

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DAVID RAMOS DA ROCHA

**BIOMETRIA TESTICULAR, PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO
PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS MORADA NOVA, VARIEDADE BRANCA,
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL.**

FORTALEZA-CE

2013

DAVID RAMOS DA ROCHA

**BIOMETRIA TESTICULAR, PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO
PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS MORADA NOVA, VARIEDADE BRANCA,
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe N. Moura

FORTALEZA – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

R572b

Rocha, David Ramos da.

Biometria testicular, parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros Morada Nova, variedade branca, submetidos à insulação escrotal / David Ramos da Rocha. – 2013.
143 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Produção Animal.

Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.

Coorientação: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo.

1. Sêmen. 2. Ovino. 3. Proteoma. 4. Testículos. I. Título.

CDD 636.08

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

David Ramos da Rocha

Tese aprovada em: 21.02.2013

BANCA EXAMINADORA

Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura – PhD.

ORIENTADOR

Airton Alencar de Araújo – Dr.

CO-ORIENTADOR

Carlos Eduardo Azevedo Souza – Dr.

EXAMINADOR

Jorge André Matias Martins – Dr.

EXAMINADOR

Maria Gorete Flores Salles – Dra.

EXAMINADOR

Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley – Dra.

EXAMINADOR

À **Deus**, pela vida, coragem,
pelos amigos que colocou em meu caminho e pela
condição da realização desse trabalho.

Aos meus pais **Humberto Costa da
Rocha e Sarvia Maria Ramos da Rocha**
a quem devo respeito e educação que tenho
hoje, por acreditarem em mim, torcerem e
por me darem todas as condições
para obtenção desse título.

À minha irmã **Tânia C. Ramos da Rocha**
pela paciência, apoio, entusiasmo e incentivo
para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos pelo afeto, carinho
e que direta ou indiretamente
contribuíram para mais esta conquista

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pela vida e por me fortalecer nos momentos mais difíceis me dando força para vencer os obstáculos surgidos em minha vida.

À Universidade Federal do Ceará, pela possibilidade de realização da presente tese.

Ao professor, Arlindo Moura pela oportunidade de cursar o doutorado e por fornecer todas as condições para a obtenção deste título.

À professora Sandra Salmito pela compreensão e avaliação da minha tese, com sugestões consistentes e que foram importantes para a melhoria da tese.

Ao meu co-orientador e amigo Airton Alencar de Araújo, pela confiança, paciência, incentivo, orientação, entusiasmo e ajuda indispensável na execução deste projeto e pela sua sincera amizade.

A professora Maria Gorete Flores Salles pelas infinitas ajudas durante a minha pós-graduação, pela disposição e atenção nos momentos difíceis, pelo seu entusiasmo, confiança no trabalho realizado e por sua grande e sincera amizade.

Ao grande amigo Dr. Carlos Eduardo Azevedo Sousa pela sua grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela orientação, sempre disponível, extrapolando a academia, pela sua sincera amizade e consideração.

Ao grande amigo Dr. Jorge André Matias Martins pela sua ajuda e disposição no desenvolvimento deste trabalho, pela orientação, sempre disponível, nos momentos em que precisei e pela sua sincera amizade.

Ao Laboratório de Proteínas de Defesa de Plantas, pertencente ao departamento de bioquímica da UFC e coordenado pelo professor Tadeu Oliveira, pelo apoio, disposição e atenção dispensada para que este trabalho fosse realizado.

À UNIFOR, aqui representada pelos professores Renato Moreria e Ana Cristina Moreira pelo apoio, atenção e pela disposição do espectrômetro de massas.

Aos professores Pedro Zione e Magno Duarte pelo apoio à realização deste trabalho, cedendo suas instalações para manutenção dos animais.

Ao fiel amigo Isac Gabriel pelos bons momentos vividos durante toda a minha vida acadêmica, pelos conselhos e momentos de grande descontração e pela sua sincera amizade.

Aos amigos Flávio Gonçalves, Luiza Rocha, Marcelo Casimiro pelos momentos de descontração e amizade.

Às amigas Alethéia Sousa e Josy Arruda pela amizade e pelos bons momentos vividos durante o doutorado, pelo carinho, afeto e amizade.

Aos amigos da UFV, Tadeu, Gustavo e Pedro Veiga pelos momentos de descontração e amizade.

A todos os alunos de iniciação científica que participaram deste trabalho, em especial, o Aderson, Lucas e Rômulo Diógenes pela amizade e pela grande ajuda durante o período experimental.

À todos os colegas do curso de pós-graduação pelos bons momentos vividos, em especial, aos pertencentes ao Laboratório de fisiologia Animal, Verônica Gonzalez, Ítalo Cordeiro e Carlos Lobo.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Francisca das Chagas.

À CAPES, pela bolsa concedida durante a realização do curso de doutorado

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Meu muito obrigado!!!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Função testicular e produção espermática.....	19
3.2. Função epididimária.....	21
3.3. Proteínas do plasma seminal.....	24
3.3.1. Proteínas associadas à proteção espermática.....	25
3.3.2. Proteínas associadas à maturação espermática.....	28
3.3.3. Proteínas associadas à capacitação e ligação ao oviduto.....	31
3.4. Efeitos da insulação escrotal sobre as secreções hormonais.....	34
3.5. Efeitos do estresse térmico sobre a reprodução de machos.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Local do experimento.....	41
4.2. Animais experimentais.....	41
4.3. Delineamento experimental.....	41
4.3.1. Procedimento geral.....	41
4.3.2. Medições dos parâmetros ambientais, temperatura retal e testicular	43
4.3.3. Avaliação da biometria e consistência testicular.....	43
4.3.4 Coleta e análise de sêmen.....	44
4.3.5. Eletroforese bidimensional.....	45
4.3.6. Análise dos mapas proteicos.....	47
4.3.7. Digestão dos spots proteicos.....	47

4.3.8. Identificação de proteínas por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF).....	48
4.3.9. Análise de ontologia gênica e interação entre proteínas.....	50
4.3.10. Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Parâmetros ambientais e temperaturas retal e testicular.....	52
5.2. Biometria testicular.....	53
5.3. Parâmetros seminais.....	55
5.4. Proteínas do plasma seminal.....	58
5.5. Análise de ontologia gênica e interações entre proteínas.....	65
6. DISCUSSÃO.....	71
6.1. Temperatura retal e testicular.....	71
6.2. Medidas biométricas e consistência testicular.....	72
6.3. Parâmetros seminais.....	74
6.4. Proteínas do plasma seminal.....	76
6.4.1. Proteínas envolvidas na proteção espermática.....	77
6.4.2. Proteínas envolvidas na maturação espermática.....	84
6.4.3. Proteínas envolvidas na capacitação e ligação ao oviduto.....	88
6.4.4. Proteínas intracelulares.....	90
6.4.5. Novas proteínas encontradas no plasma seminal de carneiros.....	92
7. CONCLUSÕES.....	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1: Proteínas expressadas diferencialmente no plasma seminal de carneiros Morada Nova variedade branca como resultado da insulação escrotal. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massas. Os spots numerados referem-se aos spots mostrados na Figura 8.	132
Tabela 2: Descrição da ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova variedade branca, expressadas diferencialmente em função da insulação escrotal.	138

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<p>Figura 1: Mudanças na temperatura retal (A) e testicular (B) em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).</p>	52
<p>Figura 2: Mudanças na circunferência escrotal (A), comprimento (B), diâmetro (C), e volume testicular (D) em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p>0,05$).</p>	54
<p>Figura 3: Mudanças na consistência testicular em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p>0,05$).</p>	55
<p>Figura 4: Mudanças na motilidade massal (A), percentagem de células móveis (B), vigor espermático (C) e concentração espermática (D) em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p>0,05$).</p>	56
<p>Figura 5: Mudanças no percentual de células normais em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p>0,05$).</p>	58

- Figura 6: Mudanças no número de spots proteicos no plasma seminal de carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p > 0,05$). 59
- Figura 7: Mapas representativos do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco antes (dia 0), durante (4 e 8 dias) e após a insulação escrotal. Os géis foram corados com azul de coomassie e analisados usando o software PDQuest (Bio-Rad, USA). 62
- Figura 8: Mapa bidimensional do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco. A imagem corresponde ao gel referência obtido antes da insulação (dia 0). Os spots numerados representam os que foram expressos diferencialmente em função da insulação escrotal, e referem-se aos mostrados no anexo como Tabela 1. As proteínas foram coradas com azul de coomassie e identificadas por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF). 63
- Figura 9: Mudanças na intensidade dos spots protéicos expressados diferencialmente nos mapas do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco submetidos à insulação escrotal (média \pm erro-padrão). Valores seguidos por letras idênticas não são diferentes ($p > 0,05$). 64
- Figura 10: Gráficos que mostram as categorias de ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos à insulação escrotal, com base nos seus processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. 66-67
- Figura 11: Redes de interação interprotéica das proteínas albumina, proteína DJ-1 e heat shock protein 70 kDa obtidas com base no banco de dados STRING (v. 9.0) mostrando as interações no modo evidência. 68-70

RESUMO

O presente estudo foi conduzido para avaliar os efeitos do estresse térmico no testículo, parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros. Seis carneiros da Raça Morada Nova var. branca foram submetidos à insulação escrotal (IE) por oito dias. Os animais foram avaliados antes (dia 0), durante e após a insulação até que os parâmetros seminais tivessem retornado a normalidade. A circunferência escrotal, bem como os demais parâmetros de biometria testicular e a motilidade espermática diminuíram após a IE, mas com retorno aos valores de pré-insulação entre os dias 71, 85 e 113, respectivamente. Os carneiros tornaram-se azoospermicos entre os dias 29 e 71. O número de *spots* detectáveis/gel diminuiu de 256 ± 31 para 104 ± 14 entre os dias 0 e 29 ($p < 0,05$), retornando aos valores pré-insulação no dia 134. Algumas proteínas detectadas no plasma seminal antes da insulação estavam ausentes quando os animais tiveram menor motilidade espermática ou azoospermia, incluindo albumina, arilsulfatase A, plasma glutamato carboxipeptidase, catepsina F, transferrina, alfa-2-macroglobulina, enzima conversora de angiotensina, alfa fucosidase, beta galactosidase, chaperonina contendo TCP-1, proteína de choque térmico 70 kDa, clusterina, “palate, lung and nasal epithelium clone”, “ram seminal vesicle proteins”, bodesina 2, superóxido dismutase, cistatina B, peroxiredoxina 5, tecido inibidor de metaloproteinase 2. Expressões de outras 17 proteínas foram quantitativamente alteradas nos mapas bidimensionais do plasma seminal como resultado da IE, como a actina, proteína DJ-1, HRPE773, proteína C-reativa, “porcine seminal plasma spermadhesins”, entre outras. Conclui-se, que a expressão de proteínas no plasma seminal foi drasticamente alterada pela insulação escrotal, coincidindo com mudanças no tamanho testicular e parâmetros espermáticos. As proteínas afetadas pelo calor estão potencialmente envolvidas em diversos eventos, como proteção espermática, maturação e fertilização.

