento com vitaminas e minerais.

Estes resultados não estão de acordo com os obtidos por JEONG et al. (2009) que encontrou maior abundância de transcritos nos espermatozoides do sêmen tratado com 100mM de vitamina E. A vitamina E, em especial, é bastante utilizada em sêmen pois pode proteger os espermatozoides contra danos oxidativo. Esperava-se encontrar aumento da expressão do gene nos animais que receberam a vitamina, pois sendo os RNAs espermáticos resquícios da espermatogênese

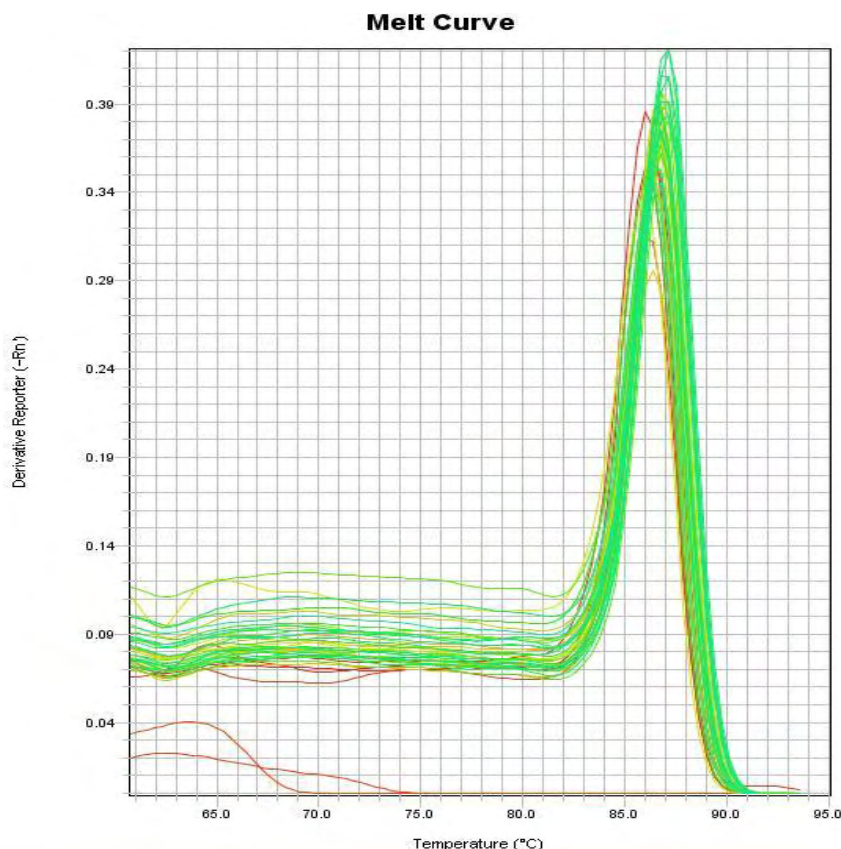
A Figuras 18 corresponde ao gráfico de amplificação do gene nas amostras em duplicata do cDNA sintetizado a partir das amostras de RNA extraídas de

espermatozoides de suínos, obtido por qPCR. O ponto onde a curva inicia sua fase de crescimento exponencial e cruza a linha de fluorescência de base é definido como ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Que é uma medida relativa de quando o programa iniciou a detecção do aumento de fluorescência, significando início da amplificação do gene alvo.



**Figura 18:** Curvas de amplificação das duplicatas do gene *Bcl-2l* para todas as amostras de cDNA, construído a partir do RNA extraídos dos espermatozoides de cachorros.

A figura 19 representa o ponto de melting. O pico único significa único produto de amplificação, comprovando a qualidade de amplificação.



**Figura 19:** Curvas para as temperaturas de melting das amostras de c-DNA produzidas a partir de RNA extraído de espermatozoides de cachorros, para o gene *Bcl-2l*

#### 6.7.8. CD45

As amostras de sêmen purificadas no presente trabalho não mostraram amplificação para os primer marcadores de leucócitos. Estes iniciadores foram testados em amostras de sangue e mostraram amplificação. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que as amostras de espermatozoides não estavam contaminadas com leucócitos.

GILBERT et al. (2007) usou apenas iniciadores específicos para CD4 e CD45 para se certificar da ausência de contaminação por DNA genômico e leucócitos, usando como controle de amplificação folículos pilosos de bovinos.

