

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL - EQUINOS**

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DISULFETO ISOMERASE A1 (PDIA1) COMO
MARCADOR PARA A QUALIDADE SEMINAL EM GARANHÕES**

Liana de Salles van der Linden

Porto Alegre

2017

Liana de Salles van der Linden

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DISULFETO ISOMERASE A1 (PDIA1) COMO
MARCADOR PARA A QUALIDADE SEMINAL EM GARANHÕES**

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Animal na área
de Reprodução Animal

Orientadora: Profa. Dra. Adriana
Pires Neves

Co-Orientador Prof. Dr. Ivan Cunha
Bustamante Filho

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

de Salles van der Linden, Liana
AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DISULFETO ISOMERASE A1
(PDIA1) COMO MARCADOR PARA A QUALIDADE SEMINAL EM
GARANHÕES / Liana de Salles van der Linden. -- 2017.
86 f.

Orientadora: Adriana Pires Neves.

Coorientador: Ivan Cunha Bustamante-Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Epididimo. 2. fertilidade . 3. equino. 4.
proteína. 5. PDI. I. Pires Neves, Adriana, orient.
II. Cunha Bustamante-Filho, Ivan, coorient. III.
Título.

Liana de Salles van der Linden

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DISULFETO ISOMERASE A1 (PDIA1) COMO
MARCADOR PARA A QUALIDADE SEMINAL EM GARANHÕES**

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Animal na área
de Reprodução Animal

Orientadora: Profa. Dra. Adriana
Pires Neves

Co-Orientador Prof. Dr. Ivan Cunha
Bustamante Filho

Tese de Doutorado defendida e aprovado em: 23 de outubro de 2017. Banca
examinadora:

Profa. Dra. Adriana Pires Neves (Orientadora)
UNIPAMPA – PPG em Medicina Animal – Equinos (UFRGS)

Prof. Dra. Magda Jochims Vieira
URCAMP – Campus Alegrete

Prof. Dr. Eduardo Malshitzky
ULBRA

Dra. Adriana Tarouco
Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA)/SEAPI

Dedico

Aos meus pais Rosa e Júlio pela dedicação, pelo apoio,
pelo carinho, pela vida, por tudo;
Ao meu noivo Fabrício pelo companheirismo, amor e carinho;
Aos meus filhos Martin e Gabriel por todo este amor;
Aos meus irmãos Gabriela, Leo e Clarice por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram a chegar até aqui.

À Profa. Dra Adriana Pires Neves, minha orientadora, que há tantos anos me apóia e confia no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio, e por disponibilizar esta equipe nota 10 para a realização desta pesquisa.

Ao grupo de bolsistas do Laboratório de Biotecnologia da UNIVATES Luise Marcon Tomé, Tayná Nauê Lopes e Anna Flávia Tischerda Silva e a Doutoranda Ana Binato de Souza que não mediram esforços para este trabalho ser desenvolvido.

Aos meus estagiários Jordana, Jeissy, Ronaldo, Denner, Fabricio e Bruna por toda a ajuda nos procedimentos de campo.

Aos proprietários dos animais, por abrirem as portas de suas Cabanhas para nossa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

The Horse's Prayer (*unknown*)

Feed me, water and care for me, and when the day's
work is done, provide me with
a shelter, a clean dry stall large enough for me to lie
down in comfort.

Talk to me, your voice often means as much to me as
the reins. Pet me sometimes that I may serve you
more gladly and learn to love you. Shoe me properly
that I may serve you in comfort. Never strike, beat or
kick me when I don't understand what you want, but
give me the chance to understand you.

And finally oh master, when my youthful strength is
gone do not turn me out to starve or freeze, or sell me
to some cruel owner to be slowly tortured or stoned to
death, but do thou, my master take my life in the
kindest way, and your God will reward you here and
hereafter.

You will not consider me irreverent if I ask this in the
name of Him who was born in a stable.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DISULFETO ISOMERASE A1 (PDIA1) COMO MARCADOR PARA A QUALIDADE SEMINAL EM GANHÕES

Tese de Doutorado

Autor: Liana de Salles van der Linden

Orientador: Adriana Pires Neves

Co-Orientador: Ivan Cunha Bustamante Filho

O período de puberdade, em equinos, define-se pela aparição de espermatozoides maduros no ejaculado de animais jovens, bem como a maturação das funções endócrinas. Os espermatozoides precisam passar por um processo de maturação no epidídimo. Para se obter marcadores moleculares que permitam estabelecer a fertilidade de um ganhão, é necessário um melhor conhecimento das proteínas presentes em espermatozoides imaturos e maduros, uma das quais é a PDI (proteína dissulfeto-isomerase). A PDI foi descrita também como importante marcador de fertilidade no plasma seminal e espermatozoides de diversas espécies. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença da PDI no epidídimo equino durante a puberdade, e quantificá-la no fluido e espermatozoides epididimários. Visou verificar a presença da PDI no plasma seminal e espermatozoides ejaculados, em ganhões férteis e subférteis. Foram realizados dois experimentos: **Experimento 1:** utilizou-se 22 equinos Crioulos saudáveis, castrados e divididos em três grupos: G1: potros até 24 meses, G2: de 25-36 meses e G3: a partir de 36 meses. Imediatamente após a castração, foi efetuada a dissecação do epidídimo para a coleta de fluido epididimário, o qual foi separado dos espermatozoides por centrifugação a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e criopreservado a -196° C. Os espermatozoides foram ressuspensos em PBS e armazenados a -196° C. Para a dosagem de proteína das amostras, utilizou-se o método de Kit BCA espectrofotômetro e a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% SDS-

Page. Para imunodeteção das proteínas, efetuou-se a incubação do anticorpo primário específico por no mínimo, 6 horas a 4° C, e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-igG de camundongo ou anti-IgG de rato. Para a visualização das bandas foi utilizado o Kit de ECL em filmes de raio-X, e as bandas quantificadas pela utilização do software livre ImageJ. A PDI foi identificada nos três grupos avaliados na análise proteômica do fluido, e espermatozoides epididimários, sendo sua quantidade inferior no G1 em relação aos grupos dois (2) e três (3). Em conclusão, a expressão da PDI nos espermatozoides e fluido epididimários de potros castrados cirurgicamente, aumenta conforme o animal atinge a maturidade sexual. **Experimento 2-** Utilizou-se 12 garanhões adultos que já haviam sido submetidos à pelo menos duas temporadas de monta na região da Campanha do Rio Grande do Sul, efetuando-se quatro (4) coletas de cada garanhão, fora da estação de monta, respeitando-se um intervalo de 48h entre coletas. Imediatamente após a coleta, analisou-se motilidade, vigor e concentração com auxílio de microscópio óptico e retirou-se uma alíquota de sêmen para avaliação das patologias espermiáticas. A partir dos dados obtidos, os garanhões foram divididos em dois grupos: Grupo 1: motilidade não inferior a 70%, tendo-se uma média de 76,04±5,89% e histórico reprodutivo de temporadas anteriores com índice de prenhez mínimo por temporada de 80%. Grupo 2: motilidade igual ou inferior a 30%, com média de 11,83±11,21%, e histórico reprodutivo de temporadas anteriores de índices de prenhez inferiores a 35%. Efetuadas as análises, as mostras foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos para separar o plasma seminal, de mesma forma que no Exp. 1. Os pellets passaram por ressuspensão em PBS gelado e posteriormente armazenados a -196° C. As amostras foram submetidas à dosagem das proteínas, para serem submetidas à eletroforese, utilizando-se géis de poliacrilamida a 10% SDS-Page. Para imunodeteção das proteínas, efetuou-se a incubação do anticorpo primário específico por no mínimo, 6 horas a 4° C, e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-igG de camundongo ou anti-IgG de rato. Na visualização das bandas foi utilizado o Kit de ECL em filmes de raio-X, e as bandas foram quantificadas pela utilização do software livre Image J. Ao analisar a presença da PDI no plasma seminal dos garanhões, verificou-se sua

expressão em ambos os grupos; porém não houve diferença de expressão da PDI entre eles($p < 0,05$). Não houve também relação da PDI com motilidade, nem com a concentração espermática. Considerando os dados obtidos no presente experimento, não foi possível relacionar a PDI com qualidade espermática e assim considerá-la como um potencial marcador de fertilidade em equinos. São necessários mais estudos que possam envolver outros fatores moleculares inclusive as demais proteínas da família das PDIs.

Palavras Chave: chaperonas, puberdade, maturidade sexual, fertilidade

ABSTRACT

Puberty, in the equine species, may be defined by the appearance of mature spermatozoa in young animals' ejaculates, as well as endocrine function maturation. One of the proteins found in immature and mature spermatozoa is PDI (protein disulfide-isomerase). PDI was also described as an important fertility marker both in seminal plasma and sperm of many species. It is responsible for rearranging disulfide bonds, necessary for sperm adhesion proteins to link to the oocyte. The aim of this work was to identify PDI in equine epididymis during puberty, and quantify it in epididymal sperm and fluid of fertile and subfertile sperm. Two experiments were performed. **Experiment 1**-twenty-two healthy Crioulo colts were surgically castrated, and divided in three groups: G1: until 24 months; G2: from 25-36 months and G3: more than 36 months. Immediately after castration, testicles were measured, weighed, and the epididymis was dissected for epididymal fluid collection, which was centrifuged at 800 g for 10 minutes to separate epididymal fluid from sperm. Supernatant was removed, and cryopreserved at -196° C. Sperm were re-suspended in PBS and stored at -196° C. Protein dosing of samples was performed with BCA Kit and electrophoresis at 10% SDS-Page. To detect proteins, primary antibody was incubated for at least 6 hours at 4° C, and then incubation with secondary antibody conjugated with anti-mouse IgG or anti-rat IgG. To see bands, ECL Kit in X-ray films was used, and the bands quantified with software ImageJ. In the three groups PDI was identified, in epididymal fluid and epididymal sperm, but in smaller amount in G1 when compared with Groups 2 and 3. In conclusion, expression of PDI in epididymal fluid and sperm of surgically castrated colts, increases as the animal attains sexual maturity. **Experiment 2**- The aim of this work was to verify the presence of PDI in equine seminal plasma and sperm, quantify it and to compare its expression on seminal plasma from fertile and subfertile stallions. Twelve adult stallions with at least two breeding seasons were used. For the study, four collections of each animal were performed. Immediately after collection, analysis of motility, velocity, concentration and sperm morphology were performed. Stallions were divided in two groups,

according to the semen analysis and previous breeding history: Group 1: motility greater than 70% and previous history of pregnancy rates higher than 80%; Group 2: sperm motility less or equal than 30% and breeding history of less than 35% of pregnancy per season. After the analysis, samples were centrifuged at 800 g/10minutes to remove seminal plasma. Samples were prepared as described in Exp. 1. The expression of PDI in seminal plasma was seen in both groups, but with no statistical difference between them. There was no correlation of PDI with sperm motility or concentration. According to these findings, it is not possible to consider PDI as a fertility marker in stallions. More research is needed, involving other molecular factors, including other PDIs family proteins.

Key words: chaperones, puberty, sexual maturity, fertility

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|-------------------------------------|
| cAMP | adenosina monofosfato cíclica |
| FMP | proteína da motilidade progressiva |
| FSH | hormônio folículo estimulante |
| GnRH | hormônio liberador de gonadotrofina |
| Kda | quilo Dalton |
| LH | hormônio luteinizante |
| ml | mililitros |
| ng | nanogramos |
| PDI | proteína dissulfeto isomerase |
| RE | retículo endoplasmático |
| SFP | proteína do fluido seminal |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Reações realizadas pela PDI em substratos protéicos portadores de dissulfetos ou ditióis..... | 30 |
| Figura 2: Representação esquemática da estrutura da PDI..... | 31 |
| Figura 3: Localização celular das PDI e descrição de algumas interações com proteínas do RE e de superfície celular..... | 32 |
| Figura 4: Quantificação da expressão da PDI nos espermatozóides epididimários equinos..... | 44 |
| Figura 5: Quantificação da expressão da PDI no fluido epididimário eqüino.... | 45 |
| Figura 6 a: Médias de Motilidade Progressiva (MP) dos grupos Fértéis e Sub Fértéis..... | 59 |
| Figura 6 b: Médias de Motilidade Progressiva (MP) dos grupos Fértéis e Sub Fértéis..... | 59 |
| Figura 7 a : Médias de Vigor Espermático dos grupos de garanhões férteis e sub férteis..... | 60 |
| Figura 7b: Médias de Vitalidade Espermática de garanhões férteis e sub férteis..... | 60 |
| Figura 8: Quantificação da expressão da PDI no plasma seminal eqüino..... | 60 |
| Figura 9: Relação entre a Motilidade Progressiva (MP) e a expressão da PDI no plasma seminal eqüino..... | 61 |
| Figura 10: Concentração espermática de garanhões férteis e sub férteis..... | 62 |
| Figura 11: Relação entre a expressão da PDI e concentração espermática.... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Avaliações de MT (motilidade total) do fluido epididimário, peso e volume dos testículos direito e esquerdo dos grupos avaliados..... | 42 |
| Tabela 2: Número de éguas cobertas e prenhes dos Garanhões utilizados no experimento nas duas últimas temporadas de monta..... | 57 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 2.1 Puberdade..... | 18 |
| 2.2 Função Testicular..... | 18 |
| 2.3 Espermatogênese | 20 |
| 2.4 Maturação Espermática..... | 22 |
| 2.5 Epidídimo | 23 |
| 2.6 Proteínas relacionadas com a maturação epididimária..... | 26 |
| 2.7 Proteínas Dissulfeto Isomerase..... | 29 |
| 2.7.1 Caracterização das PDIs..... | 30 |
| 2.8 Western Blotting – SDS Page..... | 34 |
| ARTIGO 1: Efeito da puberdade na expressão da chaperona proteína dissulfeto isomerase (PDI) no epidídimo equino | 35 |
| ARTIGO 2: Associação da proteína dissulfeto isomerase: sêmen equino e a fertilidade em garanhões..... | 51 |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 68 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| ANEXOS | 81 |

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a tropa de equídeos supera os 5 milhões de animais, movimentando cerca de 16,4 milhões de reais por ano (MAPA, 2016). Estes números provam o poder que os equinos representam para a economia nacional, e para que esta cadeia obtivesse um melhor desenvolvimento, o manejo reprodutivo da espécie equina evoluiu significativamente nas últimas décadas, tanto em termos de novas tecnologias, quanto suas aplicações em rebanhos por todo o mundo. No Brasil, este cenário não é diferente; biotecnologias da reprodução como criopreservação de gametas e embriões e a criação de centrais especializadas na reprodução da espécie por todo o país tem aumentado nos últimos anos (MAPA, 2016).

Com o aumento intensivo no uso de animais para reprodução, e surgimento de novos gargalos no manejo reprodutivo, há a demanda pela compreensão dos fenômenos que regem a fisiologia reprodutiva. Assim, o estudo de eventos como a espermatogênese e oôgenese, maturação epididimária, fertilização, interação gameta-trato reprodutivo feminino, entre outros, necessitam, investigações a nível bioquímico e molecular. Tal profundidade busca compreender melhor os eventos celulares e teciduais, abrindo portas para o desenvolvimento de novos protocolos e tratamentos para problemas de fertilidade em equinos.

As biomoléculas-chaves nestes processos são as proteínas, lipídeos e glicídios específicos, que atuam direta ou indiretamente nos processos da fisiologia reprodutiva. Apesar de já se conhecer os papéis de diversos glicídios e lipídios, os estudos de proteômica tiveram um avanço mais acelerado, proporcionando um melhor entendimento das funções das proteínas na biologia da reprodução.

Em andrologia equina, especificamente, a identificação de proteínas epididimárias, do plasma seminal e do espermatozoide, permitiram a melhor compreensão da espermatogênese, maturação epididimária e fertilização.

Em bovinos, foi observado que as proteínas que induzem a motilidade progressiva fazem parte do grupo FMP (proteína da motilidade progressiva).

Este grupo é constituído de quatro a cinco proteínas agregadas entre si, de baixa massa molecular (37,5 kDa), e cuja atuação juntamente com cAMP induzem a motilidade (SHIVAJI et al., 1990). JAISWAL e MAJUNDER (1998) demonstraram ainda que as proteínas FMP associadas ao bicarbonato proporcionam a motilidade progressiva do espermatozóide.

Já em equinos, as proteínas mais abundantes no plasma seminal, somando 70-80% das proteínas totais são as HSP-1, HSP-2 que apresentaram capacidade heparina-ligante e foram encontradas em associação com a superfície espermática, indicando um papel potencial na fertilização. São proteínas de massas moleculares entre 14 e 30 kDa HSP-1 e HSP-2 (recentemente, renomeadas SP-1 e SP-2 por EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a). Atividades como a fusão espermatozóide-oócito ocorrem por fusão de membranas, situação esta que não ocorre espontaneamente, mas sim pela interação de lipídios e proteínas, entre elas proteínas específicas como a PDI, conforme demonstraram Ellerman ET. AL. (2006). As PDI possuem função chaperona, formando pontes dissulfeto para efetuar o enovelamento das proteínas e estas atingirem o estágio ativo. Além destas funções, atua ainda no armazenamento e controle do estradiol circulante (FU 2008).

Para obtermos marcadores que estabeleçam a fertilidade de garanhões ainda precisamos um conhecimento melhor a respeito das proteínas presentes nos espermatozóides imaturos e maduros. Inúmeros trabalhos estão publicados descrevendo características estruturais e funcionais do espermatozóide, porém ainda há muito, a saber, em relação à estrutura e função das proteínas nele presentes e as modificações que ocorrem durante a maturação espermática. Há alguns anos, pesquisadores têm mostrado interesse e encontrado diversas correlações da presença da PDI com a fertilidade em humanos (ZANG et al, 2007) e suínos, porém em equinos ainda não houve estudos a respeito.

O objetivo deste trabalho foi relacionar a expressão da PDI durante a puberdade e quantificar a presença desta chaperona em plasma seminal de garanhões férteis e subférteis, observando a possibilidade de considerá-la como um marcador potencial de fertilidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente seção traz uma revisão dos temas correlatos a esta tese como o estabelecimento da puberdade no garanhão equino, maturação espermática no epidídimo, o papel da secreção de proteínas nos tecidos reprodutivos e a relação da proteína disulfeto isomerase com a fisiologia reprodutiva.

2.1 Puberdade

A puberdade é caracterizada pelo desenvolvimento dos órgãos sexuais e aparecimento das características sexuais secundárias, ou seja, o período de vida em que ocorre o início da capacidade reprodutiva (ANDERSON et al., 1998), sendo atingida quando o animal, macho ou fêmea, se torna capaz de liberar gametas e de manifestar seqüências de comportamento sexual completo (GARNER & HAFEZ, 2004). Nos machos, a definição de puberdade ocorre no momento em que espermatozoides maduros aparecem no ejaculado em animais jovens, evento este que não necessariamente coincide com a maturação das funções endócrinas dos testículos (ALLEN et al., 1982).