Palavras-chave: ovinos, proteômica, testículos, epidídimos, insulação escrotal

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the effects of heat stress on testis and semen criteria, and seminal plasma proteome of rams. Scrotal insulation (SI) was in place for eight days, using six rams. Animals were evaluated before (day 0), during and after SI until semen parameters returned to normal. Scrotal circumference, other testis parameters and sperm motility decreased after SI but returned to pre-insulation values on days 71, 85 and 113, respectively. Rams became azoospermic from day 29 to 71. The number of detectable spots per 2D gel decreased from 256 ± 31 to 104 ± 14 between days 0 and 29 ($p < 0.05$), returning to pre-insulation values on day 134. Several seminal proteins detected before insulation were absent when animals had low sperm motility or azoospermia, including albumin, arylsulfatase A, plasma glutamate carboxypeptidase, cathepsin F, transferrin, alpha-2-macroglobulin, angiotensin-converting enzyme, alpha fucosidase, beta galactosidase, TCP-1 containing chaperonins, heat shock protein 70 kDa, clusterin, palate, lung and nasal epithelium clone, ram seminal vesicle proteins, bodhesin 2, superoxide dismutase, cystatin B, peroxiredoxin 5, tissue inhibitor of metalloproteinase 2. Expression of other 17 proteins were quantitatively changed in the seminal plasma 2-D maps as the result of SI, such as actin, protein DJ-1, HRPE773-like, C-reactive protein precursor and porcine seminal plasma spermadhesins, among others. In conclusion, the expression of seminal plasma proteins was drastically altered by scrotal insulation, coincidental with changes in testis size and semen criteria. Proteins affected by heat stress are potentially involved in several events, from sperm protection and maturation to fertilization.

Key-words: sheep, proteomics, testis, epididymis, scrotal insulation

1. INTRODUÇÃO

O clima é um dos principais fatores que frequentemente tem limitado a eficiência reprodutiva dos animais (TAKAHASHI, 2012). Tal fato é justificado pelos elevados valores de temperatura ambiente que muitas vezes estão fora da zona de conforto térmico dos animais o que requer energia extra para termorregular em busca da homeotermia. Isto faz com que haja menor quantidade de energia disponível para os processos reprodutivos, devido a ajustes endócrinos e fisiológicos para reduzir a produção de calor endógeno e que, invariavelmente, está associado à deficiência de nutrientes essenciais à reprodução.

A exposição dos animais a elevadas temperaturas ambientes altera os mecanismos de termorregulação testicular, podendo ocasionar, dependendo do gradiente térmico, degeneração do parênquima testicular que é a principal causa de subfertilidade e infertilidade em reprodutores (MIEUSSET *et al.*, 1992). Diversos estudos utilizando a insulação escrotal como método de injúria térmica ao testículo, tem mostrado que a degeneração do epitélio germinativo gonadal ocasiona redução da qualidade seminal, que é refletida pelo aumento das patologias espermáticas, reduções da motilidade, vigor e percentual de espermatozoides móveis (MOREIRA *et al.*, 2001; GABALDI e WOLF, 2002). Isto ocorre devido ao comprometimento da espermatogênese, principalmente na fase intermediária (espermatócitos e espermátides) e por alterações no epitélio epididimário (ROSS e ENTWISTLE, 1979; BRITO *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2011).

Embora já existam estudos a respeito dos efeitos do calor sobre o testículo, esses resultados baseiam-se em técnicas clássicas de avaliação andrológica e que não fornecem informações suficientes a respeito dos reais efeitos deletérios nas gônadas

em nível molecular. Além disso, essas avaliações isoladas pouco informam a respeito do potencial de fertilidade de um animal (SMITH *et al.*, 1981; KJAESTAD *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1998), uma vez que os parâmetros seminais podem estar dentro da normalidade, e mesmo assim não garantir a mesma condição ao perfil protéico do plasma seminal após um insulto térmico testicular. Dessa forma, deve ser levado em conta que a fertilização é um processo complexo, constituído de interações moleculares do espermatozoide com as proteínas presentes no plasma seminal, e os fluidos e o próprio trato genital feminino, resultando em alterações estruturais e funcionais as quais levam ao sucesso da fertilização (AMANN, 1989; AMANN e HAMMERSTEDT, 1993).

O plasma seminal é composto pelos fluidos das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos (MOURA *et al.*, 2007b; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012) cujos constituintes moleculares são importantes para a regulação da função espermática (STRZEZEK *et al.*, 1992; STRZEZEK *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2011; JUYENA e STELLETTA, 2012). Proteínas seminais estão associadas a processos reprodutivos, como proteção das células contra choque térmico (MUIÑO-BLANCO *et al.*, 2008; CASAS *et al.*, 2010), motilidade espermática (DE LAMIRANDE *et al.*, 1983; AMANN *et al.*, 1987; DIAMANDIS *et al.*, 1999; ELZANATY *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2013), morfologia espermática (MACPHERSON *et al.*, 2002), integridade da cromatina (WAI-SUM *et al.*, 2006), capacitação espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002; CABALLERO *et al.*, 2009; PLANTE *et al.*, 2012), interação com o oviduto e fecundação do oócito (EKHLASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005; GWATHMEY *et al.*, 2006; IGNOTZ *et al.*, 2007; SUAREZ, 2008; HUNG e SUAREZ, 2010; TALEVI e GUALTIERI, 2010; HUNG e SUAREZ, 2012). Diversos estudos também evidenciam relações empíricas com índices

de fertilidade em touros (KILLIAN *et al.*, 1993; BELLIN *et al.*, 1994; KREGGE *et al.*, 1995; CANCEL *et al.*, 1997; BELLIN *et al.*, 1998; HAGAMAN *et al.*, 1998; SPROTT *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2006a; MOURA *et al.*, 2006b).

Alguns estudos já mostraram como ocorrem as interações dessas proteínas com os espermatozoides (SOUZA *et al.*, 2008; NAABY-HANSEN e HERR, 2010; SOUZA *et al.*, 2011). Entretanto, pouco foi elucidado no que diz respeito às modificações quantitativas e pós-traducionais destas proteínas frente a condições de estresse térmico testicular. Portanto, a descrição das variações no perfil protéico do plasma seminal, associadas às avaliações dos parâmetros seminais em função do estresse térmico testicular por meio de insulação escrotal, pode trazer importantes informações sobre os mecanismos de ação dessas proteínas e desta forma auxiliar a compreensão dos fenômenos que envolvem as alterações dos processos reprodutivos.

2. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do estresse térmico via insulação escrotal, sobre as medidas testiculares, parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco adultos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Função testicular e produção espermática

Os testículos apresentam duas funções básicas, uma endócrina, consistindo da secreção de andrógenos, principalmente, além de inibina, ativina e estradiol, entre outros (LAFORTUNE *et al.*, 1984; HESS, 2000; KOTSAMPASI *et al.*, 2009), e outra exócrina (espermatogênese), relacionada à produção de gametas para garantir a reprodução (COUROT *et al.*, 1970). Nos machos, a gametogênese é um processo contínuo, que resulta na produção de espermatozoides a partir de células diplóides, denominadas de espermatogônias (CASTRO *et al.*, 1997). O parênquima testicular é composto pelos túbulos seminíferos, os quais ocupam de 85 a 86% do volume testicular ovino (QUEIROZ e CARDOSO, 1989; WROBEL *et al.*, 1995), contendo em seu interior o epitélio germinativo, e o espaço intertubular, onde se localizam os vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e as células de Leydig (SETCHELL, 1978), estas últimas, produtoras de testosterona sob influência do LH.

Em ovinos, a espermatogênese dura 48 dias, iniciando após a puberdade (COUROT *et al.*, 1970; ORTAVANT *et al.*, 1977), e é regulada indiretamente pela secreção de GnRH (MATSUMOTO e BREMNER, 1987) que, por sua vez, estimula a secreção de FSH e LH pela hipófise, que estimulam, respectivamente, as células de Sertoli e Leydig no testículo (MATSUMOTO *et al.*, 1986; KILGOUR *et al.*, 1998). As células de Sertoli contêm receptores de FSH (GRISWOLD e MCLEAN, 2006) e, portanto, a ação desta gonadotrofina na espermatogênese é, pelo menos em parte, mediada por essas células (KILGOUR *et al.*, 1998). Diversos estudos mostram que o FSH estimula a expressão e síntese de proteínas nas células de Sertoli (SKINNER e GRISWOLD, 1980),

umentando assim a secreção de proteínas específicas como a ABP (*androgen binding protein*), transferrina e clusterina (VEERAMACHANENI e AMANN, 1991), além de hormônios, como estradiol, ativina e inibina (RITZEN *et al.*, 1981; GRISWOLD, 1998; MEEHAN *et al.*, 2000), e fatores de crescimento de ação autócrina e parácrina, que regulam diferentes fases do ciclo espermatogênico (HOLMES *et al.*, 1986; SMITH *et al.*, 1989; GOMEZ *et al.*, 2012). Já as células de Leydig possuem receptores para LH e, sob ação desta gonadotropina, estimulam a produção de testosterona e fatores de crescimento (YAMAMOTO *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2012). A testosterona afeta a espermatogênese de diversas maneiras, incluindo ação direta nas células-alvo por meio da interação com receptor de andrógenos, seja na forma de testosterona ou após conversão em dihidrotestosterona, resultando na expressão de diversos genes (WALKER, 2011). Além disso, a testosterona exerce uma ação indireta, reprimindo a expressão de caspases, prevenindo, dessa forma, a cascata apoptótica (KIM *et al.*, 2001). Além disso, sugere-se que a testosterona influencie as células de Sertoli por meio de mensageiros secundários que, supostamente, dariam suporte a espermatogênese. No entanto, tais mensageiros ainda são desconhecidos (MCLACHLAN *et al.*, 1995).