## **7. CONCLUSÕES**

- A suplementação vitamínico mineral via intramuscular aumentou a concentração de espermatozoides e volume dos ejaculados, além de melhorar a motilidade e resistência após a diluição em BTS na conservação das doses entre 15 e 18°C, porém não alterou a expressão de genes específicos dos espermatozoides de suínos quantificados pela técnica de PCR em tempo Real.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A suplementação vitamínico mineral via intramuscular melhorou as características fenotípicas como concentração, volume e resistência dos ejaculados, porém não alterou a expressão de genes específicos dos espermatozoides de suínos quantificados pela técnica de PCR em tempo Real.

Outros genes podem estar envolvidos com a melhora das características fenotípicas e devem ser pesquisados. Uma alternativa para este estudo seria a análise de transcriptoma dos espermatozoides suínos.

ABCS. **Associação Brasileira dos Criadores de suínos**. Disponível em: [www.abcs.com.br](http://www.abcs.com.br) Acessado em: 20 de Dezembro de 2010.

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LUOGHLIN, K.R.. Relationship of seperm parameter with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **J. Urol**, v.152, p.107-110, 1994.

AGARWAL, A.; RAMADAN, A.; MAHAMED, A.B.. Role of reative oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility** n..79,p.829-843, 2004.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol** , v. 18, p.325–332, 2006.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**. v.40, p. 183-187. 1989.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biol Reprod.**, v.59, p. 1037–1046, 1998.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Mol Cell Endocrinol** v.250, p.66–69, 2006.

ALBERTSON, D.G. Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. **Dev Biology**. v.101, p. 61-72. 1984.

ALMEIDA, F.F.L.; LEAL, M.C.; FRANÇA, L.R..Teste morphometry, duration of espermetogênese and espermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). **Biology of reproduction** v.75, p.792-799,2006

ANTUNES, R.C. Avanços tecnológicos e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno. **Revista Brasileira de reprodução Animal**. V.31, n.1, p.60-63, 2006.

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

AUDET, I.; BERUBÉ, N.; BAILEY, J.L.; LAFOREST, J.P.; QUESNEL, H.; MATTE, J.J.. Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on hormonal profile during ejaculation in the boar. **Theriogenology** v.71, p.334-341, 2009.

AVENDAÑO, C.; FRANCHI, A.; JONES, E.; OEHNINGER, S. Pregnancy-specific  $\beta$ -I-glycoprotein I and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. **Human reproduction**. v. 24, n.2, p. 270-277. 2009.

BABA, T.; KASHIWABARA, S.; WATANABE, K.; ITOH, H.; MICHIKAWA, Y.; KIMURA, K.; TAKADA, M.; FUKAMIZU, A.; ARAI, Y.. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. **Journal of Biology and Chemistry** v.264, p.11920-11927, 1989.

BALHORN, R.; BREWER, L.; CORZETT, M.; COSMAN, J. Protamine-mediated condensation of DNA and the subunit structure of sperm chromatin. **Biology of Reproduction**, v. 60,n.34, p. 757-767. 1999.

BANMEYER, I.; MARCHAND, C.; VERHAEGHE, C.; VUCICI, B.; RESS, J.F.; KNOOPS, B. Overexpression of human peroxiredoxin 5 in subcellular compartments of Chinese hamsters ovary cells: effects on cytotoxicity and DNA damage caused by peroxides. **Free Radic Biol Med**, v.36, p.65-77,2004.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development** v.71,p.461-479, 2005.

BERMEJO-ÁVAREZ, P.; DE DIOS HOURCADE, J.; DE FONSECA, F.R.; GUTIÉRREZ-ÁDAN, A. Long term effects of mouse intratoplasmaic sperm injection with DNA fragmented sperm on health and behaviour of adult offspring. **Biology of Reproduction**, v.78, p.761-772, 2008.

BETLAC, C.J.; ERIKSON, R.P. 28S and 18S ribonucleic acid from mammalian spermatozoa. **Journal Exp. Zool** v.198, p.49-55, 1976.

BILODEUA, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology** v.57, p.1105-1112, 2002.

BINNS, R.M., LICENCE, S.T., WHYTE, A., WILBY, M., ROTHKOTTER, H.J., BACON, M. Genetically determined CD45 variant of value in leukocyte tracing in vivo in pig. **Immunology**, v.86, p. 25-33, 1985.

BISSONNETTE, N.; LÉVESQUE-SERGERIE, J.P.; THIBAUT, C.; BOISSONNEAULT, G.. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality.. **Reproduction** v.138, p.65-80, 2009.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**. v. 68, p. 147-155. 2007.

BOOTMAN, M.P.; COOLLINS, T.J.; PEPPIATT, C.M.; PROTHERO, L.S.; MACKENZIE, L.; SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEYS, S.C.; SEO, J.T.; BERRIDGE, M.J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P.. Calcium signaling: an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.12,p.3-7, 2001.

BREININGER, E; BEORLEGUI, N; O'FLAHERTY, C; BECONI, M.. Alpha tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, p.2126–2135, 2005.