Em machos equinos, a fase infantil perdura em torno de seis meses, para então ocorrerem mudanças que envolvem o período da pré-puberdade e puberdade (AMANN, 2011). Pouco se sabe a respeito dos quesitos que determinam o início da puberdade em garanhões: Idade, peso corporal, fotoperíodo e nutrição são citados como fatores determinantes, porém não de forma isolada, mas sim de forma interativa (JOHNSON et al., 1991; HOLYOAK et al., 1994). Foi estabelecido que um mínimo de idade e peso corporal seriam necessários para o aparecimento da puberdade, entretanto, outros fatores, como taxa de crescimento, composição corporal e fatores metabólicos podem também apresentar um efeito estimulatório ou inibitório no aparecimento da puberdade (KIRKWOOD & AHERNE, 1985). Foi sugerido, que a idade à puberdade, baseada nas características espermáticas, seria aos 21 meses, podendo variar entre 14 e 24 meses (NADEN et al., 1990).

A puberdade no macho não pode ser determinada com a mesma

precisão das fêmeas, pois representa um somatório de processos e não só um evento isolado. Foi definida como o momento em que os testículos se tornam ativos para produção de testosterona, com valores superiores a 0,5 ng/mL e com a capacidade de produzir 50×10^6 espermatozóides por ejaculado e com mais de 10% de motilidade (WOLF et al., 1965, NADEN et al., 1990)

Quando a produção de testosterona estiver estabelecida, capacidade reprodutiva cresce, sendo a maturidade sexual ou eficiência reprodutiva máxima atingida entre os dois e quatro anos de idade (AMANN, 1993). Considerando a capacidade reprodutiva do garanhão, Steiner e Umphenour (2009), concluíram que a puberdade é atingida entre os 12 e 24 meses de idade e sua capacidade reprodutiva é aumentada até os cinco a seis ou mais anos de idade. No entanto, Para Johnson et al. (1991), o garanhão atinge a maturidade sexual dois a quatro anos após a puberdade.

2.2 Função Testicular

Os espermatozóides são produzidos pelos testículos, que além da produção espermática, possui uma função endócrina, produzindo hormônios importantes para a diferenciação celular, desenvolvimento das características sexuais secundárias e para a libido (AMANN, 2011).

As principais células relacionadas a este processo são as células de Sertoli e as células de Leydig (AMANN, 1993). As células de Sertoli são as únicas células somáticas presentes nos túbulos seminíferos e fornecem suporte morfológico, nutricional e hormonal às células germinativas (BARDIN et al., 1994). A complexa ligação entre as células de Sertoli forma uma barreira hematotesticular garantindo uma região protegida para o desenvolvimento das células germinativas (AMANN, 1993), promovendo a compartimentalização do epitélio seminífero (NEVES, 2002), espermição das espermátides, movimento das linhagens jovens, fagocitose das células germinativas degeneradas e corpos residuais além de secreção de fluido luminal e comunicação intercelular (DYM E MADHWA RAJ, 1977).

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de esteróides, os quais são sintetizados a partir de uma molécula

base, o colesterol (BARDIN, 1996). Esta produção ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática destas células. À semelhança do FSH, o LH é uma glicoproteína sintetizada e secretada na adenohipófise sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. O controle de retroalimentação negativa do LH é exercido tanto pela testosterona quanto pelo estrógeno concomitantemente na adenohipófise e hipotálamo (SHUPNIK & SCHREIHOFER, 1997; ROCHIRA et al., 2006). Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, peritubulares mióides, musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (SCHLATT et al., 1997; SUÁREZ-QUIAN et al., 1998; DE GENDT et al., 2004).

2.3 Espermatogênese

A espermatogênese ocorre em ciclos altamente organizados nos túbulos seminíferos onde células diplóides (espermatogônias) se diferenciam numa célula haplóide madura (espermatozóide). Na espécie eqüina, estes túbulos apresentam um comprimento médio de 2.419 metros em cada testículo e são compostos por células germinativas em diferentes graus de desenvolvimento, intercaladas e sustentadas por células de Sertoli, que se fixam na membrana basal e se estendem até o lúmen (VARNER & JOHNSON, 2007).

Nos mamíferos já investigados, processo de espermatogênese dura entre 30 e 78 dias, é composto por diferentes associações celulares e considerado um dos mais produtivos sistemas de auto-renovação do organismo animal (FRANÇA e RUSSEL, 1998). No garanhão este processo leva ao redor de 57 dias (JOHNSON, 1991, JOHNSON e NEAVES, 1981) e é controlado através de mensageiros que atuam através de rotas endócrinas parácrinas e autócrinas (JOHNSON e THOMPSON, 1983; JOHNSON e NGUYEN, 1986; JOHNSON et al., 1986; JOHNSON e THOMPSON, 1986; JOHNSON e TATUM, 1989)

O processo espermatogênico se divide em três fases: a espermatocitogênese (fase de proliferação), a meiose (fase de multiplicação)

e a espermiogênese (fase de diferenciação). Durante a espermatocitogênese (fase de proliferação), as células germinativas mais jovens, as espermatogônias, se dividem em cinco gerações celulares (A1, A2, A3, B1 e B2). Durante esta fase, parte do citoplasma dessas células continua unido, formando as pontes intercelulares que são importantes por permitir a comunicação direta entre as células irmãs, garantindo o desenvolvimento sincronizado desta linhagem celular (JOHNSON et al., 1997, NEVES, 2002). O número estimado de gerações de espermatogônias varia de quatro a seis, na maior parte das espécies estudadas (JOHNSON et al., 1997). No equino são cinco (JOHNSON et al., 1978; FRANÇA e RUSSEL, 1998).

Após a última divisão espermatogonial, estas passam a se chamar de espermatócitos; os da primeira divisão meiótica são os espermatócitos primários e os da segunda são os espermatócitos secundários (COSTA e PAULA, 2003). Os espermatócitos primários em pré-leptóteno têm seu número semelhante aos da espermatogônia B2. Logo após, eles vão para a fase de leptóteno e, seqüencialmente, zigóteno, onde ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos. Logo após, os cromossomos compactam-se e entram na fase de paquíteno, seqüencialmente, de diplóteno onde eles se separam parcialmente. O núcleo, agora, passa pela metáfase, anáfase e telófase da primeira divisão meiótica para produzir os espermatócitos secundários, que apresentam os núcleos menores que os do espermatócito primário em paquíteno e, sem que ocorra duplicação de DNA (CLERMONT, 1972). Após a segunda divisão meiótica, os espermatócitos secundários dividem-se e passam a ser denominados espermátides arredondadas; aqui a espermiogênese tem início com o processo de diferenciação celular, até a formação dos espermatozóides (JOHNSON et al., 1997).

Já na espermiogênese (fase de diferenciação), as espermátides arredondadas sofrem uma transformação severa com compactação da cromatina, formação do flagelo, do acrossoma e perde citoplasma para, então, serem liberadas no lúmen do túbulo seminífero como espermatozóides, processo ao qual é dado o nome de espermiação. Durante esta fase a célula, o espermatozóide, fica mais vulnerável a defeitos estruturais e genéticos (AMANN, 1993; KERR et al., 2006). Mesmo os espermatozóides chegando ao

lúmen dos túbulos seminíferos, estes ainda precisam sofrer o processo de maturação espermática no epidídimo e de capacitação no trato genital feminino para se tornarem aptos à fertilização (COSTA e PAULA, 2003).

2.4 Maturação espermática

A maturação espermática envolve intensas alterações morfológicas e bioquímicas, estas alterações se iniciam na cabeça do epidídimo e seguem pelo corpo até a cauda proximal, garantindo a formação de espermatozóides aptos a reconhecer e fertilizar oócitos secundários no trato reprodutor feminino, e permitem ainda que os espermatozóides adquiram motilidade progressiva (ROBAIRE, 1988). Sabe-se que numerosas mudanças ocorrem com o espermatozóide durante o trânsito epididimário, entre estas mudanças, cita-se, por exemplo: migração e perda da gota citoplasmática (HAMILTON, 1975;ROBAIRE et al., 2006; MOURA et al., 2007).; modificações das suas dimensões (BEDFORD, 1963); alterações na quantia de lipídeos (SCOTT et. al., 1967), e proteínas (VOGLMAYR et al., 1980).

Pela interação entre os espermatozóides e o microambiente epididimário ocorrem mudanças da osmolaridade, da produção iônica, das reservas energéticas e de tipos protéicos. Este processo resulta em alterações relacionadas às composições macromoleculares e à fluidez das membranas plasmática e membranas acrossômicas, e a cromatina nuclear é estabilizada por um aumento das ligações dissulfídicas. Muitas alterações das membranas dos espermatozóides, que coincidem com a maturação espermática, são mediadas por proteínas secretadas em regiões restritas do ducto epididimário (algumas das quais são andrógeno-dependentes) e por associações subseqüentes dessas proteínas com os espermatozóides (DACHEUX, 2005).

2.5 Epidídimo

Os túbulos seminíferos convergem para formar a rede testis, que por sua vez dá origem aos ductos eferentes que, dependendo da espécie, são em número de 4 a 20 (ROBAIRE e HINTON, 2015). Estes túbulos convergem para

formar um único canal altamente enrolado, chamado epidídimo que é extremamente longo e varia conforme a espécie, alcançando 3 m em ratos, variando de 3-9 metros, na espécie humana (HINTON et al., 2011), e chega a até 80 metros nos equinos (OLIVA et al., 2009; MARIEB et al., 2009). Morfologicamente, o epidídimo foi dividido inicialmente em quatro regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, descritas pela primeira vez por Benoit (1926). A classificação se baseia no estudo da altura do epitélio, do diâmetro tubular e da variação na frequência dos diferentes tipos celulares, que incluem as células principais, basais, apicais, halo, claras e estreitas (REID, 1957), características tais que se relacionam com a função destas regiões. Além disso, a altura das células epiteliais que revestem o ducto epididimário diminui da região do segmento inicial para a cauda, e conseqüentemente, o lúmen deste aumenta nesta direção (REID, 1957; ROBAIRE, 1988).

As características morfológicas, limites, componentes e funções de cada uma delas podem variar entre espécies. Em equinos, como em humanos, a região proximal da cabeça é parte do extenso sistema de condutos eferentes. A cauda epididimária é inconspícua no homem, no entanto, em grande parte das espécies é uma estrutura bulbosa. Nesta região, os espermatozoides podem ser estocados, mantendo importantes reservas que representam o conteúdo de mais que dez ejaculados (FOURNIER-DELPECH e THIBAUT, 1993).

Em todas as espécies de mamíferos, cada região do epidídimo é ainda organizada em lobos separados por septos de tecido conjuntivo. Estes septos servem não apenas como suportes internos para o órgão, mas têm sido propostos para também fornecer uma separação entre os lóbulos, o que permite a expressão de genes e proteínas dentro de lóbulos individuais e podem desempenhar um papel na criação de micro-ambientes específicos onde substâncias, tais como fatores de crescimento, poderiam ter papéis diferenciados (TUNNER et al., 2003).

O tipo celular mais abundante neste ducto é a célula principal, encontrada em todos os segmentos epididimários, entretanto, são mais abundantes no segmento inicial e na cabeça epididimária (aproximadamente 80% do total de células epiteliais). Entre o segmento inicial e as demais

regiões, podem ser observadas algumas variações nas características morfológicas das células principais. Na cabeça, corpo e cauda do epidídimo, os núcleos destas células apresentam formas irregulares e localizam-se na porção basal enquanto que, no segmento inicial, os núcleos se mostram arredondados, dispostos em vários níveis (REID, 1957)

As células principais são responsáveis pelo transporte e secreção de íons e de pequenas moléculas orgânicas, pela síntese e secreção protéica, como também pela reabsorção de fluido (ROBAIRE, 1988, DACHEUX et al.,2005). As células principais, nas regiões da cabeça e do corpo participam ainda da manutenção do pH luminal ácido (PASTOR-SOLER, 2005). A habilidade das células principais para secretar proteínas, inclusive glicoproteínas, tem sido relacionada com o seu bem desenvolvido “sistema organelar associado à síntese e secreção, tal como a presença de um marcante retículo endoplasmático rugoso (RER) associado com o aparelho reticular de Golgi (HERMO, 1994; LIU et al., 1991; FELISBINO, 1997). Adicionalmente, uma via secretória intracitoplasmática de proteínas foi demonstrada em células principais epididimárias de camundongos por Flickinger (1985). Semelhantes às células principais, existem as células apicais, que não estabelecem contato com a membrana basal e apresentam núcleos que se localizam na porção apical (REID, 1957). No segmento inicial, observam-se as células estreitas, que apresentam citoplasma mais acidófilo que o das células principais, núcleo alongado e localizado na metade superior da célula e região basal estreita, difícil de serem visualizadas. As células estreitas modificam o pH do lúmen por produzirem enzimas da família anidrase carbônica, fazendo a manutenção da quiescência do espermatozóide; além disso, as células apicais e estreitas têm a função de degradação de proteínas específicas (PASTOR-SOLER,2005; HERMO et al., 2005).

Por outro lado, as células claras são encontradas somente nas porções da cabeça, do corpo e, especialmente, da cauda que possuem numerosos vacúolos apicais, e participam da remoção da gota citoplasmática presente nos espermatozoides (REID, 1957). Em todo o epidídimo, porém, em maior quantidade nas regiões do corpo e da cauda, observam-se as células basais. Possuem o núcleo alongado ou esférico com cromatina condensada, tendo

função protetora por formar barreiras entre os vasos sanguíneos e o lúmen epididimário e participam do processo de “destruição” de espécies reativas de oxigênio devido à expressão de altas concentrações de enzimas da família da glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e indolamina dioxigenase, auxiliando também na regulação do transporte de água e de eletrólitos pelas células principais (VERNET et al, 2004; LEUNG et al., 2004; CHEUNG, 2005)

As células halo são distribuídas em todos os níveis do epitélio epididimário, porém são mais freqüentes no epitélio da porção da cabeça. Elas apresentam núcleo com cromatina densa, envolto por uma quantidade escassa de citoplasma, além de uma área fracamente corada, formando um “halo”; estas células estão relacionadas ao sistema imune (ROBAIRE, 1988).

Cada região ao longo do ducto epididimário possui uma distribuição diferenciada dos tipos celulares, determinando um fluido laminar característico, constantemente modificado pela atividade secretória e de reabsorção do epitélio do epidídimo, e pela atividade metabólica do espermatozóide, criando um microambiente apropriado para a maturação espermática (ROBAIRE, 1988; HINTON, 1993).

Um aspecto interessante da expressão gênica no epidídimo é o alto grau de regionalização do padrão de expressão do RNAm. A expressão regional de cada gene pode refletir funções diferentes. Análises eletroforéticas e proteômicas do fluido luminal demonstram que essas proteínas apresentam um padrão de distribuição diferente ao longo do conduto, sendo que as regiões proximais apresentaram maior atividade secretora (Gatti et al., 2004; Sullivan et al., 2005). Muitos genes somáticos e germinativos se expressam exclusivamente ou exibem altos níveis de expressão nesta região, enquanto outros genes só se expressam na região do corpo ou na cauda epididimária. A alta expressão de genes na região proximal deste órgão sugere que nela aconteceriam eventos iniciais do processo de maturação; entretanto genes que se expressam na região distal poderiam estar relacionados com a manutenção da função espermática durante a armazenagem dos espermatozoides (Cornwall e Hann, 1995).

Os espermatozoides imaturos deixam os testículos quase imóveis, e são lentamente movidos ao longo do ducto do epidídimo pelo fluido que contém várias proteínas antimicrobianas, incluindo diversas beta-defensinas (MARIEB et al., 2009). Este transporte através do ducto epididimário depende da contração muscular via transmissão simpática e parassimpática, da ação dos cílios presentes nas células epiteliais e do gradiente de pressão hidrostática diferencial entre as porções proximal e distal do ducto epididimário (ROBAIRE, 1988) Para estimar-se o tempo de trânsito total através de cada segmento do epidídimo avalia-se a reserva de espermatozoides e produção de sêmen testicular diária (ORGBIN- CRIST, 2008), porém o tempo mínimo necessário para a passagem de espermatozoides através do mesmo é de aproximadamente dez dias, independente do tamanho do animal, da sua produção de espermatozoides ou de suas reservas de fluido epididimário (ROBAIRE et al., 2006).

2.6 Proteínas relacionadas com a maturação epididimária e fertilização

Como papel das proteínas, descreve-se a responsabilidade pela habilidade dos espermatozoides: se movimentarem, vencerem as barreiras do trato feminino, alcançar o local de fecundação, ligar e fundir-se ao oócito e formar o zigoto (VARRICHIO et al., 1996; JONES, 1998,). Uma das proteínas responsáveis por este movimento é a kinase, que na passagem dos espermatozoides pelo corpo do epidídimo, sob a influência do baixo nível de cálcio, alto pH e cAMP, é ativada atuando na atividade flagelar da cauda do espermatozóide (SHIVAJI et al., 1990).

Em bovinos, foi observado que as proteínas que induzem a motilidade progressiva fazem parte do grupo FMP (proteína da motilidade progressiva). Este grupo é constituído de quatro a cinco proteínas agregadas entre si, de baixa massa molecular (37,5 kDa), e cuja atuação juntamente com cAMP induzem a motilidade (SHIVAJI et al., 1990). JAISWAL e MAJUNDER (1998) demonstraram ainda que as proteínas FMP associadas ao bicarbonato proporcionam a motilidade progressiva do espermatozóide.

Algumas proteínas, como as proteínas SFP (proteínas do fluido seminal, 13 kDa; SCHONECK et al., 1996) e LDH-C4 (desidrogenase láctica C4) envolvidas na motilidade, apresentam função de proteção (redução de peróxidos) dos espermatozóides, outras como a calmodulina e calsemina ativam os canais de cálcio (SHIVAJI et al., 1990). Ainda os receptores RHAMM (58 kDa; receptores de hialuronidase) também foram relacionados à motilidade via ácido hialurônico (KORNOVSKY et al., 1994). Estudos recentes apontaram a angiotensina II como tendo propriedade cinéticas (SABEUR et al., 1999) e TPP (tirosina fosforilada), ambas envolvidas na motilidade da cauda (YEUNG et al., 1999), e o TNF α (fator de necrose tumoral α) presente no sêmen como motilidade acima de 50% (LIEBERMANN et al., 1999).

Não menos importante é a atuação das proteínas inibidoras de motilidade como as SMIF (fatores de inibição de motilidade do sêmen), de baixa massa molecular, porém, sugestões têm sido feitas no sentido de que estes fatores possam atuar como selecionadores de espermatozóides durante o processo de fertilização (SHIVAJI et al., 1990).