A produção espermática é assegurada pela espermatogênese, que é um processo organizado e sincronizado, em que as espermatogônias diplóides dividem-se por mitose para manter sua população, e uma subpopulação delas entra em meiose, produzindo espermatócitos primários e secundários (COURTENS, 1983; RUSSELL *et al.*, 1990; JOHNSON *et al.*, 2000), os quais dão origem a espermátides e, posteriormente, aos espermatozoides haplóides (JOHNSON *et al.*, 1991; SHARPE, 1994; JOHNSON *et al.*, 2000). A produção espermática e o rendimento da espermatogênese dependem, em

grande parte, das células de Sertoli (BERNDTSON *et al.*, 1987). Isso se deve ao fato de que cada célula de Sertoli tem capacidade de suportar o crescimento de um número limitado de células germinativas (RUSSELL, 1993). Em ovinos, cada espermatogônia A tem o potencial teórico para resultar na formação de 256 espermatozoides (ORTAVANT, 1958). No entanto, devido a perdas durante o processo, o valor real da espermatogênese é sempre inferior. Isso se deve, em parte, àquelas ocorridas principalmente durante a meiose. Estas perdas se dão principalmente por apoptose, e estão relacionadas a flutuações hormonais e disponibilidade de nutrientes, decorrentes das interações com fatores ambientais, restrição alimentar, alterações ambientais, fotoperíodo, estresse térmico, entre outros (NELSON *et al.*, 1992; FURUTA *et al.*, 1994; YOUNG e NELSON, 2001).

Após a saída dos espermatozoides do epitélio seminífero, eles são transportados para a *rete testis* e, a partir daí através de ductos eferentes para a cabeça do epidídimo. Este transporte é facilitado pela pressão da massa de espermatozoides, das secreções testiculares, das contrações internas da camada mioepitelial, além dos movimentos ciliares das células epiteliais dos ductos eferentes (ILIO e HESS, 1994). O papel do epidídimo é ponto central para compreender os mecanismos de maturação espermática que ocorrem ao longo do trânsito por esse órgão.

3.2. Função epididimária

Em mamíferos, os espermatozoides oriundos do testículo, não estão plenamente aptos para fertilizar um oócito, uma vez que, ainda estão imóveis e imaturos (AMANN *et al.*, 1982; AMANN e HAMMERSTEDT, 1993; TOSHIMORI, 2003; SULLIVAN *et al.*,

2005; MALDERA *et al.*, 2011) necessitando de mudanças pós-testiculares durante a passagem pelo epidídimo. A capacidade fecundante do espermatozoide é adquirida durante o trânsito epididimário (TOSHIMORI, 2003; ZHOU *et al.*, 2004) que, em ruminantes, dura de 8 a 15 dias (ORGBIN-CRIST, 1962; AMIR *et al.*, 1968; SWIERSTRA, 1968; AMANN, 1981) no qual os espermatozoides sofrem mudanças que os transformam de células imaturas, incapazes de fertilizar o oócito, para células com um potencial completo de fertilização (AMANN *et al.*, 1982; HAMMERSTEDT *et al.*, 1982; ACOTT *et al.*, 1983). A capacidade dos espermatozoides em fertilizar oócitos está associada com a aquisição da motilidade (CASCIERI *et al.*, 1976; ACOTT *et al.*, 1983), mudanças morfológicas (LIN *et al.*, 2002), nas características metabólicas (COOPER e YEUNG, 2006) e alterações na membrana celular (VOGLMAYR *et al.*, 1985; DACHEUX *et al.*, 1989).

Estudos iniciais com carneiros (FOURNIER-DELPECH *et al.*, 1979; FOURNIER-DELPECH *et al.*, 1982) mostraram que o espermatozoide adquire a capacidade de fertilizar o oócito ainda no corpo do epidídimo, porém, somente após o completo trânsito epididimário ele está apto a produzir embriões completos e viáveis (HORAN e BEDFORD, 1972; DACHEUX e PAQUIGNON, 1980). Isto pode ser confirmado por WAZZAN *et al.* (1990), que mostraram que somente 8% dos oócitos incubados com espermatozoides da cabeça do epidídimo foram capazes de se desenvolver até blastocisto quando comparados aos 48% de oócitos fertilizados por espermatozoides da cauda do epidídimo.

As características bioquímicas do gameta são alteradas durante o trânsito epididimário, dentre elas estão incluídas a condensação da cromatina nuclear, mudanças na composição e estrutura da membrana plasmática, incluindo a proporção

de colesterol e fosfolipídios, e alterações no tipo e quantidade das proteínas (JONES, 2002; TOSHIMORI, 2003). De fato, estudos têm demonstrado que durante o processo de maturação, muitas proteínas secretadas no epidídimo associam-se com a superfície do espermatozoide e desempenham um papel importante na aquisição da capacidade fecundante (CUASNICÚ *et al.*, 2002; DACHEUX *et al.*, 2003; DACHEUX *et al.*, 2005; CORNWALL, 2009; ROBAIRE e HAMZEH, 2011).

Durante a passagem pelo epidídimo, o espermatozoide encontra uma complexa mistura de macromoléculas, algumas oriundas do fluido dos túbulos seminíferos, e outras sintetizadas e secretadas pelo próprio epitélio do epidídimo, principalmente proteínas (SYNTIN *et al.*, 1996). O padrão de expressão gênica ao longo do epidídimo varia conforme a região (CORNWALL e HANN, 1995; JERVIS e ROBAIRE, 2001; RODRIGUEZ *et al.*, 2001; JOHNSTON *et al.*, 2005) resultando em composições proteicas diferentes, que interagem com o espermatozoide gerando grande variabilidade no conteúdo luminal entre as diversas regiões do epidídimo (YUAN *et al.*, 2006; DACHEUX *et al.*, 2009), o que sugere funções específicas nos diferentes segmentos epididimários. A maior parte dos eventos associados à maturação epididimária, e que culminam com a aquisição de motilidade e mudanças na membrana espermática é dependente da ação de proteínas, em sua maior parte secretadas pelo próprio epidídimo, sob a influência de estradiol e andrógenos (AHAMMAD *et al.*, 2011).

Durante o armazenamento dos espermatozoides na cauda do epidídimo, as células são mantidas em estado quiescente por uma combinação de fatores, que incluem a manutenção de um meio relativamente ácido, resultante da secreção de prótons pelo epitélio epididimário (BROWN *et al.*, 1997; BROWN e BRETON, 2000), e também hiperosmótico (JONES e MURDOCH, 1996; SI *et al.*, 2009). Além disso,

algumas proteínas presentes no fluido epididimário também são responsáveis pela proteção aos gametas contra estresse oxidativo, ativação do sistema e imunológico e ação de microorganismos, entre outros, durante seu armazenamento na cauda deste órgão (MOURA *et al.*, 2010b).

3.3. Proteínas do plasma seminal

O plasma seminal de ruminantes é uma mistura complexa oriunda do fluido testicular, epididimário e glândulas sexuais acessórias (MOURA *et al.*, 2010a; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012). Este fluido modula desde aspectos relacionados à motilidade durante o trânsito epididimário até os eventos pós-ejaculatórios no trato genital feminino (KRAUS *et al.*, 2005; FLORMAN e DUCIBELLA, 2006). Muitas dessas proteínas atuam em aspectos específicos da função espermática como a proteção (KOZIOROWSKA-GILUN *et al.*, 2011), motilidade (AMANN *et al.*, 1987; YOSHIDA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2013), morfologia (MACPHERSON *et al.*, 2002), capacitação espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002), interação com o oviduto (GWATHMEY *et al.*, 2006; TALEVI e GUALTIERI, 2010) e fertilização (GONÇALVES *et al.*, 2008; HIROHASHI *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009; GADELLA, 2010; COHEN *et al.*, 2011; CHO, 2012). Outras são produzidas em respostas à estímulos externos, como as proteínas de choque térmico (HSPs), com o intuito de proteger ou reverter danos a membrana espermática induzidas por temperaturas extra-fisiológicas (VIARD *et al.*, 1999; BARRIOS *et al.*, 2000; PÉREZ-PÉ *et al.*, 2001). Sabe-se que algumas destas proteínas estão relacionadas com os parâmetros seminais e índices de fertilidade *in vivo* e *in vitro* (KILLIAN *et al.*, 1993; BELLIN *et al.*, 1994; HENAULT *et al.*, 1995; BELLIN *et*

al., 1998; SPOTT *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2006a; MOURA *et al.*, 2006b; MOURA *et al.*, 2007a). Contudo, um conhecimento mais detalhado sobre o padrão de secreção ou alterações que podem ocorrer no perfil proteico do plasma seminal em condições adversas, como elevação da temperatura testicular, pode contribuir para melhor compreensão dos processos fisiológicos ligados à fertilidade, permitindo assim a identificação de marcadores moleculares em condições de estresse térmico.

3.3.1. Proteínas associadas à proteção espermática

Além da maturação espermática, uma das principais funções do epidídimo é proteger o espermatozoide durante o trânsito epididimário (HINTON *et al.*, 1996; ROBAIRE *et al.*, 2006). Uma fonte de danos às células espermáticas está relacionada ao estresse oxidativo (AITKEN *et al.*, 2004; AITKEN e BAKER, 2006). Sabe-se que os espermatozoides lidam com potenciais fontes de danos, incluindo os causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAKER e AITKEN, 2005), que são produzidos em parte pelos espermatozoides, como resultado do seu metabolismo (BAKER e AITKEN, 2005; KOTHARI *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é definido como desequilíbrio entre a produção de ROS e sua eliminação por agentes antioxidantes (SIKKA *et al.*, 1995), pode levar a uma série de danos a função espermática, acarretando em infertilidade, em determinadas situações (JONES e MANN, 1977; RAO *et al.*, 1989; AGARWAL e SALEH, 2002; NICHI *et al.*, 2007).

O plasma seminal possui diversas proteínas antioxidantes, a maioria oriunda do epidídimo (HINTON *et al.*, 1995; VERNET *et al.*, 2004). Dentre as mesmas, destaca-se a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase, transferrina, albumina e a

peroxiredoxina 5 (ALVAREZ e STOREY, 1983; JEULIN *et al.*, 1989; FOUCHÉCOURT *et al.*, 2000; ZINI *et al.*, 2002; KANKOFER *et al.*, 2005; KOWALOWKA *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012). A superóxido-dismutase atua na conversão de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, menos instável, promovendo proteção dos fosfolipídeos da membrana espermática (HOLLAND e STOREY, 1981; ALVAREZ e STOREY, 1983; ALVAREZ *et al.*, 1987; SOUZA *et al.*, 2012). Entretanto, esse peróxido de hidrogênio pode interagir com íons ferro (AGARWAL e PRABAKARAN, 2005), gerando radicais livres. Nesse contexto, a catalase, juntamente com a peroxiredoxina 5 e a glutathione peroxidase, neutraliza o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio molecular (DREVET, 2006; MANANDHAR *et al.*, 2009).