BROWN, D.G.; BURK, R.F.. Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a torula yeast diet. **Journal of Nutrition**, v.102, p.102-108, 1973.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biol. Trace Element Res.** v.47, p.69-74. 1995.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. **Acc.Chem.Res.** n.19, p.194-201, 1986.

CADAVID, V.G. Efeito da suplementação intramuscular de vitaminas e minerais sobre a criopreservação de sêmen de cachorros. **Dissertação de Mestrado** apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, a título de mestrado, 2010

CALVIN, H.I.; COOPER, G.W.. A specific selenopolypeptide associated with the outer membrane of rat sperm mitochondria. In: Facett, D.W.; Bedford, J.M. **The Spermatozoon**, p.135-140, 1979

CARLOMAGNO, G.; VAN BRAGT, M.P.A.; KORVER, C.M.; REPPING, S.; de ROOIJ, D.G.; VAN PELT, M.M. BMP4-Induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line cause changes in its cell adhesion properties. **Biology of Reproduction** v.83, p.742-749, 2010.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; SAID, L.; SAAD, A.; GALERAUD D.I. RNA dynamics of fertile spermatozoa. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, n. 3, p. 634-635. 2007.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTERB, J.; BRIZA, M.; PINARTA, E.; BUSSALLEUA, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GILC, J.E.; BONETA, S.. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology** v.74, p.940–950, 2010.

CEROLINI, S.; MALDJAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R.. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction** v.58, n.(1-2), p.99-111, 2000.

CEROLINI, S.; MALDJAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M.. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction** n.121, p.395-401, 2001.

CHAO, D.T.; KORSMEYER, S.J.. BLC-2 family: regulators of cell death. **Annual Revision Immunology** v.16, p.395-419, 1998.

CHARROW, M.; WRIGHT, W.W. Proteases and protease inhibitors. In:SKINNER MK, GRISWOLD MD (eds) Sertoli cell biology. **Elsevier Academic**, p. 121–152, 2005

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C.. Production of reactive oxygen species by sperm undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction Development** v.59,p.451-458, 2001.

CHIANG, M.H. Detection of human leukocyte antigen class-1 messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility**. v. 61, p. 276-280. 1994.

CHO, C.. Protamine-2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. **Biology of Reproduction**. v. 69, p.211-217. 2003.

CHO, C.; WILLIS, W.D.; GOULDING, E.H.; JUNG-HÁ, H.; CHOI, Y.C.; HECHT, N.B.. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. **Nat. Genet.** v. 28, p. 86-86. 2001.

CLOSE, W.H.. Trace mineral nutrition in pigs revisited: meeting production and environmental objectives. **Rec. Adv. Anim. Nutr**, n.14,p.133-142, 2003.

COOPER, D.R.; KING, O.R.; CARPENTER, M.P. Effect of vitamin E deficiency on serum concentrations of follicle-stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration. **Endocrinology** v.120, p.83-90. 1987.

CROMWELL, G.L.; BAKER, D.H.; EWAN, R.C.; KORNEGAY, E.T.; LEWIS, A.J.; PETTIGREW, J.E.; STEELE N.C.; THACKER P.A. **Nutrient Requirements of swine**: 10th revised Edition. 1998

CUMMINS, J.M. Cytoplasmic inheritance and its implications for animal biotechnology. **Theriogenology**. v.55, p. 1381-1399. 2001.

DADOUNE, J.P.; SIFFROI J.P.; ALFONSI, M.F. Transcription in haploid male germ cells. **International Review of Cytology**. v. 237, p. 1-56. 2004.

DADOUNE, J.P.; PAWLAK, A.; ALFONSI, M.F.; SIFFROI, J.P. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and *in situ* hybridization in human ejaculate spermatozoa, **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p.133-140, 2005.

DAVIDOVÁ, N; JONÁKOVÁ, V; MANÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ, P.. Expression and localization of acrosin inhibitor in boar reproductive tract. **Cell Tissue Res** v.338, p.303-311, 2009.

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

DELPRAT, B.; BIBERT, S.; GEERING, K.. FXYP proteins: novel regulators of Na, K-ATPase. **Med Science** v.22, p.633-638, 2006.

DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G.; STRIEGL, G.; ESTERBAUER, H.. Effects of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. **Journal of Lipid Research**, v.32, p. 1325-1332, 1991.

DOLCI, S.; PELLEGRINI, M.; AGOSTINO, S.; GEREMIA, R.; ROSSI, P.. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. **Journal of Biology and Chemistry** v.276, p.40225-40233, 1991.

EDDY, E. M. Male germ cell gene expression. **The Endocrine Society**. P. 103-128. 2002.