Existem estudos que demonstram que os compostos protéicos secretados nos dutos eferentes (antígenos e proteínas) são imprescindíveis à capacidade de fecundar dos espermatozóides. Participam desta lista compostos como a fertilina (MYLES e PRIMAKOFF, 1997), pró-acrosina (KALAB et al., 1994) e β 1,4-galactosiltransferase (MILLER e SHUR, 1994), 16 além do antígeno PH20/2B1 (PHELPS e MYLES, 1987) e as proteínas sp56 (CHENG et al., 1994) e p95 (KALAB et al., 1994). As proteínas mais abundantes no plasma seminal de equinos, somando 70-80% das proteínas totais são as HSP-1, HSP-2 que apresentaram capacidade heparina-ligante e foram encontradas em associação com a superfície espermática, indicando um papel potencial na fertilização. São proteínas de massas moleculares entre 14 e 30 kDa. HSP-1 e HSP-2 (recentemente, renomeadas SP-1 e SP-2 por EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005a). Pertencem ao grupo chamado proteínas seminais curtas tipo Fn-2 (EKHLASI-HUNDRIESER ET AL., 2005a). Mais recentemente, proteínas longas Fn-2 têm sido identificadas no trato genital masculino de várias espécies de mamíferos, incluindo equinos, onde é chamada de EQ-12. As proteínas longa (EQ-12) e curta (SP-1 e SP-2) se

associam fortemente à superfície espermática durante o trânsito epididimário e na ejaculação. A ligação espermática das proteínas tipo Fn-2 à região pós-acrossomal da peça intermediária é detectada primeiro no corpo epididimário, as características mais notáveis das proteínas seminais tipo Fn-2 são sua habilidade de interagir especificamente com as colinas dos fosfolipídios da membrana espermática e sua capacidade heparina-ligante (CALVETE et al., 1997). A capacidade heparina-ligante é uma propriedade que depende do estado de agregação das proteínas. Apenas proteínas tipo Fn-2 oligoméricas, e não as monoméricas têm demonstrado essa habilidade (CALVETE et al., 1999). A ligação dessas proteínas na superfície espermática deve preceder os processos de capacitação induzidos por heparina (MANJUNATH e THERIEN, 2002).

As proteínas CRISP espermáticas de eqüinos estão localizadas na região equatorial e pós-acrossomal da cabeça, bem como, na peça intermediária do flagelo. Sua associação com a superfície espermática começa na região de corpo do epidídimo (SCHAMBONY et al., 1998). Pode-se dizer que as moléculas de CRISP1 e/ou CRISP2 devam exercer uma função direta nos últimos eventos de fertilização (fusão espermatozóide-oócito), enquanto CRISP3 parece contribuir para as funções do plasma seminal no trato genital feminino.

Entre as proteínas que promovem a sobrevivência espermática neste órgão incluem proteínas envolvidas na conjugação de glutationa e seu metabolismo (HINTON et al., 1996; ROBAIRE e VIGER, 1995), a glicoproteína-2 sulfatada (SGP-2 ou clusterina;SYLVESTER et al., 1991) que inibe a lise celular mediada pelo complemento, inibidores de proteases tais como proteína HE4 (KIRCHHOFF et al., 1998) e as proteínas da família CRES (CORNWALL et al., 1992) que protegem espermatozoides da degradação proteolítica.

Outras proteínas também têm sido isoladas no plasma seminal eqüino, como a lactoferrina que é originada do testículo (INAGAKI et al., 2002) que assim como a leptina e os fatores de crescimento, podem levar a um aumento da longevidade dos espermatozoides.

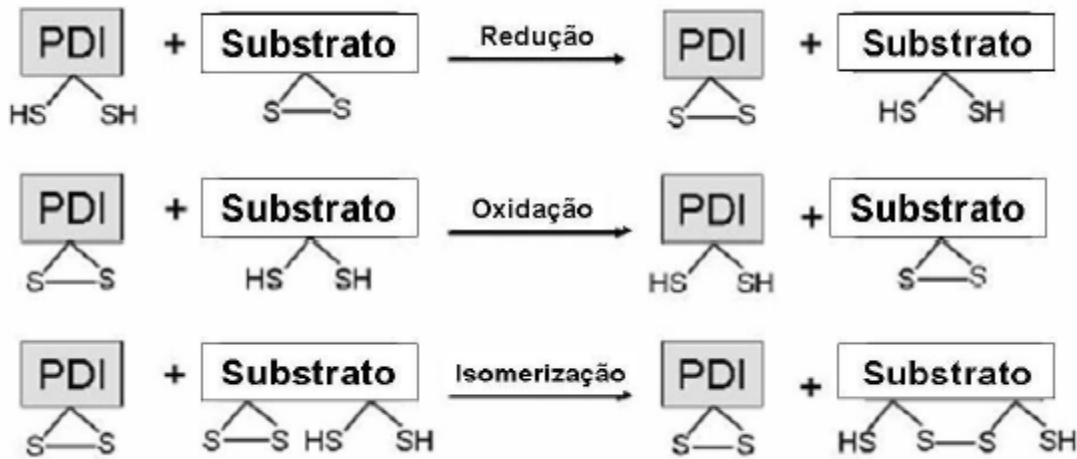
2.7 Proteínas Dissulfeto Isomerase (PDI)

As oxiredutases ditiólicas, especialmente aquelas pertencentes à superfamília das tiorredoxinas, são enzimas reconhecidamente importantes na ativação de vias de sinalização redox (EBRAHIMIAN e TOUYS, 2008). Dentro da superfamília das tiorredoxinas, encontra-se a Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI), uma chaperona redox, oriunda do retículo endoplasmático. A PDI e suas análogas são as únicas capazes de catalizar reações de izomerização, ou seja, reorganizam o posicionamento de pontes de dissulfeto através de ciclos repetitivos de oxidação e redução. As diferentes atividades exercidas pela PDI são realizadas nos diferentes estados redox destes motivos catalíticos, os quais podem ser encontrados no estado reduzido ditiol ou oxidado dissulfeto (LAURINDO et al., 2008).

As PDI são responsáveis por participar de importantes processos fisiológicos como a modulação da atividade da fosfatase da miosina, proteína indispensável à contração muscular (SITIA, 2003) e destacam-se por atuar na manutenção conformacional das proteínas recém-formadas, especialmente daquelas destinadas à superfície celular e que não estão sob a vigília direta de chaperonas (RIEMER et al., 2009). Desta forma, possuem um papel de destaque dentro dos processos biológicos (MORAES et al., 2012).

Dentre as funções da PDI podemos citar a catálise da oxidação de cisteínas para a formação de pontes dissulfeto, processo que auxilia o enovelamento de proteínas destituídas de pontes dissulfeto (função chaperona) bem como a redução e re-arranjo de pontes dissulfeto em proteínas, ou seja, re-organização do posicionamento de pontes dissulfeto (LAURINDO et al., 2008). Ambas as funções são independentes do potencial redox do meio em que a PDI se encontra (Figura 1).

Figura 1: Reações realizadas pela PDI em substratos protéicos portadores de dissulfetos ou ditióis.



Fonte: adaptado de Laurindo et al.,(2008).

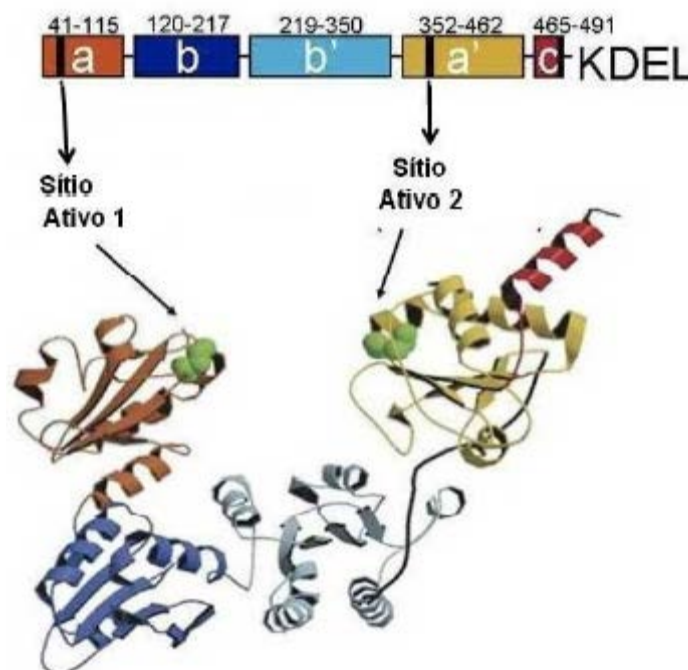
Estas proteínas são encontradas em todos os organismos multicelulares atuando prioritariamente no retículo endoplasmático (RE), porém a coordenação da conformação de proteínas *in vivo* ainda é pouco conhecida (VAN LITH et al., 2007). A PDI é uma proteína abundante, podendo atingir níveis milimolares no retículo endoplasmático de hepatócitos, e sua expressão se relaciona- a sobrevivência celular. Em células de mamíferos, a expressão de PDI mantém a sobrevivência celular e o aumento de sua expressão melhora a resistência celular pós-hipóxia em astrócitos e células endoteliais (TANAKA et al., 2000;SULIVAN et a.,l 2003).

2.7.1 Caracterização das PDIs

As PDI são proteínas de peso molecular aproximado de 55 kDa, e sua organização compreende cinco domínios semelhantes à tiorredoxinas a, a', b e b'. Apresentam também um domínio carboxi-terminal denominado de c (Figura 2). Nos domínios a e a' localizam-se os dois sítios catalíticos independentes da enzima, cujas cisteínas reativas localizam-se na seqüência Trp-Cys-Gly-His-Cys (NOIVA, 1999; WILKINSON e GILBERT, 2004).

Os domínios b não são catalíticos, entretanto, o domínio b' apresenta uma larga superfície hidrofóbica, identificada como principal responsável pelo reconhecimento e ligação das PDIs aos seus substratos (DENISOV, 2007; BYRNE, 2009). Já o domínio carboxi-terminal c, apresenta a seqüência KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) de retenção no retículo endoplasmático e tem sido considerado um sítio de ligação ao cálcio (WILKINSON e GILBERT, 2004; LAURINDO et al., 2008).

Figura 2: Representação esquemática da PDI



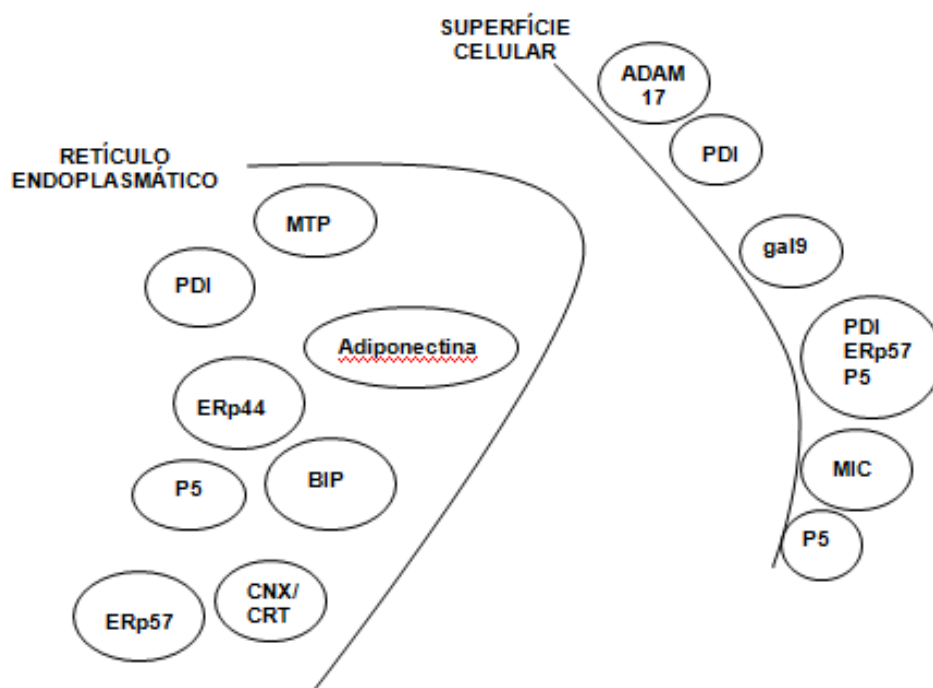
Fonte: adaptado de Laurindo et al.,(2008).

A atividade oxidase é dependente apenas dos domínios a e a', entretanto todos os domínios semelhantes à tioredoxina são necessários a execuções de reações de isomerizações mais complexas. Desta forma percebe-se que a estrutura multidomínio da PDI é essencial a sua plena função e habilita a interagir e estabilizar tanto proteínas nascentes, proteínas parcialmente dobradas, quanto outras mal enoveladas (WILKINSON e GILBERT, 2004)

O domínio b' é considerado o sítio primário para a ligação de proteínas não-nativas, as quais interagem com um pequeno bolso hidrofóbico delimitado pelos resíduos Leu 242, Leu 244, Phe 258, Ile 272. Mutações em quaisquer destes resíduos influenciam significativamente a capacidade de reconhecimento e ligação da PDI e seus substratos (PIRNESKOSKI et al., 2004)

Como demonstra a Figura 3, estudos têm demonstrado a função de ativação funcional das PDIs em relação a outras proteínas no retículo endoplasmático e na superfície celular e as interações estabelecidas entre as mesmas (BENHAM,2012).

Figura 3: Localização celular das PDI e descrição de algumas interações com proteínas do RE (Retículo Endoplasmático) e de superfície celular.



Fonte: Adaptado de BENHAM, (2012).

As PDIs formam uma família composta por 20 membros que além de partilharem propriedades estruturais comuns, também apresentam características únicas relacionadas com os sítios de ligação ao substrato e a outras proteínas residentes do RE, que são responsáveis pela especificidade das interações com o substrato e pelas propriedades funcionais (KOZLOV et

al., 2010). Sua expressão mantém a sobrevivência celular em células de mamíferos e o aumento destas melhora a resistência em células endoteliais.(TANAKA et al., 2000; GRAVEN et al., 2002, SULLIVAN et al., 2003. REINHARDT et al.2008) demonstraram que em ratos, estas chaperonas atuam junto ao tecido plaquetário ativando a produção de fibrina (REINHARDT et al., 2008). A PDI realiza tráfego intracelular, e é encontrada na superfície de diversas células procarióticas e eucarióticas, constituindo aproximadamente 25% dos tióis encontrados em superfícies celulares.

Recentemente, o papel das chaperonas começou a ser explorado com relação à fisiologia reprodutiva, como algumas funções nas células da linhagem espermatogênica que já foram descritas, evidenciando a importância destas na produção de espermatozoides férteis (VAN LITH et al., 2007; IKAWA et al., 2011).

Outro motivo que atrai interesse em pesquisas relacionando a PDI com a fertilidade são os rearranjos de ligações dissulfeto que são necessários para que proteínas de adesão do espermatozoide possam se ligar ao oócito. (SUNDHEY et al., 1995).

Estudos recentes demonstram ainda que a PDI exerce a função de reservatório hormonal, incluindo os hormônios tireoidianos (T3) e Estrogênio (E2) (IMAOKA, 2011), e possui a capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio atuando assim na regulação dos mesmos e manutenção de sua estrutura (SCHULTZ-NORTON, 2006; FU 2008,).

2.8 Western Blotting – SDS Page

Western blotting é um método para detectar proteínas em um homogenato (células bem trituradas) ou um extrato de um tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde são usados como sonda anticorpos específicos à proteína. As proteínas da amostra são

separadas de acordo com o peso molecular usando-se a eletroforese em gel, separando então as proteínas por massa em "bandas" conforme os pesos moleculares (BRUNETTE, W.N., 1981).

Artigo 1:**Análise da expressão gênica da chaperona dissulfeto Isomerase (PDI) no epidídimo e sua associação com a puberdade em equinos**

Analysis of the genic expression of the protein disulfide Isomerase (PDI) and your association with the puberty in equine

Liana de Salles van der Linden¹, Ana Paula Binato Souza², Tayná Nauê Lopes², Anna Flávia Tischer da Silva², Luise Marcon Tomé², Sérgio Ivan dos Santos³, Ivan da Cunha Bustamante Filho², Adriana Pires Neves^{1,3}

-
- 1- PPGMA: Equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, Brasil
 - 2- Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, UNIVATES. Rua Avelino Tallini, 171. Lajeado, RS, Brasil.
 - 3- Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Rua 21 de Abril, 80, Dom Pedrito, RS Brasil.

RESUMO

O período de puberdade, em equinos, define-se pela aparição de espermatozoides maduros no ejaculado de animais jovens, bem como a maturação das funções endócrinas. Os espermatozoides saem dos testículos imaturos, e necessitam passar por um processo de maturação no epidídimo. Neste processo, as glicoproteínas estão associadas a importantes mecanismos de maturação dos espermatozoides, tais como: reconhecimento de sítios específicos sobre a superfície dos oócitos durante a fertilização; formação da matriz acrossomal; ação sobre a reação acrossômica, fertilização e destruição da gota citoplasmática do espermatozoide. Para haver a possibilidade de se obter marcadores moleculares potenciais que permitam estabelecer a fertilidade de um garanhão, é necessário um melhor conhecimento das proteínas presentes em espermatozoides imaturos e maduros, uma das quais é a PDI (proteína dissulfeto-isomerase), responsável pelos rearranjos de ligações dissulfeto, necessárias para que proteínas de adesão do espermatozoide possam se ligar ao oócito. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença da PDI no epidídimo equino durante a puberdade, além de quantificar esta proteína no fluido e nos espermatozoides epididimários. Foram utilizados 22 equinos Crioulos saudáveis, castrados e divididos em três grupos: G1: potros até 24 meses, G2: de 24-36 meses e G3: a partir de 36 meses. Imediatamente após a castração, os testículos foram medidos, pesados e foi efetuada a dissecação do epidídimo para a coleta de fluido epididimário. Este foi acondicionado em tubos e centrifugado a 800 g por 10 minutos para separar o fluido dos espermatozoides. O sobrenadante foi removido e criopreservado a -196° C. Os espermatozoides foram ressuspensos em PBS e armazenados a -196° C. Para a dosagem de proteína das amostras, utilizou-se o método de Kit BCA espectrofotômetro e a eletroforese com géis de poliacrilamida a 10% SDS-Page. Para imunodeteção das proteínas, efetuou-se a incubação do anticorpo primário específico por no mínimo, 6 horas a 4° C, e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de rato. Para a visualização das bandas, foi utilizado o Kit de ECL em filmes de raio-X, e a quantificação pelo software livre Image J. Considerando a análise proteômica do fluido e espermatozoides epididimários, a PDI foi identificada nos três grupos avaliados, sendo sua quantidade inferior no G1 em relação aos grupos 2 e 3. Em conclusão, a expressão da PDI nos

espermatozoides e fluido epididimários de potros castrados cirurgicamente, aumenta conforme o animal atinge a maturidade sexual considerando as respectivas idades.