Além das ROS, os íons ferro podem também promover a formação de peróxidos lipídicos (AGARWAL e PRABAKARAN, 2005). Portanto, o plasma seminal contém proteínas com o intuito reduzir a disponibilidade de íons ferro livres. Dentre elas estão a lactoferrina (FOUCHÉCOURT *et al.*, 2000; DACHEUX *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2012) e a transferrina (GILMONT *et al.*, 1990; ZALATA *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2012), que tem a propriedade de se ligar ao ferro. O ferro livre também é um componente essencial para o crescimento bacteriano (KOKHAN, 2010). Devido a essa propriedade, ambas previnem o estresse oxidativo e crescimento microbiano (NOZAKI *et al.*, 2002; FARNAUD e EVANS, 2003; GATTI *et al.*, 2004; DACHEUX *et al.*, 2005), ajudando a manter a viabilidade espermática (WAKABAYASHI *et al.*, 1999). A albumina é um dos maiores componentes do plasma seminal de carneiros, oriunda dos epidídimos e glândulas sexuais acessórias (DACHEUX *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012). A albumina se liga a radicais ferrosos livres, promovendo assim a proteção do espermatozoide contra a peroxidação lipídica (ARMSTRONG *et al.*, 1998; ROCHE *et*

al., 2008). A clusterina é uma glicoproteína que possui múltiplas funções e está presente em inúmeros tecidos e fluidos fisiológicos, incluindo a próstata, glândulas vesiculares, testículos, espermatozoides luminais e epidídimo (BLASCHUK *et al.*, 1983; WATTS *et al.*, 1990; SENSIBAR *et al.*, 1993; DACHEUX *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2007b; MOURA *et al.*, 2010b; HAN *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012). Tal proteína é secretada em resposta ao dano celular e atua na comunicação entre células (FRITZ *et al.*, 1983) e na maturação espermática, participando do processo de remodelamento da membrana espermática (SYLVESTER *et al.*, 1991; BAILEY e GRISWOLD, 1999; HUMPHREYS *et al.*, 1999). Alguns estudos têm mostrado que a clusterina pode inibir a precipitação proteica induzida por diferentes tipos de estresse (IBRAHIM *et al.*, 1999). Desta forma, a clusterina pode atuar como uma chaperona, ligando-se a proteínas desestruturadas (HUMPHREYS *et al.*, 1999), solubilizando-as e protegendo as células contra os efeitos citotóxicos decorrentes da precipitação protéica (BAILEY *et al.*, 2002). Outras proteínas envolvidas na proteção espermática são as proteínas de choque térmico (HSPs). Alguns membros dessa família são encontrados no núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático (MILLER *et al.*, 1992; MEINHARDT *et al.*, 1995; MOUNIER e ARRIGO, 2002), enquanto outras são proteínas secretadas no meio extracelular (CALDERWOOD *et al.*, 2007). Algumas isoformas destas proteínas são secretadas em resposta ao dano celular, incluindo o estresse térmico e oxidativo (GARRIDO *et al.*, 2006; GOLLI-BENNOUR e BACHA, 2011). Embora um vasto número de HSPs sejam conhecidas por serem induzidas pelo calor, uma família em especial, a HSP70, compõe a maior classe de HSPs induzidas por elevadas temperaturas (KIANG e TSOKOS, 1998). Estas atuam como chaperonas e auxiliam a aquisição da estrutura terciária das proteínas, ligam-se e estabilizam proteínas desnaturadas, direcionando a degradação

das mesmas (BOULANGER *et al.*, 1995; KIANG e TSOKOS, 1998). Diversos estudos tem mostrado que as HSPs são importantes para a espermatogênese (EDDY, 1999; WIDLAK *et al.*, 2007), além de proteger embriões dos efeitos letais da hipertermia (MORTENSEN *et al.*, 2010). Atuam também na modulação das reações imunes (CALDERWOOD *et al.*, 2007), inibindo assim a regulação das cascatas apoptóticas (BEERE, 2004). Portanto, as HSPs desempenham papel crucial no processo de manutenção da normalidade reprodutiva e alterações no padrão de expressão das mesmas devido a exposições ao calor podem causar efeitos adversos na fertilidade de muitas espécies de mamíferos (PEI *et al.*, 2011).

3.3.2. Proteínas associadas à maturação espermática

Os espermatozoides testiculares não apresentam motilidade (AMANN *et al.*, 1974; BEDFORD, 1975; CASCIERI *et al.*, 1976), a qual é adquirida durante o trânsito epididimário (AMANN *et al.*, 1982; VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1985). A maturação espermática está relacionada ao remodelamento da membrana e mudanças na atividade metabólica (BAKER *et al.*, 2005; DACHEUX *et al.*, 2005; COOPER e YEUNG, 2006), resultando na aquisição da motilidade e capacidade fecundante do espermatozoide (SOSTARIC *et al.*, 2008; CABALLERO *et al.*, 2011). Os processos envolvidos na aquisição da motilidade ainda não estão bem esclarecidos, mas certamente envolvem alterações no pH intracitoplasmático, concentrações intracelulares de AMPc (3'-5' monofosfato cíclico de adenosina) e cálcio (AMANN *et al.*, 1982; TASH e MEANS, 1983), entre outros.

Sabe-se que alguns componentes do plasma seminal regulam a motilidade dos espermatozoides (RODRIGUES *et al.*, 2013), incluindo os componentes do sistema calicreína/cininas (SOMLEV e SUBEV, 1997). Todos os componentes deste sistema (calicreínas, cininogênio, bradiginina e cininase) estão presentes nas secreções do trato reprodutivo masculino (SCHILL *et al.*, 1984). A bradiginina estimula a motilidade espermática, e sua ação é modulada pela enzima cininase II, mais conhecida como enzima conversora de angiotensina (ACE). No plasma seminal de carneiros, a ACE está presente na membrana de espermatozoides testiculares e é liberada da membrana espermática ao longo do trânsito epididimário (GATTI *et al.*, 1999; THIMON *et al.*, 2005). Além de sua ação no sistema calicreína/cininas, a ACE exerce um importante papel na fertilização. Estudos têm demonstrado que o peptídeo que permanece ligado à membrana espermática após clivagem da ACE participa dos eventos de interação entre gametas (KONDOH *et al.*, 2005). Tal hipótese é reforçada pelo fato de que a inativação do gene da isoforma testicular da ACE através de “*knock-out*” resulta em infertilidade (KREGGE *et al.*, 1995; HAGAMAN *et al.*, 1998). Além da ACE, outras proteases, incluindo algumas metaloproteinases (MMP2 e DPP3) e proteinases cisteínicas, como as catepsinas (AGRAWAL e VANHA-PERTULLA, 1986; IGDOURA *et al.*, 1995; FOUCHÉCOURT *et al.*, 2000; MÉTAYER *et al.*, 2002a; MOURA *et al.*, 2007b; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012) atuam no remodelamento da membrana espermática durante o trânsito epididimário. Estas proteases estão associadas com modificações tanto de proteínas anteriormente presentes na membrana espermática, quanto também de clivagem de proteínas no plasma seminal, ativando-as ou permitindo que elas interajam com os espermatozoides (MÉTAYER *et al.*, 2002a; b). No entanto, a atividade excessiva destas proteases pode resultar em clivagens

indesejáveis ou inativação de proteínas importantes para a fisiologia espermática, resultando em danos aos espermatozoides. Assim, com o propósito de regular a atividade dessas proteases, o plasma seminal contém diversos tipos de inibidores de proteases, desde os específicos para metaloproteases ou proteases serínicas ou cisteínicas, até aqueles de amplo espectro (MÉTAYER *et al.*, 2002a; JALKANEN *et al.*, 2006; GUPTA e GOWDA, 2008; MOURA *et al.*, 2010b; OU *et al.*, 2011). Cistatinas são inibidores de proteases cisteínicas (TURK e BODE, 1991) que são secretadas pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (LI *et al.*, 2005; DACHEUX *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2010b; CARLSSON *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012) e atuam em conjunto com outros inibidores encontrados no plasma seminal, como a α -2-macroglobulina e as serpinas (PELOILLE *et al.*, 1997; MOURA *et al.*, 2010b), além disso, a concentração de α -2-macroglobulina no plasma seminal está relacionada com a qualidade do sêmen (GLANDER *et al.*, 1996). Estes inibidores exercem a função de prevenir a atividade excessiva das proteases, evitando clivagens indesejáveis e potencialmente prejudiciais aos espermatozoides. Alguns inibidores de proteases, como o inibidor tecidual de metaloproteinase 2 (TIMP-2), são componentes do plasma seminal de carneiros (SOUZA *et al.*, 2012) e bovinos (MCCAULEY *et al.*, 2001) a presença dos mesmos na membrana espermática está correlacionada com a fertilidade de touros (BELLIN *et al.*, 1996) porém, através de mecanismo ainda desconhecido.

Além da motilidade, a capacidade de ligação à zona pelúcida e fertilização, também é adquirida, em parte, durante o processo de maturação (AMANN *et al.*, 1993). Esta capacidade é efetivada através da aquisição de novas proteínas presentes no fluido epididimário (SULLIVAN *et al.*, 2007; DACHEUX *et al.*, 2012) ou mesmo por meio da modificação de proteínas já existentes (BAKER *et al.*, 2005; DACHEUX *et al.*,

2006; DACHEUX *et al.*, 2009), criando ou expondo sítios de ligação para as estruturas do oócito (SULLIVAN *et al.*, 2005). Dentre essas proteínas, estão incluídas as glicosidases (DACHEUX e VOGLMAYR, 1983), enzimas que atuam modificando resíduos de glicanos das glicoproteínas presentes na membrana espermática (SRIVASTAVA e OLSON, 1991; SKUDLAREK *et al.*, 1992; SKUDLAREK *et al.*, 1993; TULSIANI *et al.*, 1995). Entretanto, alguns estudos reportaram que estas proteínas ligam-se ao espermatozoide, atuando como lectinas, constituindo sítios de ligação para resíduos de carboidratos da zona pelúcida, como é o caso da β -galactosidase e N-acetilglicosaminidase (MIRANDA *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*, 2000; TULSIANI e ABOU-HAILA, 2011). A alfa fucosidase, outra glicosidase, também se liga à membrana espermática (AVILÉS *et al.*, 1996; VENDITTI e BEAN, 2009) e expressão da mesma no fluido epididimario está correlacionada com a fertilidade em touros (MOURA *et al.*, 2006a), provavelmente por um mecanismo similar ao de outras glicosidases.