ERASMUS, E.L.; OETTL, E.E.; FRANKEN, D.R.; KRUGER, T.F.; OEHNINGER, S.C.. Analyses of association between reactive oxygen species and sperm quality. **Journal of Andrology**, v.18, p.3, 1992.

ESTIENNE, M.J. Maximizing boar productivity with optimum trace mineral supplementation. symposium "**Redefining Trace Mineral Nutrition: Supplementation strategies for modern diets and genetics**" 2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org>. 2010.

FENG, H.L.; SANDLOW, J.I.; SPARKS, A.E.. Decreased expression of the heat shock protein HSP70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. **Fertility and Sterility** v.76, p.1136-1139, 2001.

FEUGANG, J.M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEYER, G.C.; TOPPER, E.K.; MEMILI, E. Transcriptome analyses of Bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v.21, n.3, p.312-324, 2010.

FLORES, E.; CIFUENTES, D.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; MEDRANO, A.; BONET, S.; BRIZ, M.D.; PINART, E.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E. Freezethawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. **Theriogenology** v.69, n.9, p.1083–94, 2008.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F.L.. Spermatogenesis and sperm transcripts through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Therogenology** v.60, p.300-318, 2005.

FRANCHINI, A.; BERGONZONI, M.L.; MELOTTI, C.; MINELLI, G.. The effects of dietary supplementation with high doses of Vitamin E and C on the quality traits of chicken semen. **Arch. Geflugelk.** v.65,p.76-81, 2001.

FUKUDA, A.; OSAWA, T.; ODA, H.; TANAKA, T.; TOYOKUNI, S.; UCHIDA K..Oxidative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. **Biochem Biophys Res Comm** v.219, n.1, p.76–81,1992.

FUNDERBURKE D.; SHIPP, T.. Sperm, reactive oxygen species (ROS) and anti-oxidants, 2007

FURLAN, L.R.; FERRAZ, A.L.J.; BORTOLOSSI, J.C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.331-341, 2007.

FRITZ, H.; SCHIESSLER, H.; SCHILL, W.B.; TSCHESCHE, H.; HEIMBURGER, N.; WALLNER, O. Low molecular weight proteinase (acrosin) inhibitors from human and boar seminal plasma and spermatozoa and human cervical mucus—isolation, properties and biological aspects. In: Reich E, Rifkin D, Shaw E (eds) **Proteases and biological control**. p.737–766, 1975.

GABORIAU, D.; HOWES,E.A.; CLARK,J.; JONES,R.. Binding of sperm proacrosin/beta-acrosin to zona pellucid glycoproteins is sulfate and stereodependent. Synthesis of a novel fertilization inhibitor. **Dev Biol** v.306, p.647-657, 2007.

GALERAUD-DENNIS, I.; LAMBARD, S.; CARREAU, S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. **Asian J. Androl.** v. 9, n. 5, p. 587-592. 2007.

GALLON, F.; MARCHETTI, C.; JOUY, N.; MARCHETTI, P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. **Fertil Steril.**, v.86, p.1526–1530, 2006.

GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; VERNON, G.P.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Therigenology**. v. 63, p. 283-299. 2005.

GILBERT, I.; BISSONNETTE, N.; BOISSONNEAULT, G.; VALLÉE, M.; ROBET, C. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Society for Reproduction and Fertility**. v. 133, p.1073-1086. 2007.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P.. As Bases Farmacológicas da Terapeutica, 8a. Ed., 1232p., 1991.

GOODWIN, L.O.; Presence of N-cadherin transcripts in mature spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.** v. 6, p. 487-497.2000.

GORIELLY, A.; McVEAN, G.A.; VAN PELT, A.M.; O'ROURKE, A.W.; WALL, S.A.; deROOIJ, D.G.; WILKIE, A.O.. Gain-of-function amino acid substitutions drive positive selection for FGFR2 mutations in human spermatogonia. **Proc.Natl. Acad. Sci** v.102, p.6051-6056, 2005.

GRIMES, S.R.; WOLFE, S.A.; ANDERSON, J.V.; STEIN, G.S.; STEIN, J.L. Structural and Functional Analysis of the Rat Testis-Specific Histone H1t Gene. **J. Cellular Biochem.** v. 44, p.1-17. 1990

GRUNEWALD, S.; PAASCH, U.; ANDEREGG, U.. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. **Andrologia**, v.37, p.69-71, 2005.

GUERIF, F.; CADORET, V.; RAHAL-PEROLA, V.; LANSAC, J.; BERNEX, F.; JACQUES PANTHIER, J.; HOCHEREAU de REVIERS, M.T.; ROYERE, D.. Apoptosis, onset and maintenance of spermatogenesis: evidence for the involvement of kit in kit-haplodeficient mice. **Biology of Reproduction** , v.67, p.70-79, 2002.