Palavras Chave: chaperonas, puberdade , maturidade sexual

ABSTRACT

Puberty, in the equine species, may be defined by the appearance of mature spermatozoa in young animals' ejaculates, as well as endocrine function maturation. Sperm leave testicle still immature, and need to undergo an epididymal maturation process. During this, glycoproteins are associated with important mechanisms of sperm maturation, such as: recognition of specific sites on oocyte surface during fertilization; acrosome matrix formation; acting on acrosomal reaction, fertilization and cytoplasmic droplet destruction. One of the proteins found in immature and mature spermatozoa is PDI (protein disulfide-isomerase). PDI is responsible for rearranging disulfide bonds, necessary for sperm adhesion proteins to link to the oocyte. The aim of this work was to identify PDI in equine epididymis during puberty, and quantify it in epididymal sperm and fluid. Twenty-two healthy Crioulo colts were surgically castrated, and divided in three groups: G1: until 24 months; G2: from 24-36 months and G3: more than 36 months. Immediately after castration, testicles were measured, weighed, and the epididymis was dissected for epididymal fluid collection, which was put into tubes and centrifuged at 800 g for 10 minutes to separate epididymal fluid from sperm. Supernatant was removed, and cryopreserved at -196° C. Sperm were re-suspended in PBS and stored at -196° C. Protein dosing of samples was performed with BCA Kit and electrophoresis at 10% SDS-Page. To detect proteins, primary antibody was incubated for at least 6 hours at 4° C, and then incubation with secondary antibody conjugated with anti-mouse IgG or anti-rat IgG. To see bands, ECL Kit in X-ray films was used, and the bands quantified with software ImageJ. In the three groups PDI was identified, in epididymal fluid and epididymal sperm, but in smaller amount in G1 when compared with Groups 2 and 3. In conclusion, expression of PDI in epididymal fluid and sperm of surgically castrated colts, increases as the animal attains sexual maturity.

Key words: chaperones, puberty, sexual maturity.

INTRODUÇÃO

O período de puberdade corresponde ao desenvolvimento dos órgãos sexuais, aparecimento das características sexuais secundárias, início da capacidade reprodutiva (ANDERSON et al., 1998), que é atingida quando o indivíduo se torna capaz de liberar gametas e de manifestar sequências de comportamento sexual completo (GARNER e HAFEZ, 2004). Já Allen (1962), considera que nos machos, a puberdade ocorre quando espermatozoides maduros aparecem no ejaculado de animais jovens, independente da maturação das funções endócrinas.

Diferente da puberdade nas fêmeas, no macho não pode ser determinada com precisão, por não ser um evento isolado e sim um somatório de processos. Estudos definiram que a puberdade é atingida no momento em que os testículos se tornam ativos para produção de testosterona, com valores superiores a 0,5 ng/mL e com a capacidade de produzir 50×10^6 espermatozoides por ejaculado além de no mínimo 10% de motilidade (WOLF et al., 1965, NADEN et al., 1990).

O processo de espermatogênese ocorre nos testículos, porém os espermatozoides saem dos testículos imaturos, inaptos a fertilizar o oócito, por esta razão necessitam passar por um processo de maturação no epidídimo para que haja a possibilidade de fecundação (ORGEBIN-CRIST e OLSON, 1984). Sabe-se que numerosas mudanças ocorrem com o espermatozoide durante o trânsito epididimário. Entre estas mudanças, cita-se, por exemplo: migração e perda da gota citoplasmática (HAMILTON, 1975; ROBAIRE et al., 2006; MOURA et al., 2007); modificações das suas dimensões (BEDFORD, 1963); alterações na quantidade de lipídeos (SCOTT et al., 1967, e proteínas (VOGLMAYR et al., 1980). Durante o processo de maturação, ocorre a adsorção de proteínas e glicoproteínas produzidas pelo epitélio epididimário e pela membrana plasmática do espermatozoide, assim como a remoção algumas proteínas de membrana espermática que compõem o fluido epididimário. As glicoproteínas estão associadas a importantes mecanismos de maturação dos espermatozoides, tais como: reconhecimento de sítios específicos sobre a superfície dos oócitos durante a fertilização; formação da matriz acrossomal; ação sobre a reação acrossômica, fertilização e destruição da gota citoplasmática do espermatozoide (STUMPP, 2009).

Para haver a possibilidade de se obter marcadores moleculares que permitam estabelecer a fertilidade de um garanhão, é necessário um melhor conhecimento das

proteínas presentes em espermatozóides imaturos e maduros. Existem numerosos trabalhos sobre características estruturais e funcionais do espermatozóide, porém muito resta por conhecer em relação à estrutura e função das diferentes macromoléculas nele presentes, bem como das modificações que experimentam durante o processo de maturação espermática (VARNER e JOHNSON, 2007).

Entre as proteínas relacionadas à maturação espermática, destaca-se a PDI, pois é responsável pelos rearranjos de ligações dissulfeto, Esta estabilização confere ao núcleo uma maior resistência durante seu percurso pelas vias seminais e no trato reprodutivo da fêmea e facilita a penetração do espermatozóide à zona pelúcida (BEDFORD E CALVIN, 1974; DIAS, 2004).

Além de funcionar como uma molécula chaperona, a PDI em humanos tem a função de modular as concentrações de E2 extracelular e intracelular (FU et al., 2008). Hormônio este envolvido diretamente na espermatogênese por estimular a proliferação das células de Sertoli (MAGALHÃES LAZARI, 2009).

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença da PDI no epidídimo equino durante a puberdade, além de quantificar esta proteína no fluido e nos espermatozóides epididimários.

1. Material e Métodos

2.1 Coleta e processamento das amostras

Para o presente experimento foram utilizados equinos Crioulos saudáveis de propriedade de cabanhas da Região da Campanha do Rio Grande do Sul, Brasil (Latitude:31°19'53"S,Longitude: 54° 06' 25" W)

Os animais foram castrados cirurgicamente e divididos em três grupos: G1: potros até 24 meses, G2: de 25-36 meses e G3: a partir de 36 meses. Imediatamente após a castração, os testículos foram medidos (comprimento, altura e largura e pesados para posteriormente ser efetuada a cuidadosa dissecação do epidídimo para a coleta de fluido da cauda do epidídimo e processamento deste.

O fluido coletado foi avaliado ao microscópio óptico,binocular (Coleman®) observando-se a presença ou não de espermatozóides e a motilidade , sendo acondicionado em tubos eppendorf para passar pelo processamento. As alíquotas foram centrifugadas a 800 g por 10minutos para separar o fluido epididimário dos

espermatozóides. O sobrenadante (fluido epididimário) foi removido, acondicionado em Eppendorf e criopreservado em nitrogênio líquido à -196° C para posterior manipulação. Os pellets de espermatozóides foram ressuspensos em tampão fosfato (PBS) gelado e centrifugados a 800g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se PBS novamente ao pellet e a centrifugação foi feita novamente para que a retirada completa do fluido epididimário fosse possível. Posteriormente os pellets de espermatozóides foram também armazenados a -196° C para serem encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia da Univates.

2.2 SDS Page e Western Blotting

As amostras foram submetidas à dosagem das proteínas, utilizando-se o método de Kit BCA espectrofotômetro (Spectramax[®] Molecular Devices) para a leitura para posteriormente serem submetidas a eletroforese, utilizando-se géis de poliacrilamida a 10% SDS-Page (SIGMA, St. Louis, MO, USA). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, Bilerica, EUA) e o sistema foi colocado em um cassete de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Após transferência, a membrana foi incubada com M-TPBS (tampão PBS, adicionado de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) por 60 minutos a 4° C a fim de se obter o bloqueio de sítios não ocupados na mesma.

Para imunodeteção das proteínas efetuou-se a incubação do anticorpo primário específico (anti-PDI) por no mínimo, 6 horas a 4° C, e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-igG de camundongo ou anti-IgG de rato (Amershan Pharmacia). Para a visualização das bandas, foi utilizado o Kit de ECL (Enhanced Chemiluminescence - Millipore, Bilerica, EUA) em filmes de raio-X, e as bandas quantificadas pela utilização do software livre ImageJ.

2.3 Análise Estatística

A quantificação dos géis permitiu a comparação da quantidade das proteínas entre os grupos, que foi realizada ANOVA de uma via seguida do e TUKEY, realizado com o software Prism 6 (GraphPad) adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias gerais de biometria testicular observadas neste estudo estão descritas na tabela a seguir:

Tabela 1: Valores médios de MT (motilidade total) do fluido epididimário, peso e volume dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) dos grupos avaliados.

| | G1 (n=10) | G2 (n=6) | G 3 (n=6) |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|
| MT (%) | 3,00±2,58 | 2,86±2,40 | 3,66±0,03 |
| Volume TE (cm ³) | 93,4±84,3 | 148,4±54,3 | 144,79±106,8 |
| Peso TE (g) | 121,0±75,3 ^a | 189,2±32,46 | 190,83±41,84 ^{ab} |
| Volume TD (cm ³) | 72,4±48,4 ^b | 126,5±36,99 ^a | 125,80±33,22 ^a |
| Peso TD(g) | 104,9±54,9 ^b | 184,2±33,67 ^a | 182,50±29,62 ^a |

Letras diferentes indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).

Ao estudar a motilidade espermática total no fluido epididimário, não foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos. Pinho et al.(2015), avaliando um garanhão de 6 anos, observaram a motilidade epididimária de 15,65%, superior ao observado neste experimento. Estudos sobre a recuperação de espermatozóides do epidídimo demonstraram que estas células se mantêm viáveis à temperatura ambiente por 24 horas pós orquiectomia e que o número de espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo é maior do que o número de espermatozóides de um ejaculado em vagina artificial (NEILD et al., 2006; MONTEIRO et al., 2013).Blanchard et al. (2001) verificaram valores de 70 a 80g, em oito diferentes raças com idade média de três anos. Na raça Quarto de Milha, Naden et al. (1990) identificou uma média de volume testicular de 103,0g aos dois anos de idade e na raça Crioula com idade média de 48 meses, o peso testicular foi de 162,9g (FIGUEIRÓ, 2010).Considerando as medidas dos testículos esquerdos, não se encontrou diferença; as médias dos testículos direitos demonstram diferença estatística entre o grupo 1 em relação aos grupos 2 e 3 (tab.1).

Ao avaliar o peso testicular, nos testículos direitos, os resultados foram similares ao observado no volume testicular direito, onde se obteve um peso menor no grupo 1: 104,9±54,9g, em relação aos grupos 2: 184,2±33,67g; e 3: 182,5±29,62g nos quais não se observou diferença estatística. O peso testicular esquerdo médio do grupo 1 foi de 121±5,3g;o do grupo 2 189,2±32,46g, e do grupo 3

190,8±41,64g. As diferenças observadas entre os grupos estão expressas na Tabela 1.

Figueiró (2010) avaliando biometria testicular em garanhões da raça Crioula observou uma média de peso testicular de 162,4g em animais de aproximadamente 48 meses. Na raça Brasileiro de Hipismo, aos 30 meses, Jones (1998) observou uma média de peso testicular de 73,3g. Já no cavalo Pantaneiro, dos 36 aos 40 meses, Melo et al., (1998) observaram uma média de 123,8g.

No presente estudo, verificou-se tendência do volume e peso do testículo esquerdo ser maior do que o do testículo direito, corroborando com os resultados de Paccamonti et al. (1999) e Kavak et al. (2003).

Hafez e Hafez, (2004) também observaram uma tendência do testículo esquerdo ser maior que o testículo direito, e sugeriu que a razão para essa diferença seria o fato de o testículo esquerdo se desenvolver de maneira mais precoce e rápida em relação ao testículo direito.

Além da biometria testicular e as análises de qualidade seminal, pesquisas vêm sendo realizadas em busca de marcadores moleculares que possam ser associados à fertilidade. Diversas proteínas já foram descritas como responsáveis pela habilidade dos espermatozoides: se movimentarem, vencerem as barreiras do trato feminino, alcançar o local de fecundação, ligar e fundir-se ao oócito e formar o zigoto (VARRICHIO et al., 1996; JONES, 1998). Porém, para que estas proteínas consigam atuar, estas devem estar em estágio ativo, ou seja, corretamente enoveladas, papel este efetuado por proteínas chamadas chaperonas, como por exemplo a PDI. Dentre as funções da PDI podemos citar a catálise da oxidação de cisteínas para a formação de pontes dissulfeto, processo que auxilia o enovelamento de proteínas destituídas de pontes dissulfeto (função chaperona) bem como a redução e re-arranjo de pontes dissulfeto em proteínas, ou seja, re-organização do posicionamento de pontes dissulfeto (LAURINDO et al., 2008).

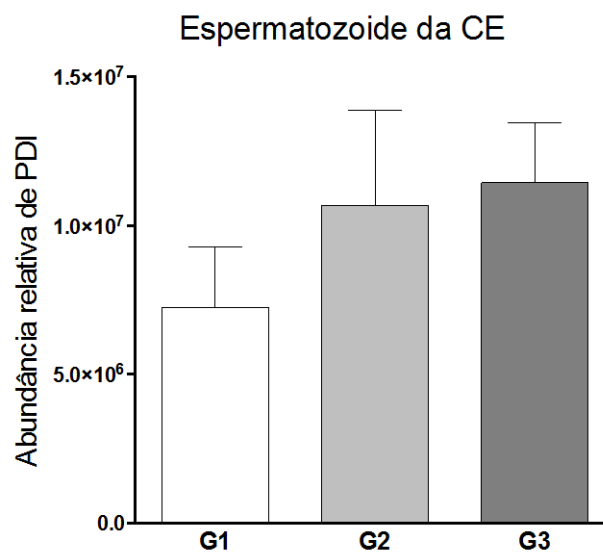
Através da manipulação de suas pontes dissulfeto, as PDI possuem importantes papéis em diferentes tecidos, pois ao oxidar, reduzir ou isomerar as ligações entre resíduos de cisteína, pode-se alterar as funções da proteína-alvo (BENHAM, 2013).

Considerando a análise proteômica, a PDI foi identificada nos três grupos avaliados, tanto na análise do fluido epididimário quanto na análise dos espermatozoides epididimários, corroborando com o observado em suínos

(SCHORR-LENZ, 2014) e javalis (AKAMA, 2010). Em ratos (ZAHO et al., 2013), a PDI A3, outra proteína da família das PDIs, foi verificada em pequena quantidade no acrossoma, mas principalmente na membrana espermática íntegra, não sendo identificada no segmento equatorial. Zhang et al.(2007), em humanos, relataram resultados similares no testículo humano e nos espermatozóides.

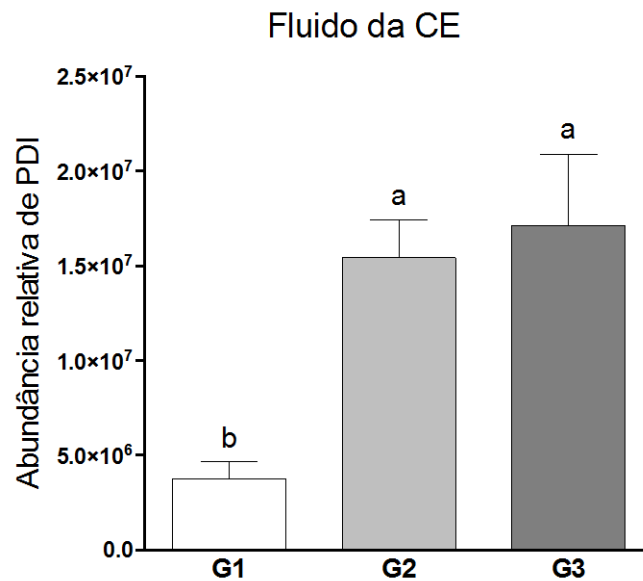
Quando se comparou a expressão desta chaperona nos espermatozóides epididimários, o G1 apresentou uma quantidade de PDI inferior aos grupos 2 e 3, resultado este que sugere que a presença desta proteína aumenta conforme o animal atinge a maturidade sexual. Porém não houve diferença ($p < 0,05$) na quantificação das proteínas entre os grupos (figura 4) o que pode estar relacionado ao número de amostras.

Figura 4: Quantificação da expressão da PDI nos espermatozóides epididimários equinos.



Já na quantificação da PDI no fluido epididimário, observou-se uma quantidade de PDI inferior no G1 em relação aos grupos 2 e 3 (figura 5)

Figura 5: Quantificação da expressão da PDI no fluido da cauda do epidídimo eqüino.



Semelhante ao que foi observado nos espermatozóides epididimários, porém com uma diferença estatística significativa, a expressão da PDI no fluido epididimário apresentou-se elevada em animais maduros sexualmente, acompanhando as variações hormonais até a puberdade.

Foi proposto que a PDI pode controlar o nível extracelular de E2, quando houver a necessidade de compensar as flutuações em seus níveis plasmáticos (FU et al., 2009). Os autores citam ainda que altas concentrações de PDI podem auxiliar no acúmulo de E2 dentro das células, permitindo uma ativação mais intensa dos receptores de estrogênio, o que não ocorreria em células com concentrações fisiológicas menores desta chaperona. No mesmo artigo, foi demonstrado que o estrogênio ligado a PDI está protegido da inativação metabólica, viabilizando outro nível de controle da função estrogênica (HESS, 2000; HESS et al., 2001). Desta forma, a PDI pode efetivamente modular os níveis intracelulares de estrogênio, alterando a magnitude e duração de atividade (HESS, 2003). A principal função do estrógeno nos ductos eferentes tem sido atribuída à absorção de mais de 90% dos fluidos seminais com conseqüente concentração dos espermatozóides na saída para o epidídimo, interferindo diretamente na fertilidade. Ainda não está totalmente esclarecido como essa ação ocorre, porém já foi comprovado que a perda da atividade dos receptores estrogênicos no

homem ocasiona falhas na reabsorção de fluidos nos ductos eferentes (FU et al.,2009). A ação estrogênica também tem sido relacionada à manutenção da morfologia das células epiteliais dos ductos eferentes. No entanto, sabe-se que o equilíbrio entre andrógenos e estrógenos na regulação hormonal nos ductos eferentes é importante para se manter a fertilidade (LEE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; ARROTEIA,2012).

CONCLUSÃO

O presente experimento pode comprovar a expressão da PDI nos espermatozoides e fluido epididimários de potros castrados cirurgicamente, demonstrou ainda a associação entre a presença da PDI e o aumento da idade dos garanhões, podendo ser um marcador molecular potencial na determinação da puberdade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMA , K., HORIKOSH, T. ATSUSHI, S., NAKAHATA,S.,AKITSU,A. NIWA,N. INTOH, A.,KAKUI, Y., SUGAYA,M.,TAKEI,K.,. IMAIZUMI,N.,SATO,T., MATSUMOTO,R., IWAHASHI,H., KASHIWABARA,S.,BABA,T., Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta** V.1804 P. 1272–1284, 2010.

ANDERSON K. N., ANDERSON L. E., GLANZE W. D. **Mosby's Medical, Nursing and Allied Health Dictionary**. 5. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., p. 998, 1998.

ARROTÉIA,K.F., GARCIA,P.V. BARBIERI,M.F., JUSTINO,M.L.,PEREIRA, L.A.V. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics. InTech, 2012.

ASHRAFZADEH A., KARSANI, S.A., NATHAN S. Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. **International Journal of Medical Sciences** v.10(12) p.1649-1657,2013

BEDFORD, J. M. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, n. 2, p. 169-117, 1963.