3.3.3. Proteínas associadas à capacitação espermática e ligação ao oviduto.

Os espermatozoides provenientes do epidídimo necessitam sofrer outras transformações estruturais e funcionais após a ejaculação com a finalidade de adquirir a máxima capacidade fecundante. Este conjunto de transformações envolve a capacitação espermática e se inicia durante a ejaculação, após o contato com o fluido das glândulas sexuais acessórias (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002) e é concluído no trato genital feminino. A capacitação é um processo complexo, que inclui alterações na composição lipídica e permeabilidade da membrana do espermatozoide (THÉRIEN *et al.*, 1997; CROSS, 1998; VISCONTI *et al.*, 1998; VISCONTI *et al.*, 1999; GRASA *et al.*,

2006; BAILEY, 2010), que levam a mudanças no ambiente intracitoplasmático, incluindo aumentos no conteúdo de cálcio e pH intracelular (HANDROW *et al.*, 1989; PARRISH *et al.*, 1994; DE LAMIRANDE *et al.*, 1997; VISCONTI e KOPF, 1998; BENDAHMANE *et al.*, 2001). Como parte do processo de capacitação, há uma perda seletiva de colesterol e fosfolípidos, o que resulta na redução da proporção colesterol:fosfolípidos (EHRENWALD *et al.*, 1988; THÉRIEN *et al.*, 1998; 1999) e consequente desestabilização da membrana espermática. Este evento é mediado por uma família de proteínas denominadas *Binder of Sperm Proteins* (BSPs), secretadas pelas glândulas vesiculares e que se ligam ao espermatozoide bovino (MANJUNATH *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011) e ovino (SOUZA *et al.*, 2012) durante a ejaculação. No trato reprodutivo feminino, ocorre uma segunda perda de colesterol com parte do processo de capacitação espermática, perda esta mediada pelas BSPs e HDL presente no fluido do oviduto (THÉRIEN *et al.*, 1998).

A participação das BSPs na capacitação do espermatozoide ocorre por meio da interação tanto com a HDL como com a heparina (MANJUNATH *et al.*, 1987; DESNOYERS *et al.*, 1994; THÉRIEN *et al.*, 1997; THÉRIEN *et al.*, 1998; SALOIS *et al.*, 1999; THÉRIEN *et al.*, 2001; VILLEMURE *et al.*, 2003; BOISVERT *et al.*, 2004; BERGERON *et al.*, 2005; LUSIGNAN *et al.*, 2007). Diversos estudos mostram que as BSPs iniciam o processo de capacitação espermática por meio da interação com os fosfolípidos contendo colina (DESNOYERS e MANJUNATH, 1992; MANJUNATH *et al.*, 1994; MANJUNATH e THÉRIEN, 2002) utilizando os domínios de fibronectina tipo II (SALOIS *et al.*, 1999; MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Associado a isso, essas proteínas formam sítios de ligação para heparina e HDL (lipoproteína de alta densidade) presentes no oviduto, na membrana do espermatozoide (THÉRIEN *et al.*, 1995; THÉRIEN *et al.*,

1997), o que estimula uma segunda remoção de colesterol, a qual desestabiliza a membrana, iniciando as vias de transdução dos sinais que irão regular e expressão dos receptores para glicoproteínas presentes na zona pelúcida, tornando o espermatozoide apto à reação acrossômica (BENOFF *et al.*, 1993; THÉRIEN *et al.*, 1998). Além de regular a capacitação espermática, as BSPs também participam da formação do reservatório espermático no oviduto (GWATHMEY *et al.*, 2006). Sob certas condições, a BSP1 bovina pode formar oligômeros, e, nessa condição, podem atuar como chaperonas (SANKHALA e SWAMY, 2010; SANKHALA *et al.*, 2011).

As BSPs ovinas, conhecidas como *ram seminal vesicle proteins* (RSVPs), originam-se nas glândulas vesiculares (SOUZA *et al.*, 2012) e são as mais abundantes no plasma seminal de carneiros (BERGERON *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2012). As RSVPs são expressas como RSVP14 (com 14 kDa) e RSVP22 (com 22 kDa), caracterizadas pela presença de múltiplas isoformas com diferenças no peso molecular e ponto isoelétrico. Até o momento, pouco se sabe sobre as características funcionais das RSVPs e como as mesmas regulam a fisiologia espermática, mas achados recentes mostram que, diferentemente do que se observa em bovinos (THÉRIEN *et al.*, 1995), essas proteínas não apresentam elevada afinidade por heparina e gelatina (MARTINS *et al.*, 2013), sugerindo que, em ovinos, as RSVPs regulam a capacitação espermática por outros mecanismos, ou mesmo que desempenham outras funções.

As espermadesinas são majoritárias no plasma seminal de muitas espécies, como suínos (CABALLERO *et al.*, 2008), cavalos (CALVETE *et al.*, 1995) e carneiros (BERGERON *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2012). O domínio CUB presente nessas proteínas interagem com lipídeos e carboidratos, incluindo aqueles de glicoproteínas do oviduto ou da zona pelúcida (SANZ *et al.*, 1992; BORK e BECKMANN, 1993; TOPFER-

PETERSEN *et al.*, 1998). As espermadesinas originam-se principalmente das glândulas sexuais acessórias (MOURA *et al.*, 2007b; GARCÍA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012) e ligam-se ao espermatozoide durante a ejaculação (CABALLERO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2012). Estas proteínas são implicadas também na capacitação espermática, interação do espermatozoide com o oviduto, promovendo ainda a interação com o ócito (TOPFER-PETERSEN *et al.*, 1998; TOPFER-PETERSEN, 1999; CABALLERO *et al.*, 2005; TALEVI e GUALTIERI, 2010).

3.4. Efeitos da insulação escrotal sobre as secreções hormonais

A biossíntese de esteróides e a produção de espermatozoides são as duas principais funções do testículo, e são fortemente controladas pelas gonadotropinas hipofisárias, e por fatores produzidos localmente. Os testículos secretam vários esteróides que são sintetizados a partir do colesterol, sendo a testosterona o principal deles, a qual é secretada pelas células de Leydig sob estímulo do LH. Os testículos também secretam estradiol por meio da conversão de andrógenos em estrógenos nas células de Sertoli, Leydig e células germinativas (CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU *et al.*, 2002). O estradiol atua regulando o número de células tronco germinativas e a maturação das espermatídes (CARREAU, 2001; CARREAU *et al.*, 2003).

Sabe-se que o estresse térmico é uma das formas adversas que afetam a gametogênese (MAINES e EWING, 1996) e, embora esse efeito seja transitório devido a reduções severas na produção dos esteróides (LIU e STOCCO, 1997; MURPHY *et al.*, 2001), pode ocasionar uma disfunção sexual ou infertilidade nos machos (PAPADOPOULOS, 2007). Estudos sobre degeneração térmica testicular por meio de

insulação escrotal têm demonstrado efeitos sobre a morfologia testicular, e mudanças endócrinas ocorridas durante e após o insulto térmico. BYERS e GLOVER (1984) insularam testículos de carneiros por 28 dias, e observaram que após o insulto térmico ocorreram degenerações típicas no compartimento tubular do testículo, onde espermatozoides, espermatídes e em muitos túbulos, espermatócitos estavam ausentes. Os referidos autores evidenciaram também que as concentrações plasmáticas de FSH foram elevadas e a de testosterona foi usualmente reduzida após a insulação escrotal, havendo mais picos hormonais, mas com redução significativa da amplitude. Os valores de LH foram elevados neste momento, e houve acréscimo no número e amplitude dos episódios de LH. Resultados semelhantes foram observados por SIDIBÉ *et al.* (1992), os quais, estudando as mudanças hormonais ocorridas em touros insulados, mostraram que os níveis plasmáticos de testosterona reduziram e o de LH aumentou durante o tempo de degeneração severa, enquanto que uma tendência oposta foi observada durante a fase regenerativa, e que essas mudanças tornaram-se mais significantes quinze semanas depois da insulação escrotal. Estes achados corroboram com os encontrados por BLANCHARD *et al.* (2000), os quais também observaram decréscimos na concentração plasmática de testosterona gradualmente, e que foram significativamente ($P < 0,05$) menores que o período antes de insulação até 16, 24, 30, 38 e 44 h após o início da insulação escrotal. A redução da concentração de testosterona circulante ocorreu por volta de 16h após o início da insulação, o que provavelmente é resultado do dano à célula de Leydig. Foram observados ainda decréscimos no potencial de produção diária de espermatócitos primários de 34%, e secundários de 60%, sete dias após a insulação ter sido concluída, o que pode ser resultado da diminuição da concentração de FSH quatro dias após a

remoção da insulação. Outros estudos mostraram que os níveis plasmáticos de testosterona e estradiol diminuíram continuamente em suínos, e que somente após a remoção do insulto térmico, houve um contínuo aumento voltando aos níveis normais de estradiol o que não aconteceu com os níveis de testosterona, onde alguns animais levaram até quatro dias para retornar aos níveis normais (MALMGREN 1990). Estudos realizados com ratos (AKTAS e KANTER 2009) mostraram que os números de células de Leydig imunopositivas (LCP) para testosterona foram menores em grupos de hipertermia escrotal do que o grupo controle. Além disso, não houve nenhuma mudança nos números de LCP para testosterona entre 70 e 105 dias após o insulto térmico, ocorrendo apenas aos 140 dias após a hipertermia escrotal. O número e expressão de reatividade de testosterona na LCP foram significativamente superiores em 140 dias após hipertermia escrotal do que todos os outros grupos de tratamento térmico. Observaram ainda por meio de microscopia eletrônica, que as células de Leydig de testículos submetidos à hipertermia contribuem minimamente para a produção total de andrógeno. A maior diferença entre as células de Leydig de testículos tratados (hipertermia) e não tratados (controle) está na presença de gotículas lipídicas no seu citoplasma. Em ratos adultos normais, gotículas de lipídios em testículos do rato adulto são raras (CHRISTENSEN, 1975) e essas gotículas de lipídios são conhecidas por conter substratos para biossíntese de esteróides, e acúmulo de lipídios é considerado como um sinal morfológico de dano a esteroidogênese.

Em resumo, a hipertermia exerce efeitos deletérios sobre os diferentes tipos celulares no testículo. No caso das células de Leydig, afetando a esteroidogênese e, conseqüentemente, a produção dos andrógenos que são necessários para

sobrevivência das células germinativas (TAPANAINEN *et al.*, 1993) e essenciais para a fertilidade e manutenção da espermatogênese (SHARPE, 1994; MCLACHLAN *et al.*, 2002). Além disso, a secreção de estradiol e outros hormônios, como inibina e ativina, além da produção de fatores de crescimento e outras proteínas que regulam o desenvolvimento normal da espermatogênese.