HANCOCK, R.E.W.; BENZ R. Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochim. Biophys. Acta** v.860, p.699-707. 1986.

HASTHORPE, S.; BARBIC, S.; FARMER, P.J.; HUTSON, J.M.. Neonatal mouse gonocyte proliferation assayed an in vitro clonogenic method. **Journal of Reproduction and Fertility** v.116, p.335-344, 1999.

HECHT, N.B. Mitochondrial DNA is synthesized during meiosis and spermiogenesis in the mouse. **Exp. Cell Res.** v.154, p. 293- 298. 1984.

HECHT, N.B.. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. **BioEssays** v.20, p.555-561, 1998.

HENMAN, D. Organic mineral supplements in pig nutrition: performance and meat quality, reproduction and environmental responses. In: **Biotechnology in the feed Industry**. P. 297-304, 2001.

HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; FORREST, D.W.. Germ cell apoptosis in the testes of normal satilons. **Teriogenology** v.62, p.283-297, 2004.

HUANG, S.Y.; KUO, Y.H.; LEE, W.C.; TSOU, H.L.; LEE, Y.P.; CHANG, H.L.; WU, J.J.; YANG, P.C. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. **Theriogenology** v.51, n.5, p.1007–16, 1999.

INABA, M.; YUAN, H.; SALZMANN, V.; FULLER, M.T.; YAMASHITA, Y.M.. E-cadherin is required for centromere and spindle orientation in *Drosophila* male germline stem cells. **PLoS Biology** v.5, 2010.

JACYNO, E.; KAWECKA, M.; KAMYCZEK, M.; KOŁODZIEJ, A.; OWSIANNY, J.; DELIKATOR, B. Influence of inorganic SE + vitamin E and organic SE + vitamin E on reproductive performance of young boars. **Agric. Food. Sci. Finland.** v.11, p.175-184. 2002.

JEONG, Y.J.; MI-KYEONG, K.; SONG, H.J.; KANG, E.J.; OCK, S.A.; KUMAR, B.M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J.. Effects of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis genes. **Cryobiology** v.58, p.181-189, 2009.

JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A.. Apparent digestible phosphorus in the feeding of pigs in relation to availability, requirement and environment. 1. Digestible phosphorus in feedstuffs from plant and animal origin. **Neth. J. Agric. Sci.** v.38, p.567-575. 1990.

KANATSU-SHINOHARA, M.; TAKEHASHI, M.; TAKASHIMA, S.; LEE, J.; MORIMOTO, H.; CHUMA, S.; RADUCANU, A.; NAKATSUJI, N.; FASSLER, R.; SHINORARA, T.. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on  $\beta$ 1-integrin. **Cell Stem Cell** v.3, p.533-542, 2008.

KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R.L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiol. Genomics**, v.16, p.166-177, 2004.

KINNULA, V.I.; LEHTONEN, S.; SORMUNEN, R.; KAARTEENAHONEN, R.; KANG, S.W.; RHEE, S. G.; SOINI, Y.. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V and VI in malignant mesothelioma. **Journal of pathology** v.196, p.316-323, 2002.

KLEENE, K.C.. Patterns, mechanisms and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Developmental Biology* 277:16-26, 2003.

KNOOPS, B.; LOUMAYE, E.; VAN DER EECKEN, V.. Evolution of the peroxiredoxins. **Subcell Biochemistry** v.44, p.27-40, 2007.

KOŁODZIEJ, A.; JACYNO, E.. Effect of selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. **Archiv für Tierzucht** v.48, p.68-75. 2005.

KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.93, p.3199–3207, 2008.

KOPINSKI, J. Minerals for pigs. [www.dpi.qld.gov.au/pigs/](http://www.dpi.qld.gov.au/pigs/), DPI&F's national Pig Technotes. 2005.

KUMAR, G.; PATEL, D.; NAZ, R.K. C-Myc Messenger-RNA is present in human sperm cells. **Cell. Mol. Biol. Res.** v. 39, p. 111-117. 1993

LALANCETTE, C.; MILLER, D.; LI, Y.; KRAWETS, S.A.. Paternal contributions: New functional insights for spermatozoa RNA. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.104, p.1570-1579, 2008.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R.; CHOCAT, A.; CARREAU, S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors relationship to sperm motility and capacitation. **Mol. Hum. Reprod.** v.10, p. 535-541. 2004.

LECHLER, T.; FUCHS, E.. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. **Nature** v.437, p.275-280, 2005.

LEWIS, A.J.; LEE SOUTHERN L. Swine Nutrition, second edition. Hardcover. 2000.