BLANCHARD T. L., JOHNSON L., BRINSKO S. P., VARNER D. D., RIGBY S. L., HURTGEN J. P. Evaluation of Testicular Size and Function In 1–3-Year-Old Stallions. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**. v. 47, p. 332-335, 2001

BENHAM, A. M. Protein Secretion and the Endoplasmic Reticulum. **Cold Spring Harbor Perspectives on Biology**, doi:10.1101/cshperspect.a 012872 , 2013.

FIGUEIRÓ, G. **Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo na raça crioula**. Tese de Doutorado. PPGMV-UFSM, Santa Maria, 2010

FRITZ, I. B.; BURDZY.; SETCHELL, B.; BLASCHUK, O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell cell interactions in vitro. **Biology of Reproduction** ,v. 28 p. 1173- 1188, 198

FU,X., WANG,P., ZHU, B.T., Protein disulfide isomerase is a multifunctional regulator of estrogenic status in target cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v.112 p.127–137, 2008.

FU, X. M.; ZHU, B. T. Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDlp) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 115, n. 1-2, p. 20-29, 2009.

GARNER D. L., HAFEZ E. S. E. **Espermatozoides e Plasma Seminal**. In: HAFEZ S E. E., HAFEZ B. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 7. ed. p. 99-106, 2004.

HAMILTON, D. W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes; ductus epididymis and ductus deferens in the rat. In: HAMILTON, D. W.; GREEP, R. O. **Handbook of physiology**. Washington D.C.: American Physiological Society, v. 5, p. 259-301, 1975.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed., Barueri-SP: Manole, 513 p, 2004.

HESS, R, A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**. v. 5, p. 84–92, 2000.

HESS, R.A., ZHOU, Q., NIE,R., OLIVEIRA, C., CHO,H., NAKAYA, M., CARNES, K., Estrogens and epididymal function. **Reproduction and Fertility Development**, v.13, n.4, p273-283, 2001.

HESS RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**.v.1 p.52. 2003

JONES, R. Spermogenesis and sperm maturation to development of fertilizing

capacity. In: LAURIA, A. GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. Gametes, development and function. Roma: **Serono Symposia**. p.205-218, 1998.

JONES, D. N.. **Desenvolvimento testicular de equinos mestiços da raça Brasileira de Hipismo, de 1 a 30 meses de idade**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 89p. 1998

KAVAK A., LUNDEHEIM N., AIDNIK M., EINARSSON S. Testicular measurements and Daily Sperm Output of Tori and Estonian Breed Stallions. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, p. 167-169, 2003.

LEE, K-H.; BUNICK, C. F., BAHR, J.; BUNICK, D. Estrogen Regulation of Ion Transporter Messenger RNA Levels in Mouse Efferent Ductules Are Mediated Differentially Through Estrogen Receptor (ER) α and ER β . **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1534-1541, 2001.

MELO, M. I. V., SERENO, J. R. B., HENRY, M., CASSALI, G. D. 1998. Peripuberal sexual development of Pantaneiro Stallions. **Theriogenology**, 50, 727-737.

MAGALHÃES LAZARI, M.F, GAMEIRO LUCAS, T.F., YASUHARA, F., OLIVEIRA GOMES, G.R., SIO, E.R., ROYER, C., FERREIRA FERNANDES, S.A.: Estrogens receptors and function in the male reproductive system. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.8, p.923-933,2009.

MONTEIRO, G.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM, F.C.; PAPA, F.O. Comparison of Apoptotic Cells Between Cryopreserved Ejaculated Sperm and Epididymal Sperm in Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.552-556, 2013.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte -penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction. Development**, v. 74, p. 214-222, 2007.

NADEN J., AMANN R. P., SQUIRES E. L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 88, p. 167-176, 1990.

NAKAMURA, N.; MIRANDA-VIZUETE, A.; MIKI, K.; MORI, C.; EDDY, E. M. Cleavage of Disulfide Bonds in Mouse Spermatogenic Cell-Specific Type 1 Hexokinase Isozyme Is Associated with Increased Hexokinase Activity and Initiation of Sperm Motility. **Biology of reproduction**, v. 79, p. 537–545, 2008

NEILD, D.; MIRAGAYA, M.; CHAVES, G.; ALONSO, A.; GAMBAROTTA, M.; LOSINNO, L.; AGÜERO, A. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 h after ground transportation. **Animal Reproduction Science** v.94, p.92–95, 2006.

ORGBIN-CRIST, M. C. Recherches expérimentales sur la durée de passage des

spermatozoides dans l'épididyme du taureau. **Animal Biology and Animal Biochemistry**, v. 2, p. 51–108, 2008.

PACCAMONTI . L., BUITEN A. V., PARLEVLIEET J. M., COLENBRANDER B. Reproductive parameters of Miniature stallions. **Theriogenology**. v. 51, p. 1343-1349, 1999.

RIBAS, J.A.S. **Influência das estações cheia e seca nas características reprodutivas e seminais de garanhões da raça pantaneira**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2006.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. **Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation**. In **The Physiology of Reproduction** (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 999–1080. Raven Press, New York, 2006

SCHORR-LENZ, A.M., ALVES, J., HENCKES, N.A.C., SEIBEL, P.L., BENHAM, A.M., BUSTAMANTE-FILHO, I.C. GnRH immunization alters the expression and distribution of protein disulfide isomerases in the epididymis. **Andrology**, v. 4, p. 957–963, 2016.

SCOTT, T. W.; VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 456-461, 1967.

SUNDHEY, R.; AHUJA, T. S. P.; SINGHB, B. Changes in the membrane proteins of buck (*Capra hircus*) spermatozoa during epididymal maturation Small Rum. **Nature**, v. 16, p.251-261, 1995.

STUMP, T., RINALDO, P., OLIVA, S. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica, Artigo de Revisão. **O Mundo da Saúde**, São Paulo. v.33(4)p. 419-425, 2009

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 104-177, 2007.

VARRICCHIO, E.; LANGELLA, M.; MAHRAJAN, V.; PAINO, G. Structure and function of the mammalian epididymis. **Acta of Medicine Veterinary, Napoli**, v.42, p.221-234, 1996.

VOGLMAYR, J. K.; FAIRBANKS, G.; JACKOWITZ, M. A.; COLELLA, J. R. Post-testicular development changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 655-667, 1980.

WOLF F. R., ALMQUIST J. O., HALE E.B. Prepuberal and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**. v. 24, p. 761-773, 1965.

ZHAO, X.J., TANG,R.Z., WANG, M.L.,GUO,W.L. LIU,J., LI, L., XING I. Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells Reproduction in Domestic Animals. V.48,p. 59–63 .2013.

ZHANG, J.; WU, J.; et al. Erp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, p. 663-639, 20

Artigo 2:

Associação da proteína dissulfeto isomerase no sêmen equino e a fertilidade em garanhões.

Association of protein disulfide isomerase in equine semen and fertility in stallions.

Liana de Salles van der Linden¹, Ana Paula Binato Souza², Tayná Nauê Lopes², Anna Flávia Tischer da Silva², Luise Marcon Tomé², Ivan da Cunha Bustamante Filho², Adriana Pires Neves^{1,3}

-
- 1- PPGMA: Equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Av Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS, Brasil
 - 2- Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, UNIVATES. Rua Avelino Tallini, 171. Lajeado, RS, Brasil.
 - 3- Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Rua 21 de Abril,80, Dom Pedrito, RS Brasil.

RESUMO

A infertilidade é um aspecto importante na reprodução animal e humana, mas em muitos casos a causa é desconhecida. A comparação do sêmen de homens e outros mamíferos férteis e subférteis pela análise proteômica tem se mostrado um importante marcador de fertilidade. Uma família de proteínas que vem sendo estudada e foi identificada no plasma seminal foi a PDI, que é uma chaperona, responsável pela formação de pontes dissulfeto, ativando outras proteínas. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença da PDI no plasma seminal equino e espermatozoides ejaculados, quantificando-a e comparar a sua expressão no plasma seminal de garanhões férteis e subférteis. Foram utilizados 12 garanhões adultos que já haviam sido submetidos a pelo menos duas temporadas de monta na região da Campanha do Rio Grande do Sul, efetuando-se 4 coletas de cada garanhão, com um intervalo de 48h entre coletas. Imediatamente após a coleta, se analisou motilidade e vigor com auxílio de microscópio óptico e retirou-se uma alíquota de sêmen para avaliação das patologias espermáticas. A partir dos dados obtidos com as coletas, os garanhões foram divididos em dois grupos: o Grupo 1 foi formado por garanhões com motilidade não inferior a 70%, sendo que se trabalhou com uma motilidade média de $76,04 \pm 5,89\%$ e histórico reprodutivo de temporadas anteriores com índice de prenhez mínimo por temporada de 80%. O Grupo 2 foi formado por garanhões com motilidade igual ou inferior a 30%, com média de $11,83 \pm 11,21\%$, e histórico reprodutivo de temporadas anteriores de pouca ou nenhuma prenhez. Efetuadas as análises, as mostras foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos para separar o plasma seminal, sendo sobrenadante criopreservado em nitrogênio líquido à -196°C . Os pellets passaram por ressuspensão em PBS gelado. Posteriormente, os pellets de espermatozoides foram também armazenados à -196°C . As amostras foram submetidas à dosagem das proteínas, para serem submetidas à eletroforese, utilizando-se géis de poliacrilamida a 10% SDS-Page. Para imunodeteção das proteínas, efetuou-se a incubação do anticorpo primário específico por no mínimo, 6 horas a 4°C , e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-igG de camundongo ou anti-IgG de rato.

Na visualização das bandas foi utilizado o Kit de ECL em filmes de raio-X, e as bandas foram quantificadas pela utilização do software livre ImageJ. Ao analisar a

presença da PDI no plasma seminal dos garanhões, verificou-se sua expressão em ambos os grupos; porém não houve diferença ($p < 0,05$) na expressão da PDI entre eles. Não houve também relação da PDI com motilidade, nem com a concentração espermática. Considerando os dados obtidos no presente experimento, não se torna possível considerar a PDI como marcador de fertilidade em equinos. São necessários mais estudos que possam envolver outros fatores moleculares inclusive as demais proteínas da família das PDIs.

Palavras chave: fertilidade, garanhão, PDI

ABSTRACT

Infertility is an important aspect on human and animal reproduction, but in most cases, the cause remains unknown. Comparison of semen from human and other fertile and subfertile mammals through proteomics has been shown an important fertility marker. The PDI protein family (a chaperone) has been identified in seminal plasma; its function is to form disulfide bonds, activating other proteins. The aim of this work was to verify the presence of PDI in equine seminal plasma and sperm, quantify it and to compare its expression on seminal plasma from fertile and subfertile stallions. Twelve adult stallions with at least two breeding season were used. For the study, four collections of each animal were performed. Immediately after collection, analysis of motility, velocity and sperm morphology were performed. Stallions were divided in two groups, according to the semen analysis and previous breeding history: Group 1: motility greater than 70% and previous history of pregnancy rates higher than 80%; Group 2: sperm motility less or equal than 30% and breeding history of not less than 35% of pregnancy per season. After the analysis, samples were centrifuged at 800 g/10 minutes to remove seminal plasma. Supernatant was cryopreserved at -196° C. Pellets were resuspended in PBS, and also stored at -196° C. Proteins were quantified in the samples, using electrophoresis 10% SDS-Page. To protein immunodetection, samples were incubated with the primary antibody at least 6 hours at 4° C, and with secondary antibody with anti-mouse IgG peroxidase. To assess the bands, ECLKit in X-Ray films was used, and bands were quantified with the software ImageJ. The expression of PDI in seminal plasma was seen in both groups, but with no statistical difference between them. There was no correlation of PDI with sperm motility or concentration. According to these findings, it is not possible to consider PDI as a fertility marker in stallions. More research is needed, involving other molecular factors, including other PDIs family proteins.

Key words: fertility, stallion, PDI

Introdução

A infertilidade é um aspecto muito importante na reprodução animal e humana, mas ainda continua com muitos casos em que a causa é desconhecida. Investigações moleculares no plasma seminal e espermatozóides têm trazido novas informações para o entendimento da infertilidade no macho. A comparação do sêmen de homens e outros mamíferos férteis e subférteis pela análise proteômica tem se mostrado um importante marcador de fertilidade (ASHRAFZADEH, 2013).

Quando se fala em fertilidade, a primeira questão que se avalia são os espermatozóides, geralmente estes são descritos como células altamente especializadas e com uma única função, que é a fertilização. No entanto, vale ressaltar que o espermatozóide é a etapa final de um processo extremamente complexo, onde esta célula é desenvolvida e maturada para exercer sua função na fecundação, e este processo de especialização, com suas alterações bioquímicas e biofísicas é tão complexo que, até hoje, o mecanismo exato no seu aspecto celular e molecular ainda não foi completamente esclarecido (VARNER e JOHNSON, 2007).

No intuito de elucidar estas questões, pesquisas visando identificar as proteínas presentes no sêmen e esclarecer suas respectivas funções são consideradas um avanço na busca de marcadores moleculares de fertilidade.

Dentre estas pesquisas se exemplifica as HSP-1 e HSP-2, que estão associadas à superfície espermática e indica um papel importante na fecundação (EKHLASI-HUNDRIESER, 2005), as kinases, responsáveis pela ativação flagelar da cauda dos espermatozóides, calmodulina e calsemina, ativadoras de canais de Ca e a FmP, associada à motilidade progressiva de bovinos (SHIVASI et al., 1990). As proteínas CRISP espermáticas de eqüinos estão localizadas na região equatorial e pós-acrossomal da cabeça, bem como, na peça intermediária do flagelo, associadas à fusão espermática (SCHAMBONI, 1998).

Outra família de proteínas que vem sendo estudada e foi identificada no plasma seminal foi a PDI, que é uma chaperona, responsável pela formação de pontes dissulfeto, ativando outras proteínas (SCHNOEK, 1996), permite à interação lipídeos-proteínas na fusão espermatozóide-oócito, e ainda está relacionada com a atividade moduladora de estradiol (FU, 2008).

Zang et al.(2007), analisando testículos humanos, localizaram a proteína ERp57 nas células de Leydig, Sertoli e citoplasma do espermatozóide. Nos

espermatozóides humanos, a proteína estava evidente no flagelo e acrossoma, migrando para a região equatorial após a capacitação. Neste experimento, ao bloquearem a Erp57 com anticorpos, a capacidade de penetração dos espermatozóides na zona pelúcida foi significativamente reduzida.

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença da PDI no plasma seminal equino e espermatozóides ejaculados, quantificando-a e comparar a sua expressão no plasma seminal de garanhões férteis e subférteis.

Materiais e métodos

Animais, coletas e avaliação do sêmen

Foram utilizados 12 garanhões adultos, fora da estação de monta, entre 5 e 16 anos que já haviam sido submetidos a pelo menos duas temporadas de monta na região da Campanha do Rio Grande do Sul, Brasil, efetuando-se 4 coletas de cada garanhão, com um intervalo de 48h entre coletas. Para a coleta, foi utilizada uma vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma), e como manequim éguas no cio, contidas com peias. Imediatamente após a coleta, analisou-se a motilidade e vigor com auxílio de microscópio óptico e retirou-se uma alíquota de sêmen (20 μ) para avaliação das patologias espermáticas, preparando-se uma lâmina corada com panótico rápido (LB Interlab) e uma alíquota para avaliação de integridade de membrana por coloração supra vital (Botu-vital-Botupharma).

A partir dos dados obtidos com as coletas, os garanhões foram divididos em dois grupos: o Grupo 1 foi formado por garanhões com motilidade não inferior a 70%, sendo que se trabalhou com uma motilidade média de 76,04 \pm 5,89% e histórico reprodutivo de temporadas anteriores com índice de prenhez mínimo por temporada de 80%(Tabela 2) .

O Grupo 2 foi formado por garanhões com motilidade igual ou inferior a 30%, com média de 11,83 \pm 11,21% , e histórico reprodutivo de temporadas anteriores de índices de prenhez inferiores a 35%

Tabela 2: Número de éguas cobertas e prenhes dos garanhões utilizados no experimento nas duas últimas temporadas de monta. GF- Grupo férteis. GSF- Grupo subférteis. EC- éguas cobertas. EP- Éguas prenhes. PT- Índice de prenhez por temporada.

| G F | Temporada | EC | EP | PT % | GSF | Temporada | EC | EP | PT % |
|------------|------------------|-----------|-----------|-------------|------------|------------------|-----------|-----------|-------------|
| A | 2015/16 | 37 | 35 | 94,6 | G | 2015/16 | 25 | 0 | 0 |
| A | 2016/17 | 43 | 43 | 100 | G | 2016/17 | 21 | 0 | 0 |
| B | 2015/16 | 52 | 49 | 94,23 | H | 2015/16 | 65 | 21 | 33,33 |
| B | 2016/17 | 61 | 60 | 98,36 | H | 2016/17 | 83 | 27 | 32,53 |
| C | 2015/16 | 66 | 63 | 95,45 | I | 2015/16 | 32 | 9 | 28,12 |
| C | 2016/17 | 84 | 83 | 98,8 | I | 2016/17 | 38 | 8 | 21,05 |
| D | 2015/16 | 22 | 21 | 95,45 | J | 2015/16 | 43 | 3 | 6,97 |
| D | 2016/17 | 28 | 25 | 89,28 | J | 2016/17 | 38 | 4 | 10,52 |
| E | 2015/16 | 61 | 57 | 93,44 | K | 2015/16 | 27 | 0 | 0 |
| E | 2016/17 | 77 | 64 | 83,11 | K | 2016/17 | 19 | 0 | 0 |
| F | 2015/16 | 51 | 48 | 94,11 | L | 2015/16 | 43 | 7 | 16,27 |
| F | 2016/17 | 44 | 40 | 90,9 | L | 2016/17 | 37 | 5 | 13,51 |

Garanhões identificados por letras.

Efetuada as análises, as mostras foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos para separar o plasma seminal dos espermatozoides. O sobrenadante (plasma seminal) foi removido, acondicionado em Eppendorf e criopreservado em nitrogênio líquido à -196° C para posterior manipulação. Os pellets de espermatozoides passaram por ressuspensão em tampão fosfato (PBS) gelado. Procedeu-se a centrifugação a 800g por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se PBS novamente e a centrifugação foi feita novamente, para a retirada completa do plasma seminal. Posteriormente, os pellets de espermatozoides foram também armazenados à -196° C para serem encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia da Univates.

QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA PDI NO SÊMEN

As amostras, foram submetidas à dosagem das proteínas, utilizando-se o método de Kit BCA espectrofotômetro (Spectramax[®] Molecular Devices) para a leitura, para posteriormente serem submetidas à eletroforese, utilizando-se géis de poliacrilamida a 10% SDS-Page. (SIGMA, St. Louis, MO, USA). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, Bilerica, EUA) e o sistema foi colocado em um cassete de transferência

Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Após transferência, a membrana foi incubada com M-TPBS (tampão PBS, adicionado de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado) por 60 minutos a 4° C a fim de se obter o bloqueio de sítios não ocupados na mesma.