3.5. Efeitos do estresse térmico sobre a reprodução de machos

O estresse térmico é o resultado da incapacidade do animal em perder calor para manter sua homeotermia (WEST, 1999), podendo ser definido também como sendo uma resposta biológica ou conjunto de reações obtidas quando um indivíduo percebe uma ameaça à sua homeostase (MOBERG, 2000). O estresse é acompanhado por aumento na atividade do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) e diminuição na função reprodutiva, sugerindo que haja relação entre estes hormônios com os do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) (SELYE, 1936). De fato, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e os corticosteróides da adrenal iniciam importante papel na modulação do efeito do estresse na função reprodutiva (RIVIER e RIVEST, 1991). Os hormônios relacionados ao estresse podem influenciar a função sexual no hipotálamo, por meio do CRH inibindo a secreção de GnRH, na hipófise, com a redução de LH e FSH nas gônadas, alterando a secreção de esteróides (RIVIER e RIVEST, 1991; PEREIRA, 2005). Tal situação resulta em uma menor eficiência reprodutiva (OLIVEIRA e LIMA, 1994; NUNES *et al.*, 1997), uma vez que a espermatogênese está sob controle do sistema neuroendócrino, além de sofrer influência direta da termorregulação testicular (COURROT e ORTAVANT, 1981).

Contudo, esses efeitos são resultados da ação sistêmica da temperatura sobre a fisiologia reprodutiva, e que não é mediado pelo mesmo mecanismo de ação, nem tampouco refletido na mesma magnitude quando o estresse térmico é localizado, ou seja, diretamente sobre o testículo. Tal fato levou diversos autores a utilizar a insulação escrotal (GLOVER, 1955; 1956; BYERS e GLOVER, 1984; MIEUSSET *et al.*, 1992), como forma de se estudar os efeitos mais diretos e pronunciados da temperatura sobre o testículo, baseando-se na severidade e duração do insulto térmico. Sabe-se que a espermatogênese está sob o controle neuroendócrino, sofrendo influência direta da termorregulação escroto-testicular (BYERS e GLOVER, 1984), e que é necessária a manutenção da temperatura testicular em torno de 4 a 5 °C abaixo da temperatura corporal para adequada espermatogênese (MOULE e WAITES, 1963; COULTER, 1988; KASTELIC *et al.*, 1995). Alguns mecanismos tem papel importante na termorregulação testicular, o que inclui a regulação do fluxo sanguíneo, sudorese, controle da contração e dilatação da musculatura do cremáster (HAFEZ e HAFEZ, 2004), o plexo pampiniforme (ROBERTSHAW e VERCOE, 1980), entre outros (GUNN e GOULD, 1975; BLAZQUEZ *et al.*, 1988; COOK *et al.*, 1994). Entretanto, estudos mostram que estes mecanismos são ineficientes em animais submetidos à insulação escrotal, uma vez que os parâmetros biométricos e seminais foram drasticamente alterados (MOREIRA *et al.*, 2001). De fato, a elevação da temperatura testicular pode causar degeneração do epitélio seminífero (MIEUSSET *et al.*, 1992), caracterizada pela presença de células com núcleos picnóticos e uma irreversível condensação da cromatina (DEVKOTA *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2012), além de alterações na expressão gênica nas células germinativas e de Sertoli, com efeitos diretos sobre síntese de proteínas (GUO *et al.*, 1999; IKEDA *et al.*, 1999) e, em última instância, sobre

os índices de fertilidade (MOULE e WAITES, 1963; MUCCILO *et al.*, 1974; KISHORE e RAO, 1983). Um dos principais efeitos diretos da elevada temperatura sobre o testículo está relacionado com as mudanças no peso e consistência testicular (SETCHELL e WAITES, 1972; FRIDD *et al.*, 1975; MAIN *et al.*, 1978; GALIL e SETCHELL, 1988; MOREIRA *et al.*, 2001; GABALDI e WOLF, 2002). De fato, testículos de carneiros tiveram redução de 50% no seu peso, 21 dias após terem sido submetidos à temperatura de 42 °C por 45 minutos (SETCHELL *et al.*, 1991; HOCHEREAU-DE-REVIERS *et al.*, 1993). Diversos estudos tem mostrado que o estresse térmico testicular reduz a proporção volumétrica do epitélio seminífero e o número de espermatócitos e espermatídes, afetando particularmente a meiose e espermiogênese (MALMGREN e LARSSON, 1989; ROCKETT *et al.*, 2001; DEVKOTA *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2011). De fato, touros portadores de testículos insulados mostram reduzida consistência testicular, alterações no epitélio seminífero e baixa qualidade de sêmen (MULLER *et al.*, 1992; CHACÓN *et al.*, 1999; CHACÓN *et al.*, 2002), sugerindo que a consistência dos testículos está relacionada com a capacidade de produção de espermatozoides (MARAI *et al.*, 2006).

Inicialmente, os efeitos da insulação escrotal são observados mais rapidamente no epidídimo, afetando os espermatozoides já formados, onde se observa uma redução na qualidade do ejaculado, resultado do aumento das patologias espermáticas, com redução da motilidade, vigor e percentual de móveis. (BARTH e OKO, 1989; MOREIRA *et al.*, 2001). Contudo, dependendo da intensidade e duração do insulto térmico, os animais podem tornar-se azoospermicos (BARTH e BOWMAN, 1994; MOREIRA *et al.*, 2001), evidenciando que etapas da espermatogênese,

principalmente a meiose e espermiogênese, foram diretamente afetadas (SANTOS *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 2001; GABALDI e WOLF, 2002).

Corroborando com estas afirmações (FUKUI, 1923; MOORE e OSLUND, 1924; MOORE, 1924) descreveram, em diversas espécies, várias modificações histológicas, como espermatócitos em paquíteno anormais, e alteração no número de espermatogônias, (CHOWDHURY e STEINBERGER, 1964; 1970), além de espermátides (WETTEMANN e DESJARDINS, 1979; MALMGREN e LARSSON, 1989) quando expostos a temperaturas de 43 °C. Em carneiros, grande número de espermatócitos degenerados foram observados 12 horas após os testículos terem sido submetidos a 40 °C por mais duas horas (WAITES *et al.*, 1968). Outros autores reportaram efeitos nas células de Sertoli e na membrana basal dos túbulos seminíferos (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, 1966). Observa-se que uma variedade de células são afetadas de diferentes formas pelo calor sobre o testículo e insultos térmicos prolongados requerem um maior tempo para plena recuperação. Contudo, mesmo após a recuperação dos parâmetros físicos do sêmen, os espermatozoides ainda apresentam reduzida capacidade de fertilização, além de maiores taxas de mortalidade embrionária (HOWARTH JR, 1969; RATHORE, 1969; BRADEN e MATTNER, 1970; BURFENING *et al.*, 1970). Isto sugere que outros aspectos de nível molecular, como dano a RNAs ou ao DNA espermático, ou mudanças nas proteínas do plasma seminal, que atuam no trato genital feminino e ligação do espermatozoide ao oviduto (GWATHMEY *et al.*, 2006) e oócitos (HAO *et al.*, 2008), certamente são alterados pelo estresse térmico testicular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento:

O trabalho foi realizado no Núcleo de Estudos e Ensino em Forragicultura (NEEF) e no Laboratório de Fisiologia Animal, ambos pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, localizados a 3° 45' 02'' de latitude Sul e 38° 32' 35'' de longitude Oeste, com altitude de 15,5 m, e classificação climática de Koeppen do tipo AW.

4.2. Animais experimentais:

Neste estudo foram utilizados seis carneiros adultos Morada Nova, variedade Branca, com idade média de 24 meses, com normalidade reprodutiva, pesando em média $55 \pm 1,7$ Kg e adaptados às condições tropicais. Os animais foram previamente vermifugados, mantidos em confinamento em baias individuais e alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) e ração concentrada segundo os requerimentos do NRC (2007), tendo livre acesso à água e suplemento mineral.

4.3. Delineamento experimental:

4.3.1. Procedimento geral

Os animais tiveram seus testículos insulados por oito dias. Para o processo de insulação, foram confeccionadas bolsas escrotais com uma dupla camada de plástico e

outra de algodão, como reportado anteriormente por (MOREIRA *et al.*, 2001). Os dados relativos à temperatura ambiental, umidade relativa e índice de temperatura e umidade (ITU) foram mensurados durante todas as coletas. As temperaturas retal e testicular, a biometria testicular (circunferência, diâmetro, comprimento e volume) e os parâmetros seminais foram avaliados sete dias antes da insulação, no dia da insulação (imediatamente antes da aplicação da bolsa) duas vezes durante a insulação escrotal e semanalmente na pós-insulação, até a qualidade do sêmen estar equivalente aos valores pré-insulação. O plasma seminal coletado durante o experimento foi submetido à eletroforese bidimensional, os géis foram corados com azul de coomassie e analisados pelo software PDQuest (Bio-Rad, Rockville, MD, USA). Os spots protéicos expressos diferencialmente como resultado da insulação foram identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF). Com base na identificação das proteínas por espectrometria de massas, foram feitas análises de ontologia gênica utilizando o aplicativo STRAP (<http://www.bumc.bu.edu/cardiovascularproteomics/>), nas fases de pré-insulação e aos 29 dias, de forma a se caracterizar as mudanças no perfil protéico associadas a processos biológicos, função molecular e componente celular. Além disso, foram construídas redes de interação interprotéica por meio do aplicativo STRING (<http://string-db.org/>) para melhor entender as conexões entre as proteínas afetadas pela insulação escrotal com os demais componentes moleculares do trato reprodutivo.

4.3.2. Medições dos parâmetros ambientais, temperatura retal e testicular

Os dados climáticos referentes aos parâmetros de temperatura do ar e umidade relativa foram obtidos por meio de um termo-higrômetro (Incoterm, São Paulo, Brasil) localizado no interior das instalações, durante as coletas. O ITU foi calculado a partir do modelo definido por THOM, (1959): $ITU: (0,8 \times T + (UR / 100) \times (T - 14,4) + 46,4)$, onde: T = temperatura do ar (°C) e UR = umidade relativa do ar (%). Imediatamente antes cada coleta de sêmen, foram medidas a temperatura retal e a temperatura superficial testicular de todos os animais. A temperatura retal foi medida usando um termômetro digital (Incoterm, São Paulo, Brasil), como descrito anteriormente por MOREIRA *et al.*, (2001). A temperatura testicular foi medida usando um termômetro de infravermelho (Minipa MT-350, São Paulo, Brasil), apontado diretamente na área de cada testículo. A temperatura testicular foi obtida por meio da média das temperaturas do testículo direito e esquerdo. Durante os dias de insulação escrotal, a temperatura testicular foi obtida rapidamente pela remoção da bolsa térmica de insulação.