LIAO, C.W.; CHYR, S.C.; SHEN, T.F.. The effect of dietary zinc content on reproductive performance of boars. **Proc. Of the Third EAAP Animal Science Congress**, v.2,p.613-615, 1985.

LIMA, F.P.; MURGAS, L.D.S.; OLIVEIRA, S.L.; LIMA, D.; ALVARENGA, A.L.N.; FIALHO, E.T.. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática e atividade da aspartato amino transferase no sêmen resfriado de suínos. **Ciênc. Agrotec.** v.31, n.5,p.1506-1511, 2007.

LIPTRAP, D.O.; MILLER, E.R.; ULLREY, D.E.; WHITENACK, D.L.; SCHOEPKE, B.L.; LUECKE, R.W.. Sex influence on the zinc requirement of developing swine. **Journal Animal. Science**, n.30,p.736-741, 1970.

LIU, C.H., Y.M. CHEN, J.Z. ZHANG, M.Y. HUANG, Q. SU, Z.H. LU, R.X. YIN, G.Z. SHAO, D. FEND; P.L. ZHENG. Preliminary studies on influences of selenium deficiency to the developments of genetical organs and spermatogenesis of infancy boars. **Acta Vet. Zootech. Sin.** V.13, p.73-77. 1982.

LOULIER, K.; LATHIA, J.D.; MARTHIENS, V.; RELUCIO, J.; MUGHAL, M.R.. Beta 1 integrin maintains integrity of embryonic neocortical stem cell niche. **PLoS Biology** v.7, p.100-176, 2010.

MAHAN, D.C.; PARRET, N.A.. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. **Journal of Animal Science**. n.74,p.2967-2974, 1996.

MANOVA, K.; BACHVAROVA, R.F.. Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. **Developmental Biology** v.146, p.312-324, 1991.

MARÍN-BRIGGILER, C.I.; VEIGA, M.F.; MATOS, M.L.; GONZALEZ ECHEVERRIA, M.F.; FURLONG, L.I.; VAZQUEZ-LEVIN, M.H.. Expression of epithelial cadherin in the human male reproductive tract and gametes and evidence of its participation in fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v.14, n.10, p.561-571, 2008.

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; WHITMOYER, R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. **Journal of Animal Science**. v.78, p.1544–1550. 2000.

MARIN-GUZMAN, J.; D.C. MAHAN, Y.K. CHUNG, J.L. PATE; W.F. POPE. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar Performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**. v.75, p.2994-3003. 1997.

MARTHIENS, V.; KAZANIS, I.; MOSS, L.; LONG, K.; FRENCH-CONSTANT, C. Adhesion molecules in the stem cell niche – more than just staying in shape? **Journal of Cell Science**, v.123, p.1613-1622, 2010.

MASON, K.E. Minimal requirements of male and female rats for vitamin E. **American Journal of Physiology**. v.131, p.268, 1940.

MASON, K.E.; S.I. MANER. Reversible testis damage in the vitamin E deficient hamster. **Anat. Rec.** v.127, p.329 (Abstr.). 1957.

MILLER, D.; BRIGGS, D.; SNOWDEN, H.; HAMLINGTON, J.; ROLLINSON, S.; LILFORD, R.; KRAWETZ, S.K. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. **Gene**. v.237, p.385-392. 1999.

MILLER, D.; OSTERMEIER, G.C. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. **Human Reproduction Update**. v. 12, n. 6, p. 757-767. 2006.

MILLER, D.; TANG, P.Z.; SKINNER, C.; LILFORD, R. Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoa gene expression. **Human Reproduction**. v. 9, p.864-869. 1994.

MILLER, D.; OSTERMEIER G.C.; KRAWETZ S.A. The controversy, potential and roles of spermatozoa RNA. **Trends in Molecular Medicine**. v. 11. n.4, p.156-163, 2005..

MIRANDA-VIZUETE, A.; SADEK, C.M.; JIMENEZ, A.; KRAUSE, W.J.; SUTOVSKY, P.; OKO, R. The mammalian testis-specific thioredoxin system. **Antioxid Redox Signal** v.6. n.31, p.25–40, 2004.

MITHRAPRABHU, S; LOVELAND, K.L.. Control of KIT signaling in male germ cells: what can we learn from other systems. **Reproduction** v.138, p.743-757, 2009.

MOLDENHAUER, J.S.; OSTERMEIER, G.C.; JONHSON, A.; DIAMOND, M.P.; KRAWETZ, S.A. Diagnosing male factor infertility using microarrays. **J. Androl. Vol.** v.24, p.783-789. 2003.