Para imunodeteção das proteínas, efetuou-se a incubação do anticorpo primário específico (anti-PDI) por no mínimo, 6 horas a 4° C, e incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-igG de camundongo ou anti-IgG de rato (Amershan Pharmacia).

Na visualização das bandas utilizou-se o Kit de ECL (Enhanced Chemiluminescence - Millipore, Bilerica, EUA) em filmes de raio-Xe as bandas quantificadas pela utilização do software livre ImageJ.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da quantidade das proteínas entre os grupos foi realizada pelo teste t de student, ou ANOVA e TUKEY, realizado com o software Prism 6 (GraphPad) adotando nível de significância de 5%.

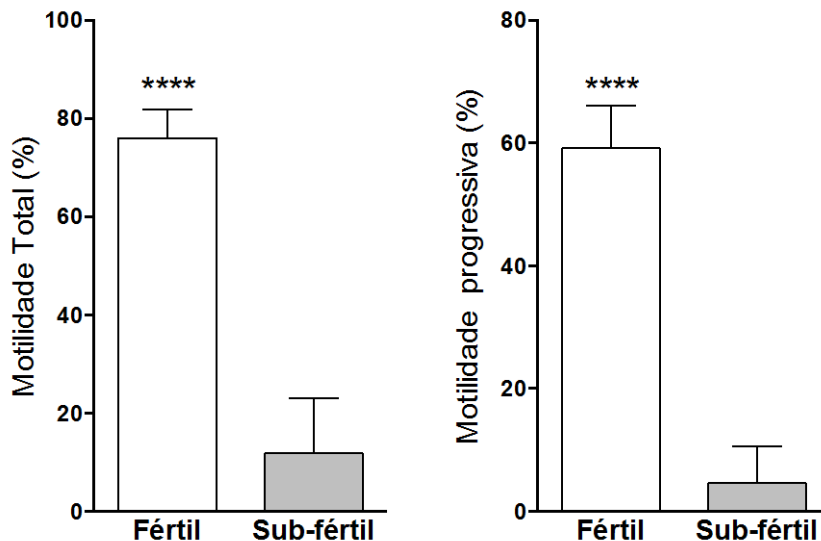
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade seminal é considerada um dos principais fatores que podem alterar os índices reprodutivos. Na década de 50, autores relataram que a variação da fertilidade poderia ser determinada a partir de diferentes padrões seminais. Haag (1959) verificou que melhores índices de concepção eram obtidos por garanhões que apresentavam mais de 50% de motilidade e percentuais de espermatozoides anormais inferiores a 40%. Porém Bielanski (1975) encontrou garanhões com altos índices de anormalidades morfológicas com excelente fertilidade. Já nos anos 80, Kenney et al. (1983) verificaram que a associação de concentração espermática, percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e a motilidade eram as características seminais que melhor explicavam a variação na taxa de prenhez obtida no fim de uma temporada de monta. Tais características serviram de base

para determinar um padrão qualitativo que pudesse auxiliar na interpretação do exame de sêmen. Amann (2005) revisou 67 publicações que questionavam a fertilidade em periódicos científicos da área de reprodução animal, e concluiu que 76% possuíam alguma falha ou fragilidade na avaliação dos animais como férteis ou sub férteis, e concluiu que para um estudo ter resultados confiáveis, além dos parâmetros espermáticos, deve-se utilizar pelo menos 3 garanhões, além de um número de fêmeas elevado pois o fator fêmea também altera diretamente os resultados de fertilidade.

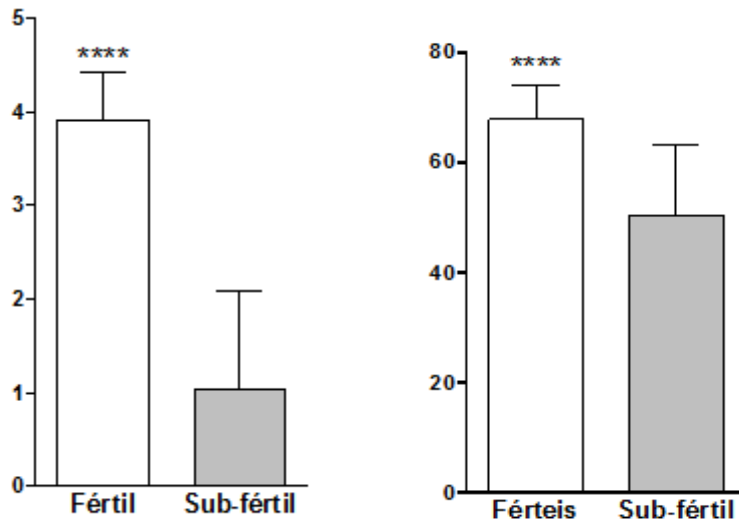
Considerando os fatores descritos acima, os grupos foram formados. Um dos primeiros fatores avaliados para a divisão dos grupos foi a motilidade. O grupo dos garanhões férteis obteve uma média de MT de $76 \pm 5,89\%$ e MP de $59,16 \pm 6,86\%$; corroborando com os dados obtidos por van der Linden et al.(2014), quando foram avaliados os parâmetros seminais de garanhões da raça Crioula. Já o grupo dos subférteis, MT $12,5 \pm 10,36\%$ e MP $52,5 \pm 5,26\%$, demonstrado nas figuras a seguir: (Figura 6 a; Figura 6 b)

Figura 6 a: Valores médios de motilidade total (mt) dos grupos férteis e sub férteis. Figura 6 b : Valores médios de motilidade progressiva(mp) dos grupos férteis e sub férteis. * acima das barras indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).



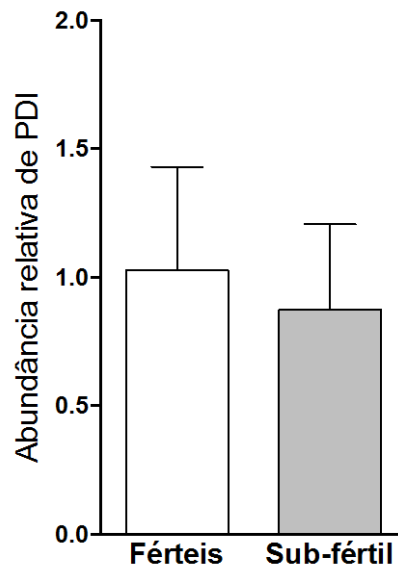
O vigor e a integridade de membrana também foram considerados: em ambas as avaliações, houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, sendo que o grupo dos férteis apresentou Vigor médio mais elevado (Figura 7 a) e maior número de células com membranas integras (Figura 7 b).

Figura 7 a : Valores médios de Vigor Espermático dos grupos de garanhões férteis e sub férteis. Figura 7b: Valores médios de integridade de membrana de garanhões férteis e sub férteis. * acima das barras indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).



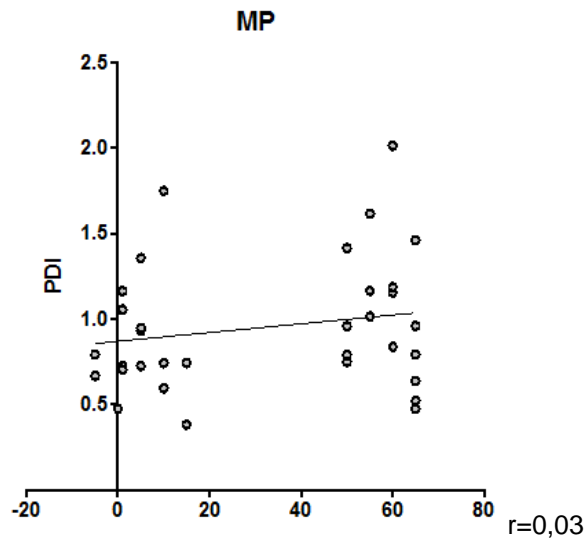
Ao analisar a presença da PDI no plasma seminal dos garanhões, verificou-se a expressão desta chaperona em ambos os grupos; porém não houve diferença ($p < 0,05$). (Figura 8)

Figura 8: Quantificação da expressão da PDI no plasma seminal equino.



Ao relacionar a quantificação da PDI com a motilidade progressiva, não foi encontrada diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, ou seja, a presença desta chaperona não interferiu na motilidade espermática (Figura 9).

Figura 9: Relação entre a Motilidade Progressiva (MP) e a expressão da PDI no plasma seminal equino



Os mecanismos de ação das PDIs e suas interações com suas proteínas clientes (alvo) ainda não foram totalmente elucidados, podendo estas ser membros de vias de sinalização ou proteínas efetoras de funções fisiológicas. Os dados obtidos de proteômica e expressão gênica do epidídimo em bovinos (MOURA et al.2009) e javalis (SYNTIN et al.2012) auxilia a estimar o papel desempenhado pelas PDI no controle de atividade e função de outras proteínas, como sua interação com a clusterina que é uma proteína termoestável, sensível a digestão por tripsina (FRITZ et al., 1983). Atualmente a clusterina é considerada uma molécula multifuncional envolvida em variadas atividades como controle de ciclo celular, proliferação, interação célula-célula, reciclagem de membrana e apoptose (JONES e JOMARY, 2002; TROUGAKOS e GONOS, 2002). Salehi et al. (2013) observou que em homens férteis, a clusterina é mais elevada que em indivíduos inférteis, estando os valores correlacionados negativamente com a deficiência de protaminas, fragmentação de DNA espermático e patologia espermática. Já em bovinos, a associação entre a clusterin e a qualidade seminal foi verificada por que se correlacionou esta proteína à congelabilidade (crioresistência) do sêmen (Jobim et al., 2004). Tais características apontam a clusterina como um potencial marcador de qualidade seminal masculina; sua atividade é dependente de sua conformação heterodimérica mantida por pontes dissulfeto, podendo então, as PDIs estarem associadas ao controle de sua função

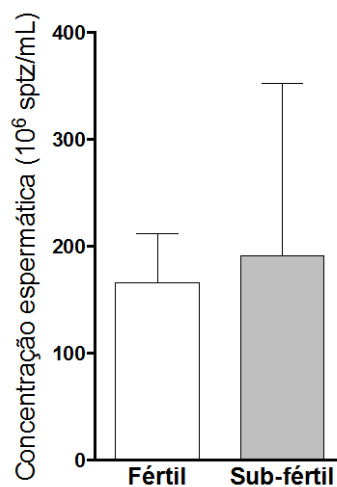
diretamente (BROPHY ET al., 2013)

O mecanismo que ativa a motilidade espermática depende de diversos fatores, como a produção de cAMP, que ativa a proteína kinase A (PKA) e resulta na fosforilação de certas proteínas (GADELLA e GESTEL, 2004) como as proteínas de ancoragem de A-quinase (AKAP-3) que são de interesse específico, pois é uma proteína que se apresenta nas fibras densas externas do flagelo do espermatozóide (FICCARO, et al., 2003) e, portanto, liga a sinalização PKA com a indução específica de capacitação de tirosina kinase que, por sua vez, causa extensa fosforilação de tirosina de proteínas na cauda de espermatozóide (LECLERC et al., 1996);

A ação da PDI na conversão do dímero de hexoquinase isozima tipo 1 em monômeros causa um aumento atividade da hexoquinase aumentando conseqüentemente a motilidade do espermatozóide (NAKAMURA 2008). Estudos recentes apontaram a angiotensina II como tendo propriedade cinéticas (SABEUR et al., 1999) e estando diretamente envolvida na motilidade da cauda (YEUNG et al., 1999); e dependente da ação chaperona PDI (DIAS,2011).

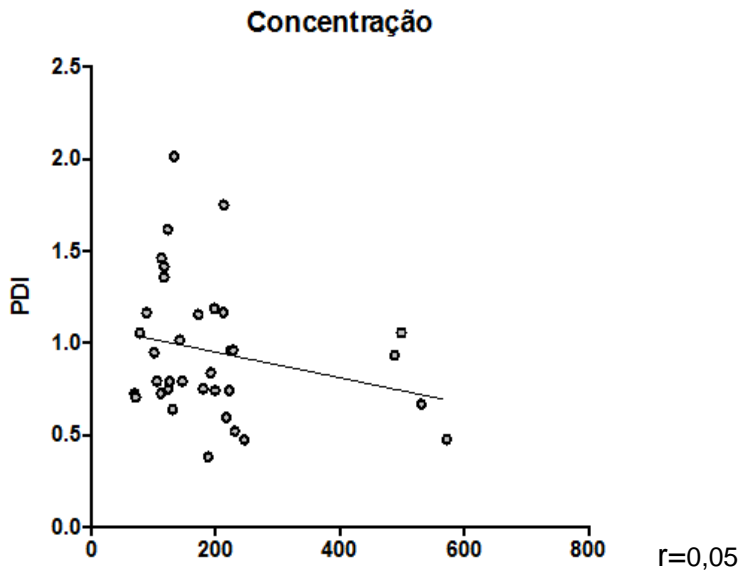
Em relação à concentração espermática, não houve variação significativa entre os grupos (Figura 10).

Figura 10: Concentração espermática de garanhões férteis e sub férteis. * acima das barras indicam diferença estatística ($P \leq 0,05$).



O mesmo ocorreu ao correlacionar à concentração espermática com a expressão da chaperona no plasma seminal.

Figura 11: Relação entre a expressão da PDI e concentração espermática



Não foi encontrada correlação entre a expressão de PDI no plasma seminal e concentração espermática. A PDI está relacionada com a concentração espermática no epidídimo por modular os níveis intracelulares de estrogênio, alterando a magnitude e duração de sua atividade (HESS, 2003). A principal função do estrogênio nos ductos eferentes tem sido atribuída à absorção de mais de 90% dos fluidos seminais com conseqüente concentração dos espermatozóides na saída para o epidídimo, interferindo diretamente na fertilidade. Ainda não está totalmente esclarecido como essa ação ocorre, porém já foi comprovado que a perda da atividade dos receptores estrogênicos no homem ocasiona falhas na reabsorção de fluidos nos ductos eferentes (FU et al., 2009). Porém, a concentração espermática do ejaculado não depende apenas da ação do fluido epididimário, sofrendo influência de diversos fatores como a sazonalidade (RIBEIRO, 2015), stress (WAGENMAKER et al., 2009), volume testicular (SQUIRES e PICKETT, 2011), manejo, freqüência de coberturas (HUNGTINGTON, 2012), idade (DOWSETT e KNOTT; 1996), além do uso de anabólicos, que reduz drasticamente a concentração espermática (SQUIRES, et al., 1982).

Estudos feitos em ratos identificaram a presença de PDIs nos espermatozóides (ELLERMANN et al., 2006). No presente estudo, os

espermatozoides ejaculados foram submetidos também à análise proteômica, porém a chaperona estudada não foi identificada, corroborando com o verificado em suínos (SCHORR-LENZ, 2016).

CONCLUSÃO

Considerando os dados obtidos no presente experimento, não se torna possível considerar a PDI como marcador de fertilidade em equinos. A fertilidade é um conjunto de interações complexas de diversos fatores, que podem envolver não apenas a bioquímica, mas também fatores externos como manejo, clima, nutrição, genética, entre outros. São necessários mais estudos que possam envolver outros fatores moleculares, inclusive as demais proteínas da família das PDIs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P..Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species **Theriogenology**. v. 63,P.698–715,2005.

ASHRAFZADEH A., KARSANI, S.A., NATHAN S. Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. **International Journal of Medical Sciences** v.10(12) p.1649-1657,2013

BIELANSKI,W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. v.23, p.19-24,1975

BROPHY TM, COLLER BS, AHAMED J. Identification of the thiol isomerase-binding peptide, mastoparan, as a novel inhibitor of shear-induced transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) activation.**Journal of Biology Chemistry**., v. 288 p.10628-39, 2013

DIAS, A. A. S.; **Papel da proteína dissulfeto isomerase na reatividade vascular à angiotensina II e noradrenalina: envolvimento da NADPH oxidase**.Tese de Doutorado. São Paulo , 2011.

DOWSETT K.F.; KNOTT, L.M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**. v. 46, p.397-412, 1996.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MULLER, P.; TOPFER-PETERSEN, E.. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction. Development**.v.70, p.45-57. 2005

ELLERMAN, DIEGO; MYLES, DIANA; PRIMAKOFF, PAUL. A Role for Sperm Surface Protein Disulfide Isomerase Activity in Gamete Fusion: Evidence for the Participation of ERp57. **Developmental Cell** v.10, p.831–837, 2006

FICARRO S, CHERTIHIN O, WESTBROOK VA, WHITE F, JAYES F, KALAB P, MARTO JA, SHABANOWITZ J, HERR JC, HUNT DF, VISCONTI PE. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. **Journal of Biology and Chemistry**, v.278 p.11579-11589, 2003.

FRITZ, I. B.; BURDZY.; SETCHELL, B.; BLASCHUK, O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell cell interactions in vitro. **Biology of Reproduction** ,v. 28 p. 1173- 1188, 1983

FU,X., WANG,P., ZHU, B.T., Protein disulfide isomerase is a multifunctional regulator of estrogenic status in target cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v.112 p.127–137, 2008.

GADELLA BM, VAN GESTEL RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. **Animal Reproduction Science**, v.307,p.82-83,2004

HAAG, F.M. Evaluation of "dismount" semen in thoroughbred horse breeding. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.1, p.312-314, 1959.

JOBIM, M. I., OBERST, E. R., SALBEGO, C. G., WALD, V. B., HORN, A.P. MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 7, p. 2053-2062, 2004.

JONES,S.E.,JOMARY,C.Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. **ByoEssais**. v.24 [9],p. 811–820, 2002

KENNEY, R.M., HURTGEM, J.P.; PERSON, R., *et al.* **Society for theriogenology: manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings, NB : ni, 1983. 100p.

LECLERC P, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate 549 dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. **Biology Reproduction**; v.55, p.684-692, 1996

MOURA, A. A.; KOCK, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2009.

RIBEIRO, J.P.,PRADO, L.G.,SANTOS, F.A. CAPISTRANO, G., CASTRICINI, E.S.C., Avaliação da concentração e motilidade espermática de dois garanhões em diferentes estações do ano. São Paulo, FEPI, 2015.

SALEHI, M. et al. Correlation Between Human Clusterin in Seminal Plasma With Sperm Protamine Deficiency and DNA Fragmentation. **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 718– 724, 2013.

SCHAMBONY, A.; HESS, O.; GENTZEL, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v.53, p.67-72, 1998.

SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced “in vitro” by the bovine seminal protein aSFT effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Stoneham, v.45, p.633-642, 1996.

SCOTT, T. W.; VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 456-461, 1967.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 526p. 1990.

SCHORR-LENZ, A.M., ALVES, J., HENCKES, N.A.C., SEIBEL, P.L., BENHAM, A.M., BUSTAMANTE-FILHO, I.C. GnRH immunization alters the expression and distribution of protein disulfide isomerases in the epididymis. **Andrology**, v. 4, p. 957–963, 2016.

SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Spermatogenesis. **Nature**, v. 426, p. 891-894, 2003.

SQUIRES, E. L. TODTER, G. E. BERNDTSON W. E. PICKETT B. W. Effect of Anabolic Steroids on Reproductive Function of Young Stallions **Journal of Animal Science**, v.54, p.576-582, 1982.

SQUIRES E. L, PICKETT B. W. **Factors affecting sperm production and output**. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D. (Eds). Equine Reproduction. 2. Ed. Wiley-Blackwell v. 1, 1344-1360, 2011.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 104-177, 2007.

VAN DER LINDEN, L.S., BUSTAMANTE-FILHO, I.C., SCHIAVO, S.D., PERES MACIEL, M.A., RODRIGUES, M.F., dos SANTOS, S.I., MATTOS, R.C., NEVES, A.P. Use of *Rhea americana* egg yolk in extender in stallion semen cryopreservation. **Pferdeheilkunde**, v.30, p.61-64, 2014.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 15, p. 35-44, 2004.

YEUNG, C.H.; WEINBAUER, G.F.; COOPER, T.G. Responses of monkey epididimal sperm of different maturational status to secondary messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. **Biologic Reproduction**, Madison, v.60, suppl.1, p.206, 1999.

ZHANG, J.; WU, J.; et al. Erp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, p. 663-639, 2007.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento das funções da PDI no processo de espermatogênese e maturação espermática no epidídimo é essencial para elucidar questões referentes aos fenômenos bioquímicos e morfológicos que regem a formação de um espermatozóide apto a fertilizar o oócito

Neste estudo não foi possível avaliar se a PDI é produzida no epidídimo ou é secretada pelo testículo; porém com os dados obtidos sugere-se que a atuação principal da proteína é diretamente na maturação espermática.

Demonstrou-se a presença da PDI no fluido epididimário e espermatozoides epididimários, sendo que no fluido epididimário houve um aumento da expressão desta chaperona conforme a idade. Este fato provavelmente está ligado ao aumento de secreção hormonal com a chegada da puberdade.

Na avaliação proteômica do sêmen ejaculado, observou-se a presença da PDI no plasma seminal, mas não nas células espermáticas. Não houve diferença entre cavalos férteis e sub férteis, portanto não foi possível no âmbito deste trabalho associar a presença da PDI com a fertilidade.

Outros estudos complementares deveriam ser realizados analisando a presença de outras proteínas da família das PDIs, bem como a seleção de grupos de garanhões com bons parâmetros seminais, porém subférteis, ou seja, com motilidade e vigor elevados, baixas patologias e baixos índices de prenhez.

A quantificação desta proteína poderia servir como indicativo de puberdade em equinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMA , K., HORIKOSH, T. ATSUSHI, S., NAKAHATA,S.,AKITSU,A. NIWA,N. INTOH, A.,KAKUI, Y., SUGAYA,M.,TAKEI,K., IMAIZUMI,N.,SATO,T., MATSUMOTO,R., IWAHASHI,H., KASHIWABARA,S.,BABA,T., Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta** V.1804 P. 1272–1284, 2010.

AMANN R. P. **Physiology and endocrinology**. In: MCKINNON A. O, VOSS J. L. (Eds.). *Equine Reproduction*. Lea e Febiger, Pennsylvania, USA. p. 658-685, 1993.

AMANN, R.P..Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species **Theriogenology**. v. 63,P.698–715,2005.

AMANN R. P. **Physiology and Endocrinology**. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D. (Eds.). *Equine Reproduction*. 2. Ed. Wiley-Blackwell v. 1, p. 881-908, 2011

ANDERSON K. N., ANDERSON L. E., GLANZE W. D. **Mosby’s Medical, Nursing and Allied Health Dictionary**. 5. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., p. 998, 1998.

ARROTÉIA,K.F., GARCIA,P.V. BARBIERI,M.F., JUSTINO,M.L.,PEREIRA, L.A.V. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics. InTech, 2012.

ASHRAFZADEH A., KARSANI, S.A., NATHAN S. Mammalian Sperm Fertility Related Proteins. **International Journal of Medical Sciences** v.10(12) p.1649-1657,2013.

BARDIN C. W., CHENG C. Y., MUSTOW N. A., GUNSALUS G. L. **The Sertoli cell**. In: KNOBIL E., NEIL J. D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. 2. Ed. Raven Press, New York. p. 1291-1331, 1994.

BARDIN C. W. The Anabolic Action of Testosterone. **The New England Journal of Medicine**. v. 335, p. 52-53, 1996.

BEDFORD, J. M. Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, n. 2, p. 169-117, 1963.

BIELANSKI,W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. v.23, p.19-24,1975

BLANCHARD T. L., JOHNSON L., BRINSKO S. P., VARNER D. D., RIGBY S. L., HURTGEN J. P. Evaluation of Testicular Size and Function In 1–3-Year-Old Stallions. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**. v. 47, p. 332-335, 2001.

BENHAM, A. M. The protein disulfide isomerase family: Key players in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, p. 781-789, 2012.

BENHAM, A. M. Protein Secretion and the Endoplasmic Reticulum. **Cold Spring Harbor Perspectives on Biology**, doi:10.1101/cshperspect.a 012872 , 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) **Equinos - mercado interno**. Brasília, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>. Acesso em: 19 set. 2016.

BROPHY TM, COLLIER BS, AHAMED J. Identification of the thiol isomerase-binding peptide, mastoparan, as a novel inhibitor of shear-induced transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) activation. **Journal of Biology Chemistry**., v. 288 p.10628-39, 2013.

BURNETTE, W.N., "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. **Analytical Biochemistry**. v. 112, p.195-203, 1981.

BYRNE, J. ,SIDHU, A. ,WALLIS, RUDDOCK L.,FREEDMAN, R., HOWARD, M.J, WILLIAMSON, R. Mapping of the ligand-binding site on the b domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region. **Biochemical Journal**, v.423, p.209–217, 2009

CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; GENTZEL, M.; URBANKE, C.; SANZ, L.; TOPFER-PETERSEN, E.. **Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholinebinding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1**. FEBS Lett. 407(2):201-6.1997

CALVETE, J.J.; CAMPANERO-RHODES, M.A.; RAIDA, M.; SANZ, L. **Characterization of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109**. FEBS Lett. 444(2-3):260-4. 1999.

CHEUNG KH, LEUNG GP, LEUNG MC, SHUM WW, ZHOU WL, WONG PY. Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. **Journal of General Physiology**. 125:443-54, 2005 .

CLERMONT Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**. v. 52, p. 1198-1236, 1972

CORNWALL, G.A.; ORGEBIN-CRIST, M.C.; HANN, S.R.. The CRES gene: a uniuqetestis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. **Molecular Endocrinology**. 6:1653-1664,1992.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, v. 4, n. 1-2, p. 53-72, 2003

DE GENDT K., SWINNEN J. V., SAUNDERS P. T., SCHOONJANS L., DEWERCHIN M., DEVOS A., TAN K., ATANASSOVA N., CLAESSENS F., LÉCUREUIL C., HEYNS W., CARMELIET P., GUILLOU F., SHARPE R. M.,VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, p. 1327-1332, 2004.

DYM M., MADHWA RAJ H. G. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of LH and testosterone. **Biology Reproduction**. v. 17, p. 676-696, 1977.

DACHEUX JL, CASTELLA S, GATTI JL, DACHEUX F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**. 63:319-41, 2005

DENISOV, A.Y.,MAATTANEN, P., SPRULES, T., THOMAS, D.Y., GEHRING,K., 1H, 13C and 15N resonance assignments of the bb' domains of human protein disulfide isomerase. *Biomol NMR Assign*. v.1, p.129-130, 2007

DIAS, A. A. S.; **Papel da proteína dissulfeto isomerase na reatividade vascular à angiotensina II e noradrenalina: envolvimento da NADPH oxidase.**Tese de Doutorado. São Paulo , 2011.

DOWSETT K.F.; KNOTT, L.M. The influence of age and breed on stallion semen. **Theriogenology**. v. 46, p.397-412, 1996.

EBRAHIMIAN T, TOUYZ R.M.; Thioredoxin in vascular biology : role in hypertension.**Antioxidants & redox signaling**.v 10, p. 1127-36, 2008.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MULLER, P.; TOPFER-PETERSEN, E.. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction. Development**.v.70, p.45-57. 2005

ELLERMAN, DIEGO; MYLES, DIANA; PRIMAKOFF, PAUL. A Role for Sperm Surface Protein Disulfide Isomerase Activity in GameteFusion: Evidence for the Participation of ERp57. **Developmental Cell** v.10, p.831–837, 2006

FELISBINO, S. L. Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*. **Tissue and Cell**, v. 39, p. 47-57, 2007.

FICARRO S, CHERTIHIN O, WESTBROOK VA, WHITE F, JAYES F, KALAB P, MARTO JA,SHABANOWITZ J, HERR JC, HUNT DF, VISCONTI PE.

Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. **Journal of Biogy and Chemical**, v.278 p.11579-11589, 2003.

FIGUEIRÓ, G. **Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo na raça crioula**. Tese de Doutorado. PPGMV-UFSM, Santa Maria, 2010

FLICKINGER, CJ,SUN, E.L., Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. **The Anatomical Record**. v. 203[2] p. 273–284, 1982

FOURNIER-DELPECH, S.; THIBAUT, C..**Acquisition of sperm fertilizing ability. Epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: Reproduction in mammals and man**. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter (eds.) Ellipses. Paris. P.257-278. 1993

FRANÇA L. R, RUSSELL L. D. **The testis of domestic mammals**. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F., REGADERA J. (Eds). Male reproduction; a multidisciplinary overview. Churchill Communications Europe, Madrid, España, p.198-219, 1998.

FU,X., WANG,P., ZHU, B.T., Protein disulfide isomerase is a multifunctional regulator of estrogenic status in target cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v.112 p.127–137, 2008.

FU, X. M.; ZHU, B. T. Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 115, n. 1-2, p. 20-29, 2009.

GADELLA BM, VAN GESTEL RA. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function.**Animal Reproduction Science**, v.307,p.82-83,2004

GARNER D. L., HAFEZ E. S. E. **Espermatozóides e Plasma Seminal**. In: HAFEZ S E. E., HAFEZ B. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole. 7. ed. p. 99-106, 2004.

GRAVEN, K. K.; MOLVAR, C.; RONCARATI, J. S.; KLAHN, B. D.; LOWREY, S.;FARBER, H. W. Identification of protein disulfide isomerase as an endothelial hypoxic stress protein. **American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, v. 282, n. 5, p. 996-1003, 2002.

HAAG, F.M. Evaluation of "dismount" semen in thoroughbred horse breeding. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.1, p.312-314, 1959.

HAMILTON, D. W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes; ductus epididymis and ductus deferens in the rat. In: HAMILTON, D. W.; GREEP, R. O. **Handbook of physiology**. Washington D.C.: American Physiological Society, v. 5, p. 259-301, 1975.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed., Barueri-SP: Manole, 513 p, 2004.

HINTON BT, SETCHELL BP. FLUID SECRETION AND MOVEMENT. RUSSELL LD, GRISWOLD MD, editors. **The Sertoli cell**. Vienna IL: Cache River Press; 1993.

HINTON, B.T.; PALLADINO, M.A.; RUDOLPH, D.; LADUS, J. . The epididymis as protector of maturing spermatozoa. **Reproduction and Fertility Development**. 7: 731-745. 1995

HINTON, B.T; PALLADINO, M.A.; RUDOLPH, D.; LAN, Z.J.; LABUS, J.C.. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. **Currents Topics on Developmental Biology** 33, 61-102. 1996

HINTON, B. T. et al. How Do You Get Six Meters of Review Epididymis Inside a Human Scrotum? **Journal of Andrology**., v. 32, n. 6, 2011.

HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cytology**, v. 154, p. 105, 119, 189, 1994.

HERMO L, CHONG DL, MOFFATT P, SLY WS, WAHEED A, SMITH CE. Region - and cell -specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.53, p.699-713, 2005 .

HESS, R, A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**. v. 5, p. 84–92, 2000.

HESS, R.A., ZHOU, Q., NIE,R., OLIVEIRA, C., CHO,H., NAKAYA, M., CARNES, K., Estrogens and epididymal function. **Reproduction and Fertility Development**, v.13, n.4, p273-283, 2001.

HESS RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**.v.1 p.52. 2003

HOLYOAK G. R., LITTLE T. V., VERNON M., MCCOLLUM W. H., TIMONEY P.J. Correlation between ultrasonographic findings and serum testosterone concentration in prepubertal and peripubertal colts. **American Journal of Veterinary Research**. v. 55, n. 4, p. 450-457, 1994.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M. ORINO, K. OHNSMI, Y. WATANABE, K. Purification and qualification of lactoferrin in equine seminal plasma. **the Journal of Veterinary Medicine Science**. V. 64, p.75-77, 2002.

IKAWA, M.; KEIZO, T.; RYO, Y.; BENHAM, A. M. Casperin is a testis-specific chaperon required for sperm fertility. **Journal of Biology and Chemistry**., v. 286, p. 5639-5646, 2011.

IMAOKA, S. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. **International review of cell and molecular biology**, v. 290, p. 121-166, 2011.

JAISWAL, B.S.; MAJUNDER, G.C. Biochemical parameters regulating forward motility "in vitro" in goat immature epididymal spermatozoa. **Reproduction Fertility Development**, v.10, p.299-307, 1998.

JOBIM, M. I., OBERST, E. R., SALBEGO, C. G., WALD, V. B., HORN, A.P. MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 7, p. 2053-2062, 2004.

JOHNSON L., NEAVES W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**. v. 24, p. 703-712, 1981

JOHNSON L., TATUM M. E. Temporal appearance of seasonal changes in numbers of Sertoli cells, Leydig cells, and germ cells in stallions. **Biology of Reproduction**. v. 40, p. 994-999, 1989.

JOHNSON L. **Spermatogenesis**. In: CUPPS P. T., (Ed.). *Reproduction in Domestic Animals*, 4. ed. Academic Press, New York, p. 173-219, 1991.

JOHNSON L., BLANCHARD T. L., VAMER D. D., SCRUTCHFIELD W. L., Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**. v. 48, p. 1199-1216, 1997.

JONES, R. Spermiogenesis and sperm maturation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A. GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. *Gametes, development and function*. Roma: **Serono Symposia**. p.205-218, 1998.

JONES, D. N.. **Desenvolvimento testicular de equinos mestiços da raça Brasileira de Hipismo, de 1 a 30 meses de idade**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 89p. 1998

JONES,S.E.,JOMARY,C.Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. **ByoEssais**. v.24 [9],p. 811–820, 2002

KALAB, P.; VISCONTI, P.; LECLERC, P. et al. P95, the major phosphotyrosinecontaining protein in mouse spermatozoa in a hexokinase with unique properties. **Journal of Biology Chemistry**., v.269, p.3810-3817, 1994.

KAVAK A., LUNDEHEIM N., AIDNIK M., EINARSSON S. Testicular measurements and Daily Sperm Output of Tori and Estonian Breed Stallions. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, p. 167-169, 2003.

KENNEY, R.M., HURTGEN, J.P.; PERSON, R., *et al*. **Society for theriogenology: manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings, NB : ni, 1983. 100p.

KIRCHHOFF, C.; OSTERHOFF, C.; PERA, I.; SCHROTER, S. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. **Andrologia**. 30, 225-232. 1998.

KIRKWOOD R. N., AHERNE F. X. Energy intake, body composition and reproductive performance of the gilt. **Journal of Animal Science**. v. 60, p. 1518-1529, 1985.

KORNOVSKY, B.S.; MCCHOSEN, J.; KRENTSER, J.; TORLEY, E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluran receptor. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.61, n.5, p.935-940, 1994.

KOZLOV, G.; MAATTANEN, P.; THOMAS, D. Y.; Gehring, K. A structural overview of the PDI family of proteins. **The FEBS journal**, v. 277, n. 19, p. 3924-3936, 2010.

LAURINDO FR, FERNANDES DC, AMANSO AM, LOPES, LR, SANTOS CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.10, p. 1101-13, 2008;

LECLERC P, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate 549 dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. **Biology Reproduction**; v.55, p.684-692, 1996 .

LEE, K-H.; BUNICK, C. F., BAHR, J.; BUNICK, D. Estrogen Regulation of Ion Transporter Messenger RNA Levels in Mouse Efferent Ductules Are Mediated Differentially Through Estrogen Receptor (ER) α and ER β . **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1534-1541, 2001.

LEUNG GP, CHEUNG KH, LEUNG CT, TSANG MW, WONG PY. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). **Molecular Cell Endocrinology** 2004;216:5-13.

LIEBERMANN, J. HAEGELE, F.; STECK, T.; DIETL, J. TNF-Alpha increases the motility of sperm in normo-oligozoospermic men. **Biology Reproduction**, Madison, v.6, suppl.1, p.134, 1999.

LIU, H.-W.; SHANG, S.-T.; CHAO, C.-F.; MULLER, C. The secretion of two sperm maturation-related glycoproteins in BALB/c mouse epididymis. **Cell Tissue Research**, v. 265, p. 409-414, 1991

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. Anatomia e fisiologia. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1072., 2009.

MELO, M. I. V., SERENO, J. R. B., HENRY, M., CASSALI, G. D. 1998. Peripuberal sexual development of Pantaneiro Stallions. **Theriogenology**, 50, 727-737.

MAGALHÃES LAZARI, M.F, GAMEIRO LUCAS, T.F., YASUHARA, F., OLIVEIRA GOMES, G.R., SIO, E.R., ROYER, C., FERREIRA FERNANDES, S.A.: Estrogens receptors and function in the male reproductive system. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, n.8, p.923-933,2009.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of reproductive immunology**. 53(1-2):109-19. 2002.

MONTEIRO, G.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM, F.C.; PAPA, F.O. Comparison of Apoptotic Cells Between Cryopreserved Ejaculated Sperm and Epididymal Sperm in Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.552-556, 2013.

MORAES, C. et al. Série em Biologia Celular e Molecular – **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. Rio de Janeiro. p 83., 2012

MILLER, D.J.; SHUR, B.D. Molecular basis of fertilization in the mouse. **Semen Development Biology**., v.5 p.255-264, 1994.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte -penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction. Development**, v. 74, p. 214-222, 2007.

MOURA, A. A.; KOCK, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2009.

MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. Function of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. **Biology Reproduction**., v.56, p.320-327, 1997.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides equinos criopreservados**. Dissertação Mestrado, Qualidade e Produtividade Animal. Universidade de São Paulo, Pirassuninga. 2006.

NADEN J., AMANN R. P., SQUIRES E. L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 88, p. 167-176, 1990.

NAKAMURA, N.; MIRANDA-VIZUETE, A.; MIKI, K.; MORI, C.; EDDY, E. M. Cleavage of Disulfide Bonds in Mouse Spermatogenic Cell-Specific Type 1 Hexokinase Isozyme Is Associated with Increased Hexokinase Activity and Initiation of Sperm Motility. **Biology of reproduction**, v. 79, p. 537–545, 2008.