4.3.3. Avaliação da biometria e consistência testicular

A circunferência escrotal (CE), o diâmetro, comprimento e volume testicular, foram medidos durante a pré-insulação, insulação e após a remoção da bolsa de insulação, em intervalos semanais, como reportado anteriormente (MOURA e ERICKSON, 1997; SOUZA *et al.*, 2010). O volume testicular foi estimado de acordo com a equação descrita por LUNSTRA *et al.*, (1988), $TV = 0.0396 \times (TD) \times (SC)^2$, onde:

TV: volume testicular;

TD: diâmetro testicular;

SC: circunferência escrotal.

Nas mesmas fases do experimento, a consistência testicular foi avaliada por palpação do testículo direito e esquerdo, e dado um escore de 1 a 4, onde 1 representa maior flacidez da gônada e 4 foi considerado como de consistência normal. Esta abordagem é uma adaptação do método previamente descrito por UNGERFELD e SILVA (2004).

4.3.4. Coleta e análise de sêmen

Amostras de sêmen foram coletadas semanalmente de cada animal e analisados conforme descrito anteriormente (SOUZA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013), com modificações. O sêmen foi obtido por meio de eletroejaculador (Torjet-65; Neovet, Minas Gerais, Brasil) e imediatamente após a coleta, foi adicionado um coquetel inibidor de proteases contendo AEBSF, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Foram utilizados dez microlitros desse coquetel para cada mL de sêmen (MARTINS *et al.*, 2013). As amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria (37°C) e alíquotas foram retiradas para avaliação da concentração espermática, motilidade massal, vigor e porcentagem de espermatozoides móveis. Para avaliação da concentração espermática foi feita uma diluição de 1:400 em um tampão formol-salina e, sendo posteriormente determinada por meio da câmara de Neubauer. Em seguida, foram feitas lâminas para avaliação da morfologia espermática (coradas com azul de bromofenol), segundo MEDEIROS, (2004)

e avaliadas de acordo com metodologia de COLAS (1980), contando 200 células/animal/coleta de sêmen (SOUZA *et al.*, 2010). O sêmen restante foi centrifugado a 700×g por 15min (4 °C) para separação do espermatozoide do plasma seminal. Em seguida o plasma seminal foi centrifugado novamente para remoção de debris celulares (5.000×g, 60 min., 4 °C). Após esta última centrifugação, o plasma seminal foi dividido em alíquotas e armazenado a -20°C.

4.3.5. Eletroforese bidimensional

Para a eletroforese 2-D do plasma seminal, foram escolhidos períodos chave do experimento. Esses períodos correspondem a pré-insulação (dia 0), dias 4 e 8 da insulação, dia 15 (7 dias após a remoção da insulação), dia 29 (quando os animais tornaram-se azoospermicos), dias 50 e 71 (meio e fase final da azoospermia, respectivamente), dia 85 (detecção do espermatozoide no ejaculado), dias 113 e 134 (quando houve recuperação dos parâmetros seminais equivalentes à pré-insulação). Alíquotas do plasma seminal foram usadas para determinar a concentração total de proteína (BRADFORD, 1976), feitas em triplicatas, e usando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) como padrão. A eletroforese do plasma seminal foi conduzida como descrito anteriormente (SOUZA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013), com modificações. Em resumo, amostras de plasma seminal contendo 750 µg de proteína total foram misturadas com solução tampão de (7 M uréia, 2 M tiouréia, 65 mM DTT (dithiothreitol), 0,5% anfólitos (IPG buffer, 4–7), 0,5% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimetilammonio]-1- propanesulfonate) e traços de azul de bromofenol suficiente para fazer 340 µL. Em seguida, as amostras foram

depositadas nas canaletas da bandeja de re-hidratação, e incubadas por aproximadamente 20h com tiras de pH imobilizado (IPG) de 18 cm (faixa de pH linear variando de 4 a 7; GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA). As tiras de IPG foram submetidas a focalização isoelétrica em equipamento Ettan™ IPGphor 3™ (GE Lifesciences Piscataway, NJ, USA) a 20°C, de acordo com o seguinte programa: 500 V (500 Vh), 1000 V (800 Vh), 10000 V (16500 Vh) and 10000 V (16000 Vh), com um total de 33805 Vh. Após a focalização, as tiras foram incubadas (15 min.) em solução de equilíbrio I (6 M uréia, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT), e, em seguida, incubadas por mais 15 minutos em solução de equilíbrio II (similar à solução I, mas contendo 2,5% de iodoacetamida ao invés de DTT). Após o equilíbrio, as tiras foram fixadas sobre géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com concentração homogênea (12,5%), utilizando-se uma solução de agarose (5% em tampão de corrida SDS-PAGE), e as proteínas foram separadas com base na massa molecular a 500 V e 40 mA por gel (Ettan™ Dalt Six (GE Lifesciences, USA)). Os géis foram corados com azul de Coomassie, baseado no protocolo descrito por CANDIANO *et al.* (2004) e depois adaptado no Laboratório de Fisiologia Animal (SOUZA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013). Após a eletroforese bidimensional, os géis foram lavados três vezes (20 minutos cada) em solução contendo ácido fosfórico (2%) e etanol (30%). Em seguida, três outras lavagens em ácido fosfórico (2%) e, posteriormente os géis foram imersos por 72 horas em solução contendo ácido fosfórico (2%), etanol (18%) e sulfato de amônia (15%), adicionado de 8 mL de solução de azul de coomassie G-250 (2%).

4.3.6. Análise dos mapas protéicos

Os mapas bidimensionais foram escaneados com 300 dpi de resolução (ImageScanner III; GE Lifesciences, USA) em modo transparente, salvo no formato TIFF e analisados usando o software PDQuest, versão 7.3.0 (Bio-Rad, USA). Foi utilizada a estratégia previamente descrita em detalhes (MOURA *et al.*, 2006a; MOURA *et al.*, 2006b; MOURA *et al.*, 2007b; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). Para esta análise, foram utilizados um grupo de 40 géis, incluindo as amostras coletadas no período pré-insulação (5 géis), durante a insulação (nos dias 4 e 8 ; 6 e 5 géis, respectivamente) no dia 15 (6 géis), 29 (4 géis), 50 (4 géis), 71 (3 géis), 85 (4 géis), 113 (6 géis) e 134 (5 géis). O gel master foi baseado em um gel da pré-insulação e outras proteínas consistentemente presentes em outros mapas foram adicionados ao master. Proteínas presentes em diversas regiões dos géis foram usadas como referência de forma que todos os *spots* fossem corretamente associados ao seu correspondente em cada um dos géis analisados no experimento. A quantificação dos spots protéicos nos géis foram dados por partes por milhão (ppm) do total da densidade óptica integrada dos spots, de acordo com o PDQuest.

4.3.7. Digestão dos *spots* protéicos

As proteínas separadas por eletroforese bidimensional e marcadas como spots nos géis de plasma seminal foram descoradas e submetidas a digestão com tripsina, como descrito anteriormente (MOURA *et al.*, 2006a; SOUZA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013). Neste caso, foram selecionados spots identificados por análise estatística

e, expressados diferencialmente nas fases experimentais. Cada spot foi cortado individualmente de pelo menos três géis, em pedaços 1mm^3 e transferidos para tubos limpos. O corante e o SDS foram removidos dos spots após três lavagens em $400\ \mu\text{L}$ de uma solução contendo acetonitrila (50%) e bicarbonato de amônio (50%; $25\ \text{mM}$ pH 8,0). Em seguida, os pedaços de gel foram desidratados após duas lavagens com $200\ \mu\text{L}$ de acetonitrila absoluta por 5 minutos e secos a temperatura ambiente. Em seguida, o material resultante foi incubado por 20h ($37\ ^\circ\text{C}$) com tripsina (166 ng/spot; Promega, cat. # V5111, Madison, WI, USA). Os peptídeos foram extraídos dos pedaços de gel pela lavagem com 5% de ácido trifluoroacético, 50% de acetonitrila, em bicarbonato de amônio ($50\ \text{mM}$) durante 30 min., em três lavagens. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos e secadas sob vácuo (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA). Um pedaço de gel sem *spots* e um pedaço da banda correspondente à albumina, dos marcadores de peso molecular, foram cortados e submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima, sendo utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

4.3.8. Identificação de proteínas por espectrometria de massas (electrospray ionization-quadrupole-time of flight (ESI-Q-ToF)).

Conforme descrito anteriormente por SOUZA *et al.*, (2012), os peptídeos ($1\text{-}5\ \mu\text{L}$) foram injetados em solvente A (acetonitrile/água/ácido fórmico, 5/94,9/0,1) utilizando a bomba auxiliar da unidade UPLC para interagir com uma coluna Waters Symmetry 300™ (C-18, filme de $5\ \mu\text{m}$; $0,3\ \text{mm} \times 5\ \text{mm}$) para dessalinização e pré-concentração. Após lavagem por 3 minutos com solvente A a $20\ \mu\text{L}/\text{min}$, os peptídeos foram então

eluídos num gradiente de concentração para a coluna analítica nanoACQUITY HSS T3 (C-18 1,8 μ m, 0,075 x 200 mm). A coluna analítica foi corrida num gradiente (5 a 42% em solvente B; acetonitrile/água/ácido fórmico; 95/5/0,2; durante 40 minutos. O espectrômetro foi calibrado utilizando fragmentos iônicos do peptídeo Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib), de forma a manter a acurácia em 10 ppm.

O espectrômetro foi operado para adquirir espectros MS/MS dos peptídeos tripticos em modo dependente de dados (data-dependent acquisition; DDA) para o íon precursor utilizando o reconhecimento de estado de carga e limite de intensidade como critérios de seleção, por meio do aplicativo MassLynx 4.1. De forma a se obter os dados MS/MS, uma varredura (2 seg.) foi realizada nos dados de relação massa/carga (m/z) entre 400 e 1500. De cada varredura, até os 4 íons mais intensos, com base nos critérios de seleção foram escolhidos para obtenção dos espectros resultantes de dissociação induzida por colisão (CID) na presença de argônio.

Os espectros iônicos resultantes (6-8 seg.) foram processados utilizando o aplicativo Protein Lynx Global Server 2.4 e convertidos em arquivos de lista de picos (peak list files; PKL) para busca em bancos de dados. Para identificação das proteínas, foram feitas buscas utilizando os arquivos pkl contra os bancos de dados do NCBI e Swissprot, utilizando a ferramenta de buscas MASCOT (PERKINS *et al.*, 1999). As buscas foram feitas utilizando os seguintes critérios: máximo de uma clivagem perdida da tripsina, peptídeos monoisotópicos, com modificação variável de oxidação da metionina e variação fixa de carbamidometilação das cisteínas. Os limites selecionados de tolerância para variação da massa dos peptídeos e dos fragmentos foram 0,3 e 0,1 Da, respectivamente. Contudo, as identidades dos peptídeos só foram aceitas se os

valores de m/z observados diferissem, no máximo, em 0,1 Da das massa teóricas, durante revisão manual dos resultados das buscas.