MULLAN, B.; HERNANDEZ, A.; D'SOUZA, D.; PLUSKE, J.. Modern pig nutrition for performance: minerals, metabolism and the environment. **The Modern Pig Industry**, 2006.

NEILL, D.J.. **Physiology of reproduction** Vol 1, 3<sup>a</sup>. Edição, 2006.

O'FLAHERTY, C.; SOUZA, A.R.. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. **Biology of Reproduction**, v.84, p.238-247, 2011.

OHTA, H.; YOMOGIDA, K.; DOHMAE, K.; NISHIMUNE, Y.. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cell: role of c-kit and its ligand SCF. **Development** v.127, p. 2125-2131, 2000.

ORR-URTREGER, A.; AVIVI, A.; ZIMMER, Y.; GIVOL, D.; YARDEN, Y.; LONAI, P.. development expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. **Development** v.109, p.911-923, 1990.

OSTERMEIER, G.C.; GOODRICH, R.J.; DIAMOND, M.P.; DIX, D.J.; KRAWETZ, S.A. Toward using stable spermatozoa RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. **Fertility and Sterility**. v. 83, n. 6, p. 1687-1694, 2005.

OSTERMEIER, G.C.; DAVID, J.D.; MILLER, D.; KHATRI, P.; KRAWETZ, S.A.. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **Mechanisms of Disease** v.360, p.772-776, 2002.

PACKER, A.I.; BESMER, P.; BACHAVAROVA, R.F.. Kit ligand metdiates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. **Molecular Reproduction and Development** v.42, p.303-310, 1995.

PEITAO, W.; ZHIQUAN, S.; LIQUN, H.; XIANGDONG, C.; YUZHEN, W.; DAYONG, G. The pertinence of expression of Heat Shock Proteins (HSPs) to the efficacy of cryopreservation in HELAs. **CryoLetters** v.26, n.1, p.7–16, 2005.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, R.H.. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of ejaculate. **Anim. Reprod. Sci.** n.78,p.85-98, 2004.

PESSOT, C.A.; BRITO, M.; FIGEROA, J.; CONCHA, I.I.; YANEZ, A.; BURZIO, L.O. Presence of RNA in the sperm nucleus. **Biochem, biophys. Re Commun.** v.158, p.272-278, 1989.

POWERS, M.V.; CLARKE, P.A.; WORKMAN, P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90AA1 function and induces tumorspecific apoptosis. **Cancer Cell** v.14, n.3, p.250-262, 2008

PRABHU, S.M.; MEISTRICH, M.I.; McLAUGHLIN, E.A.; ROMAN, S.D.; WARNE, S.; MENDIS, S.; ITMAN, C.; LOVELAND, K.L.. Expression of c-kit receptor mRNA and protein in the developing, adult and irradiated rodent testis. **Reproduction** v.131, p.489-499, 2006.

PUROHIT, S.; BRAHMARAJU, M.; PALTA, A.; SHUKLA, S.; LALORAYA, M.; KUMAR, P.G. Impaired E-cadherin expression in human spermatozoa in a male factor infertility subset signifies E-cadherin-mediated adhesion mechanisms operative in sperm–oolemma interactions. **Biochem Biophys Res Commun**, v.316, p.903–909, 2004.

RAUBER, L.P. Qualitative and quantitative analyses of porcine sperm transcripts and caharaterization of a normalised cDNA library. **Thesis for the title doctor in veterinary medicine**, Faculty of veterinary Medicine Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen. Munich, 2008.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radic Biol Med** v.38, p.1543–1552, 2005.

RUFAS, O.; FISCH, B.; ZIV, S.; SHALGI, R. Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. **Mol Hum Reprod**, v.6, p.163–169, 2000.

RUNYAN, C.; SCHAIBLE, K.; MOLYNEAUX, K.; WANG, Z.; LEVIN, L.; WYLIE, C.. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. **Development** v.133, p.4861-4869, 2009.

SANDLOW, J. I.; FENG, H. L.; SANDRA, A. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and spermatozoa. **Urology**, v.49, p.494, 1997

SANZ, L.; CALVETE, J.J.; JONÁKOVÁ, V.; TOPFER-PETERSEN, E.. Boar spermadhesins AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor proteins. **FEBS Lett** v.300, p.63-65, 1992.

SCHILL, W.B.; HEIMBURGER, N.; SCHIESSLER, H.; STOLLA, R.; FRITZ, H. Reversible attachment and localization of the acid-stable seminal plasma acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescent staining technique. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v.356, p.1473–1476, 1975.

SCHRANS-STASSEN, B.H.; Van de KANT, H.J.; de ROOIJ, D.G.; Van PELT, A.M.. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. **Endocrinology** v.149, p.5894-5900, 1999.