NEILD, D.; MIRAGAYA, M.; CHAVES, G.; ALONSO, A.; GAMBAROTTA, M.; LOSINNO, L.; AGÜERO, A. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 h after ground transportation. **Animal Reproduction Science** v.94, p.92–95, 2006.

NEVES, E. S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatozogenico em jumentos (Equus asinus) e burros (Equus mulus mulus)**.

2001. 135p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2002.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 10, n. 5, p. 48-93, 1999.

OLIVA S.U., RINALDO, P.A., STUMPP, T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**. 33(4); 419-425. 2009

ORGBIN-CRIST M., OLSON G.E. **Epididymal sperm maturation**. In: Courot Martenies M, The Male in Farm Animal Reproduction, Martinus Nipnhoff, Dordrech, Netherlands p. 80-102, 1984.

ORGBIN-CRIST, M. C. Recherches expérimentales sur la durée de passage des spermatozoides dans l'épididyme du taureau. **Animal Biology and Animal Biochemistry.**, v. 2, p. 51–108, 2008.

PACCAMONTI . L., BUITEN A. V., PARLEVLIT J. M., COLENBRANDER B. Reproductive parameters of Miniature stallions. **Theriogenology**. v. 51, p. 1343-1349, 1999.

PHELPS, B.M.; MYLES, D.G. The guinea pig sperm plasma membrane protein PH-20, reaches the surface via two-transport pathways and becomes localized to a domain after initial uniform distribution. **Development Biologic**, v.123, p.63-72, 1987.

REID BL, CLELAND KW. The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. **Australian Journal of Zoology**,v. 5, p.223-245. 1957..

RIBAS, J.A.S. **Influência das estações cheia e seca nas características reprodutivas e seminais de garanhões da raça pantaneira**. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2006.

RIBEIRO, J.P., PRADO, L.G., SANTOS, F.A. CAPISTRANO, G., CASTRICINI, E.S.C., Avaliação da concentração e motilidade espermática de dois garanhões em diferentes estações do ano. São Paulo, FEPI, 2015.

RIEMER, J.; BULLEID, N.; HERMANN, J. M. Dissulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. **Science**, v. 324 n. 5932, p.1284-1287, 2009.

ROBAIRE B, HERMO L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. Knobil E, Neill J, editors. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press; 1988.

ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biology. Reproduction**. V. 52, p. 226-236. 1995

ROBAIRE, B.; HERMO, L. **Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation**. In **The Physiology of Reproduction** (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 999–1080. Raven Press, New York, 2006.

ROBAIRE, B., HINTON, B.T., The epididymis, **Male Reproduction**, c.17, p. 691-771, 2015

ROCHIRA V., ZIRILLI L., GENAZZANI A. D., BALESTRIERI A., ARANDA C., FABRE B., ANTUNEZ P., DIAZZI C., CARANI C., MAFFEI L. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. **European Journal of Endocrinology**. v. 155, p. 513-522, 2006.

SABEUR, K.; GRAVANCE, C.; BALL, B.A. Effects of angiotensin II on motility in equine sperm. **Biologic Reproduction**, Madison, v.60, suppl.1, p.136, 1999.

SALEHI, M. et al. Correlation Between Human Clusterin in Seminal Plasma With Sperm Protamine Deficiency and DNA Fragmentation. **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 718– 724, 2013.

SCHAMBONY, A.; HESS, O.; GENTZEL, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v.53, p.67-72, 1998.

SCHLATT S., MEINHARDT A., NIESCHLAG E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology**. v. 137, p. 107-117, 1997.

SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced “in vitro” by the bovine seminal protein aSFT effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, Stoneham, v.45, p.633-642, 1996.

SCHORR-LENZ, A.M., ALVES, J., HENCKES, N.A.C., SEIBEL, P.L., BENHAM, A.M., BUSTAMANTE-FILHO, I.C. GnRH immunization alters the expression and distribution of protein disulfide isomerases in the epididymis. **Andrology**, v. 4, p. 957–963, 2016.

SCHULTZ-NORTON, J.R. MCDONALD, W.H., YATES, J.R., NARDULLI, A.M., Protein Disulfide Isomerase Serves as a Molecular Chaperone to Maintain Estrogen Receptor :Structure and Function. **Molecular Endocrinology** v.20, p.1982–1995. 2006

SCOTT, T. W.; VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 456-461, 1967.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K.H.; BHARGAVA, P.M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 526p. 1990.

SHUPNIK M. A., SCHREIHOFER D. A. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. **Journal of Andrology**. v. 18, n. 4, p. 341-344, 1997.

SILVA, C.M.B. **Efeito da melatonina em espermatozoides de equinos**. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Spermatogenesis. **Nature**, v. 426, p. 891-894, 2003.

SQUIRES, E. L. TODTER, G. E. BERNDTSON W. E. PICKETT B. W. Effect of Anabolic Steroids on Reproductive Function of Young Stallions **Journal of Animal Science**, v.54, p.576-582, 1982.

SQUIRES E. L, PICKETT B. W. **Factors affecting sperm production and output**. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D. (Eds). Equine Reproduction. 2. Ed. Wiley-Blackwell v. 1, 1344-1360, 2011.

STEINER J. V., UMPHENOUR N. W. **Breeding management of the Thoroughbred Stallion**. In: Samper, J. C. (Eds.). Equine breeding management and artificial insemination. 2. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, p. 77, 2009.

STUMP, T., RINALDO, P., OLIVA, S. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica, Artigo de Revisão. **O Mundo da Saúde**, São Paulo. v.33(4)p. 419-425, 2009

SUÁREZ-QUIAN C. A., OKE B. O., MUSTO N. **Localization of the androgen receptor in the rodent testis**. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F., REGADERA J. (Eds.) Male reproduction; a multidisciplinary overview. Churchill Communications Europe Madrid, España. p. 114-124, 1998. SULLIVAN DC, HUMINIECKI L, MOORE JW, BOYLE JJ, POULSAN R, CREAMER D, BARKER J, BICKNELL R. Endo PDI, a novel protein disulfide isomerase – like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factors. **Journal of Biology Chemistry**. V.278 (47) p. 47079-88, 2003.

SUNDHEY, R.; AHUJA, T. S. P.; SINGH, B. Changes in the membrane proteins of buck (*Capra hircus*) spermatozoa during epididymal maturation Small Rum. **Nature**, v. 16, p.251-261, 1995.

SYLVESTER, S.R.; MORALES, C.; OKO, R.; GRISWOLD, M.D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. **Biology. Reproduction**. 45, 195-207. 1991.

TANAKA S, UEHARA T, NOMURA Y. U regulation of protein disulfide isomerase in response to hypoxia-brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. **Journal of Biology Chemistry**. 2000; 275 (14): 10388-93

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**.89: 159-170. 2005.

TURNER TT, BOMGARDNER D, JACOBS JP, NGUYEN QA. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. **Reproduction**2003;125: 871–8.

VAN DER LINDEN, L.S., BUSTAMANTE-FILHO, I.C., SCHIAVO, S.D., PERES MACIEL, M.A., RODRIGUES, M.F., dos SANTOS, S.I., MATTOS, R.C., NEVES, A.P. Use of *Rhea americana* egg yolk in extender in stallion sêmen cryopreservation. **Pferdeheilkunde**, v.30, p.61-64, 2014.

VAN LITH, M.; HARTIGAN, N.; HATCH, J.; BENHAM, A. M. PDILT, a divergent testis- specific protein disulfide isomerase with a non-classical SXXC motif that engages in disulfide-dependent interactions in the endoplasmic reticulum. **Journal of Biology Chemistry**. v. 280, p. 1376-1383, 2005.

VAN LITH, M. et al. A developmentally regulated chaperone complex for the endoplasmic reticulum of male haploid germ cells. **Molecular Biology of the Cell**., v. 18, p. 2795-2804, 2007.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 104-177, 2007.

VARRICCHIO, E.; LANGELLA, M.; MAHRAJAN, V.; PAINO, G. Structure and function of the mammalian epididymis. **Acta of Medicine Veterinary, Napoli**, v.42, p.221-234, 1996.

VERNET P, AITKEN RJ, DREVET JR. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular Cell Endocrinology**. v216,p.31-39, 2004 .

VOGLMAYR, J. K.; FAIRBANKS, G.; JACKOWITZ, M. A.; COLELLA, J. R. Post-testicular development changes in the ram sperm cell surface and their relationship to luminal fluid proteins of the reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 655-667, 1980.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 15, p. 35-44, 2004.

WOLF F. R., ALMQUIST J. O., HALE E.B. Prepuberal and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**. v. 24, p. 761-773, 1965.

YEUNG, C.H.; WEINBAUER, G.F.; COOPER, T.G. Responses of monkey epididymal sperm of different maturational status to secondary messengers mediating protein tyrosine phosphorylation, acrosome reaction, and motility. **Biologic Reproduction**, Madison, v.60, suppl.1, p.206, 1999.

ZHAO, X.J., TANG,R.Z., WANG, M.L.,GUO,W.L. LIU,J., LI, L., XING I. Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells *Reproduction in Domestic Animals*. V.48,p. 59–63 .2013.

ZHANG, J.; WU, J.; et al. Erp57 is a potential biomarker for human fertilization capability. ***Molecular Human Reproduction***, v. 13, p. 663-639, 2007

ANEXOS

ANEXO A- Estadística Artículo 1

| | | | | |
|---|---------------|----|------------|---------------|
| Table Analyzed | sptz | | | |
| ANOVA summary | | | | |
| F | 0,9657 | | | |
| P value | 0,3986 | | | |
| P value summary | ns | | | |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | No | | | |
| R square | 0,09228 | | | |
| Brown-Forsythe test | | | | |
| F (DFn, DFd) | 1,007 (2, 19) | | | |
| P value | 0,3840 | | | |
| P value summary | ns | | | |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No | | | |
| Bartlett's test | | | | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 0,9624 | | | |
| P value | 0,6181 | | | |
| P value summary | ns | | | |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | No | | | |
| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) |
| Treatment (between columns) | 8,088e+013 | 2 | 4,044e+013 | F (2, 19) = 0 |
| Residual (within columns) | 7,956e+014 | 19 | 4,187e+013 | |
| Total | 8,765e+014 | 21 | | |
| Data summary | | | | |
| Number of treatments (columns) | 3 | | | |
| Number of values (total) | 22 | | | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|-------------|---------------------------|-------------|--------------|---------|----|
| Number of families | 1 | | | | | |
| Number of comparisons per family | 3 | | | | | |
| Alpha | 0,05 | | | | | |
| Tukey's multiple comparison test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | | Significant? | Summary | |
| G1 vs. G2 | -3,429e+006 | -1,192e+007 to 5,061e+006 | | No | ns | |
| G1 vs. G3 | -4,190e+006 | -1,268e+007 to 4,300e+006 | | No | ns | |
| G2 vs. G3 | -760858 | -1,025e+007 to 8,730e+006 | | No | ns | |
| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff, | SE of diff, | n1 | n2 |
| G1 vs. G2 | 7,259e+006 | 1,069e+007 | -3,429e+006 | 3,342e+006 | 10 | 6 |
| G1 vs. G3 | 7,259e+006 | 1,145e+007 | -4,190e+006 | 3,342e+006 | 10 | 6 |
| G2 vs. G3 | 1,069e+007 | 1,145e+007 | -760858 | 3,736e+006 | 6 | 6 |

ANEXO B: Estadísticas Artículo 2:

| | | | | |
|---|---------------|----|------------|-------------------|
| Table Analyzed | FLuido | | | |
| ANOVA summary | | | | |
| F | 13,34 | | | |
| P value | 0,0002 | | | |
| P value summary | *** | | | |
| Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) | Yes | | | |
| R square | 0,5841 | | | |
| Brown-Forsythe test | | | | |
| F (DFn, DFd) | 4,709 (2, 19) | | | |
| P value | 0,0218 | | | |
| P value summary | * | | | |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | Yes | | | |
| Bartlett's test | | | | |
| Bartlett's statistic (corrected) | 7,909 | | | |
| P value | 0,0192 | | | |
| P value summary | * | | | |
| Significantly different standard deviations? (P < 0.05) | Yes | | | |
| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) |
| Treatment (between columns) | 8,621e+014 | 2 | 4,311e+014 | F (2, 19) = 13,34 |
| Residual (within columns) | 6,139e+014 | 19 | 3,231e+013 | |
| Total | 1,476e+015 | 21 | | |
| Data summary | | | | |
| Number of treatments (columns) | 3 | | | |
| Number of values (total) | 22 | | | |

| | | | | | |
|----------------------------------|-------------|----------------------------|--------------|-------------|----|
| Number of families | 1 | | | | |
| Number of comparisons per family | 3 | | | | |
| Alpha | 0,05 | | | | |
| Tukey's multiple comparison test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary | |
| G1 vs. G2 | -1,165e+007 | -1,911e+007 to -4,193e+006 | Yes | ** | |
| G1 vs. G3 | -1,336e+007 | -2,082e+007 to -5,908e+006 | Yes | *** | |
| G2 vs. G3 | -1,714e+006 | -1,005e+007 to 6,623e+006 | No | ns | |
| Test details | Mean 1 | Mean 2 | Mean Diff, | SE of diff, | n1 |
| G1 vs. G2 | 3,769e+006 | 1,542e+007 | -1,165e+007 | 2,935e+006 | 10 |
| G1 vs. G3 | 3,769e+006 | 1,713e+007 | -1,336e+007 | 2,935e+006 | 10 |
| G2 vs. G3 | 1,542e+007 | 1,713e+007 | -1,714e+006 | 3,282e+006 | 6 |

ANEXO C- Tabela de parâmetros seminais dos garanhões do Grupo "Férteis"

| Grupo1 | | | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------------------------------------|----------|---------|---------|--------|--|
| Garanhão | MT % | MP % | Vigor | Concentração (x10 ⁶) | eosina % | Dmai(%) | Dmen(%) | DTT(%) | |
| A | 70 | 50 | 3 | 180 | 73 | 9 | 3 | 12 | |
| A | 80 | 60 | 4 | 192 | 70 | | | | |
| A | 80 | 65 | 5 | 146 | 72 | | | | |
| A | 80 | 60 | 4 | 172 | 69 | | | | |
| B | 70 | 50 | 4 | 124 | 62 | 5 | 4 | 9 | |
| B | 85 | 65 | 4 | 113 | 67 | | | | |
| B | 70 | 50 | 4 | 224 | 60 | | | | |
| B | 70 | 50 | 3 | 117 | 64 | | | | |
| C | 80 | 65 | 4 | 231 | 77 | 4 | 7 | 11 | |
| C | 90 | 70 | 5 | 154 | 81 | | | | |
| C | 70 | 55 | 4 | 213 | 61 | | | | |
| C | 80 | 65 | 4 | 221 | 71 | | | | |
| D | 70 | 55 | 3 | 123 | 70 | 10 | 12 | 22 | |
| D | 70 | 55 | 4 | 142 | 68 | | | | |
| D | 75 | 60 | 4 | 133 | 69 | | | | |
| D | 70 | 50 | 4 | 126 | 59 | | | | |
| E | 70 | 50 | 3 | 117 | 59 | 11 | 13 | 24 | |
| E | 70 | 55 | 4 | 101 | 61 | | | | |
| E | 80 | 65 | 4 | 142 | 63 | | | | |
| E | 80 | 65 | 4 | 131 | 65 | | | | |
| F | 80 | 70 | 4 | 212 | 71 | 6 | 11 | 17 | |
| F | 75 | 60 | 4 | 198 | 69 | | | | |
| F | 80 | 65 | 4 | 246 | 74 | | | | |
| F | 80 | 65 | 4 | 228 | 76 | | | | |
| Média | 76,04 | 59,17 | 3,92 | 166,08 | 67,96 | 7,50 | 7,50 | 10,33 | |
| DP | 5,89 | 6,86 | 0,50 | 45,77 | 6,01 | 2,88 | 4,27 | 4,27 | |

ANEXO D- Tabela de parâmetros seminais dos garanhões do Grupo "Sub Férteis"

| Grupo2 | | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|----------|----|--|
| Garanhão | MT % | MP % | Vigor | Concentração (x10 ⁶) | eosina % | | | | |
| G | 5 | 1 | 1 | 89 | 43 | 22 | 13 | 35 | |
| G | 5 | 1 | 1 | 78 | 39 | | | | |
| G | 5 | 1 | 1 | 69 | 34 | | | | |
| G | 5 | 1 | 1 | 71 | 37 | | | | |
| H | -5 | 0 | 1 | 572 | 55 | 21 | 20 | 40 | |
| H | -5 | 1 | 1 | 499 | 59 | | | | |
| H | 10 | -5 | 1 | 531 | 53 | | | | |
| H | 20 | 5 | 2 | 488 | 56 | | | | |
| I | 20 | 10 | 2 | 213 | 61 | 13 | 14 | 27 | |
| I | 20 | 10 | 2 | 199 | 68 | | | | |
| I | 30 | 15 | 2 | 222 | 71 | | | | |
| I | 20 | 10 | 2 | 217 | 69 | | | | |
| J | 30 | 15 | 2 | 188 | 48 | 24 | 21 | 45 | |
| J | 30 | 15 | 2 | 176 | 46 | | | | |
| J | 30 | 10 | 2 | 165 | 49 | | | | |
| J | 20 | 10 | 2 | 144 | 41 | | | | |
| K | 1 | 0 | -1 | 65 | 32 | 22 | 29 | 51 | |
| K | 1 | 0 | -1 | 73 | 36 | | | | |
| K | 1 | 0 | -1 | 57 | 31 | | | | |
| K | 1 | 0 | -1 | 44 | 35 | | | | |
| L | 10 | 5 | 1 | 101 | 59 | 25 | 23 | 48 | |
| L | 10 | 5 | 1 | 112 | 62 | | | | |
| L | 10 | -5 | 1 | 105 | 65 | | | | |
| L | 10 | 5 | 1 | 117 | 61 | | | | |
| Média | 11,83333 | 4,583333 | 1,041667 | 191,4583333 | 50,41667 | 21,16667 | 20 | 41 | |
| DP | 11,21593 | 5,992145 | 1,041703 | 161,2677976 | 12,79917 | 4,262237 | 5,932959 | | |



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 043/2017

Título: AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DISULFETO ISOMERASE A1 (PDIA1) COMO MARCADOR PARA A QUALIDADE SEMINAL EM GARANHÕES.

Data da aprovação: 07/11/2017

Período de vigência do projeto: 07/11/2019

Pesquisadores(a): Adriana Pires Neves

Campus: Dom Pedrito

Telefone: (53) 999964342

E-mail: adripneves@yahoo.com.br

CEUA

| | |
|-----------------------|--|
| Finalidade | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa |
| Espécie/Linhagem/Raça | Equinos |
| Nº de animais | 34 |
| Peso/Idade | 220 – 550 Kg/ 1,3 a 6 anos |
| Sexo | Machos |
| Origem | Cabanha de cavalos crioulos na região de Bagé e Dom Pedrito. |

Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