SEGERSON, E.C., W.R. GETZ, AND B.H. JOHNSON. Selenium and reproductive function in boars fed allow selenium diet. **Journal of Animal Science** v.53, p.1360-1367. 1981.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, 2a edition. 2002

SETTE, C.; BEVILACQUA, A.; BIANCHINI, A.; MANGIA, F.; GEREMIA, R.; ROSSI, P.. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. **Development** v.124, p.2267-2274, 1997.

SLAWETA, R.; WASOWICZ, W.; LASKOWSKA, T. Selenium content, glutathione peroxidase activity and lipid peroxide level in fresh bull semen and its relationship to motility of spermatozoa after freezing-thawing. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.35, p.455-460, 1988.

SORRENTINO, V.; GIORGI, M.; GEREMIA, R.; BESMER, P.; ROSSI, P.. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. **Oncogene** v.6, p.149-151, 1991.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W.; KUKLINSKA, M.; MOGIELNICKA, M.; SOLIWODA, D.; FRASER, L.. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology** v.5, n.3, p.279-290, 2005.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Mol Hum Reprod** , v.3, p. 203–213, 1997.

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

SUAREZ, S.S.; HO, H.C.. Hyperactivation of mammalian sperm. **Cellular and Molecular Biology**. v.49, n.3,p.351-356, 2003.

TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Curr Opin Cell Biol.**, v.7, p.619–627, 1995.

THOMAS ED. Frontiers in bone marrow transplantation. **Blood Cells** v.17, n. 2, p.259-267, 1991.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNER, E.. The effects of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology** n.70,p.233-240, 2008

UHRIN, P.; DEWERCHIN, M.; HILPERT, M.; CHRENEK, P.; SCHÖFER, C.; ZECHMEISTER-MACHHART, M.; KRÖNKE, G.; VALES, A.; CARMELIET, P.; BINDER, B.R.; GEIGER, M. Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. **J Clin Invest.**, v.106, p.1531–1539, 2000.

TONIOLLI, R.; COMBARNOUS, Y.. Adição de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) ao diluidor do sêmen do reprodutor: efeito sobre a motilidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23,n.1,p.33-40, 1999.

VAUX, D.L.; WEISSMAN, I.L.; KIM, S.K.. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2. **Science** v.258, p.1955-1957, 1992.

VESTWEBER, D.; KEMLER, R. Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. **Exp Cell Res** v.152, p.169-78, 1984

VICENT, S.; SEGRETAIN, D.; NISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, S.I.; SAGE, J.; CUZIN, F.; RASSOULZADEGAN, M.. Stage-specific expression of kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a kit-KL interaction critical for meiosis. **Development** v.125, p.4585-4593, 1998.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P.. Do sperm cell age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 9, p.321-331, 1997

WANG, H.; ZHOU, Z.; XU, M.; LI, J.; XIAO, J.; XU, Z.Y. A spermatogenesis related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. **J Mol. Med.** v. 82, p.317-324. 2004.

WEGGER, I.; PALLUDAN, B.. Zinc metabolism in swine wit special emphasis on reproduction. In trance element metabolism in man and animals. In: **Swine nutrition** 2o. edition, 1977.

WITTE, O.N.. Stell locus defines new miltipotent growth factor. **Cell** v.63, p.5-6, 1990.

WYKES, S.M.; VISSCHER, D.W.; KRAWETZ S.A. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.** v. 3, p.15-19. 1997.

YAN, W.; SUOMINEN, J.; TOPPARI, J.. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. **Journal of Cell Science** v.113, p.161-168, 2000.

YANG, C.C.; LIN, Y.S.; HSU, C.C.; WU, S.C.; LIN, E.C.; CHENG, W.T.K.. Identification and sequencing of remnant Messenger RNAs found in domestic swine (*Sus scrofa*) fresh ejaculated spermatozoa. **Animal Reproduction Science** v.113, p.143-155, 2009.

YANG, C.C.; LIN, Y.S.; HSU, C.C.; TSAI, M.H.; WU, S.C.; CHENG, W.T.K.. Seasonal effect on sperm Messenger RNA profile of domestic swine (*Sus scrofa*). **Animal Reproduction Science** v.119, p.76-84, 2010.

YOSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I.. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on sêmen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reprod Sci.** v.76, p.99-111, 2003.

YOSHIDA, C.; TAKEICHI, M. Teratocarcinoma cell adhesion:identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. **Cell** v.28, p.217-24; 1982.

ZUCKERMANN, F.A.; PEAVEY, C.; SCHNITZLEIN, W.M.; SCHABACKER, D.; YANG, H.; SAALMULLER, A.; LUNNEY, J.K. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD44: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.60, n.3-4,p.375–392, 1998.