4.3.9. Análises de Ontologia Gênica e Interação entre Proteínas

Os dados das proteínas do plasma seminal listados na Tabela 2 (anexo) foram analisados usando o programa para anotações de proteínas (STRAP), um aplicativo de código-fonte aberto (BATHIA *et al.*, 2009). Os termos da ontologia gênica para os processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares foram obtidas da base de dados do UniProtKB e EBI GOA.

Para as avaliações das interações interprotéicas, algumas proteínas que tiveram suas expressões aumentadas em função da insulação escrotal (albumina, proteína PDJ-1 HSP 70) foram analisadas a partir da base de dados STRING 9.0 (<http://string-db.org>), a partir de predições coletadas com base em associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais), integrando evidências de diversas fontes, tais como contexto genômico, experimentos em larga escala, co-expressão e dados obtidos a partir de outras publicações (SZKLARCZYK *et al.*, 2011).

4.3.10. Análise estatística

O experimento foi conduzindo sob delineamento em blocos casualizado, onde se avaliou os períodos em relação à insulação escrotal, e os animais considerados os blocos. Todas as variáveis foram expressas como média e erro padrão e avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e por suas

assimetrias e curtoses, por meio do procedimento UNIVARIATE do SAS (SAS, 2002), sendo transformadas por $\log(x+1)$ ou $\arcsen(\sqrt{x/100})$, quando necessário. As variáveis paramétricas foram avaliadas por análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS e as médias foram comparadas pelo teste t. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os períodos pelo teste de Friedman (SAMPAIO, 2002). Inicialmente realizou-se uma ordenação das variáveis pelo procedimento RANK do SAS. Em seguida as variáveis ordenadas foram avaliadas pelo GLM do SAS e as médias comparadas pelo método dos quadrados mínimos (IPE, 1987).

Para a análise estatística das diferenças entre as intensidades dos spots, foram utilizados géis do plasma seminal obtido antes da insulação, durante a insulação, no início da pós-insulação, quando a qualidade do ejaculado foi mais comprometida (dia 29), e quando os parâmetros seminais retornaram aos valores pré-insulação (dias 113 e 134). Esses géis representam como os de menor variação entre os animais, dentro de cada período.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros ambientais e temperaturas retal e testicular

Os valores médios da temperatura e umidade relativa do ar, e do ITU foram de $29,5 \pm 0,1$ °C, $57 \pm 0,2\%$ e $78 \pm 0,1$, respectivamente, durante todo o período experimental, com valor máximo de ITU de 81,5. A temperatura retal dos animais antes da insulação escrotal foi de $38,4 \pm 0,1$ °C. Houve, entretanto, um decréscimo no seu valor quatro dias após a insulação, com os valores retornando ao normal no dia oito, dia da retirada da bolsa térmica de insulação (Figura 1A). A temperatura superficial do testículo passou de $31,2 \pm 0,2$ °C (antes da insulação) para $35,2 \pm 0,3$ °C durante a insulação ($p < 0.05$), porém, com retorno aos valores pré-insulação, sete dias após a remoção da bolsa. (Figura 1B).

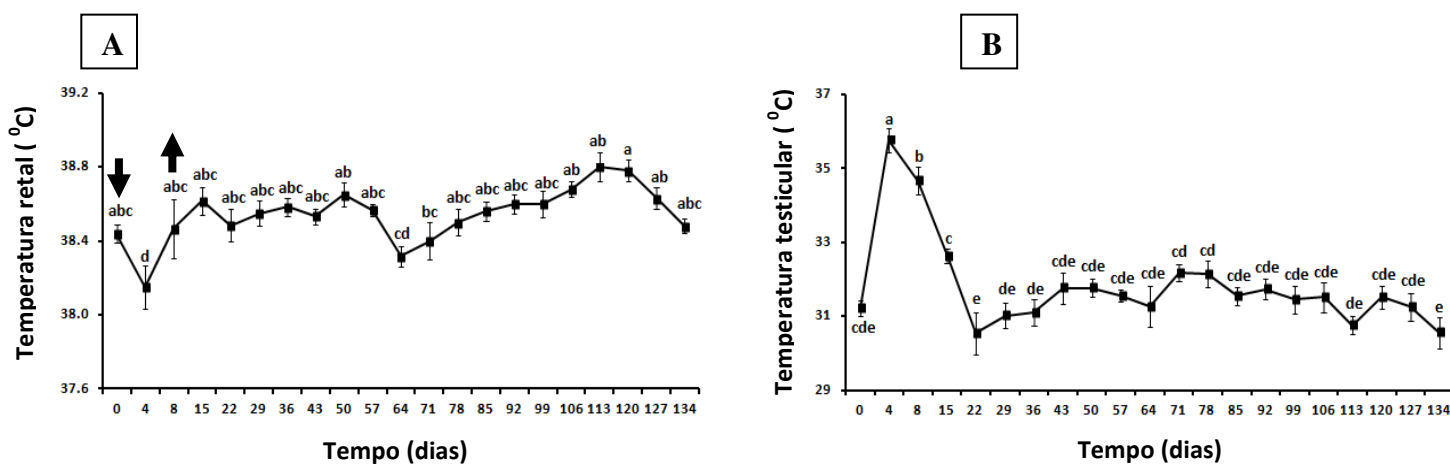


Figura 1: Mudanças na temperatura retal (A) e testicular (B) em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

5.2. Biometria testicular

A circunferência escrotal (CE) apresentou valores de $30,0 \pm 0,4$ cm e foi determinada no período de pré-insulação, contudo, ocorreu elevação para $31,0 \pm 0,9$ cm quatro dias após o início da insulação ($p < 0,05$). Após o dia quatro, a CE diminuiu constantemente, atingindo o seu menor valor no dia 36 ($22,6 \pm 0,6$ cm; $p < 0,05$). A partir desta fase, a CE iniciou um aumento e tornou-se equivalente aos valores pré-insulação no dia 71 (63 dias após o fim da insulação testicular; Figura 2A). O mesmo padrão de comportamento foi observado para as outras variáveis biométricas, contudo, o diâmetro e o volume testicular retornaram aos valores normais somente no dia 85 (Figura 2C-D). A consistência testicular foi consideravelmente reduzida desde o início da insulação, partindo de um escore 4 ± 0 na pré-insulação para $2,3 \pm 0,1$ no último dia da insulação e com escore 1 ± 0 no dia 36 ($p < 0,05$; Figura 2). Após o dia 36, a consistência testicular aumentou gradualmente, alcançando os valores pré-insulação no dia 71 (Figura 3).

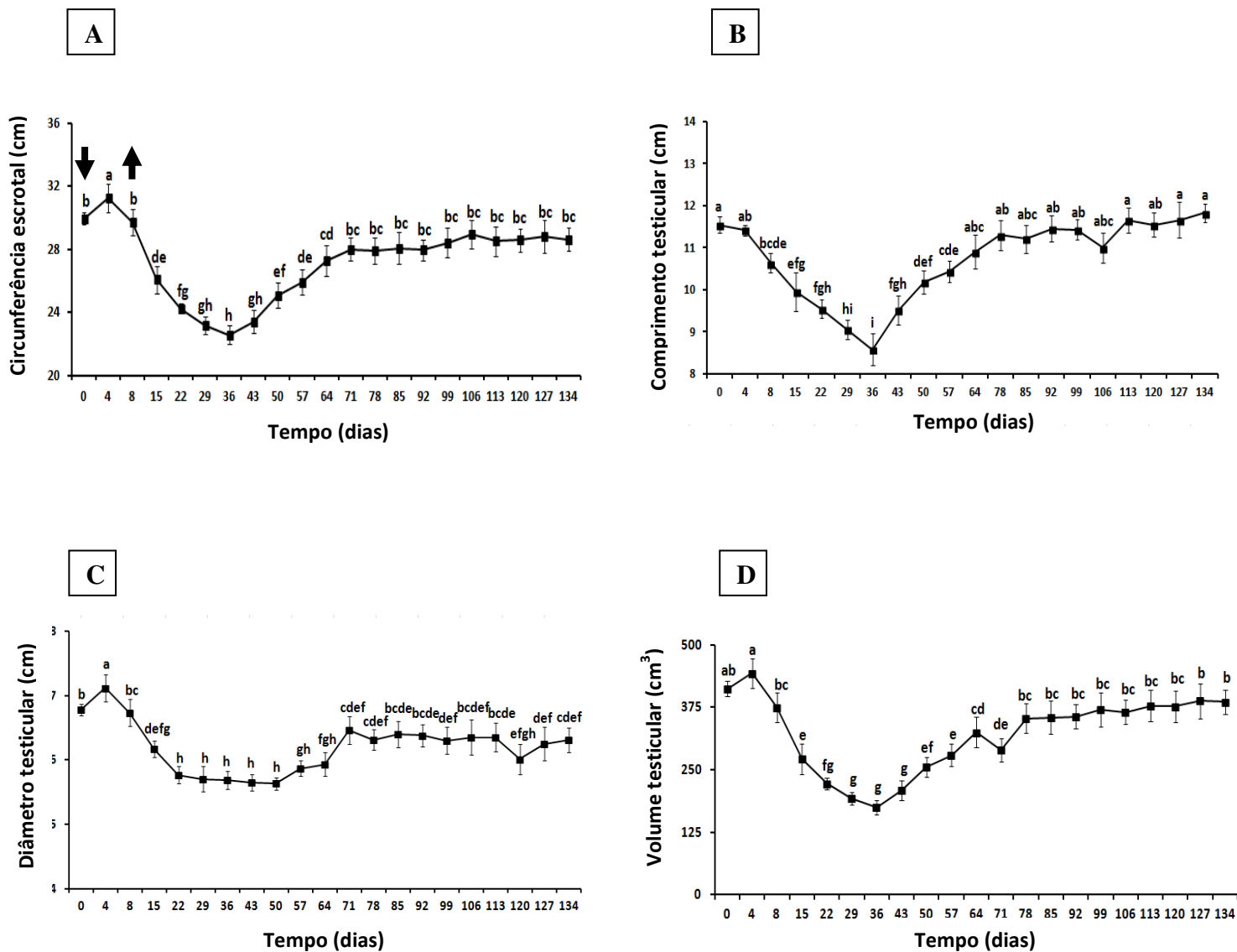


Figura 2: Mudanças na circunferência escrotal (A), comprimento (B), diâmetro (C), e volume testicular (D) em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p > 0,05$).

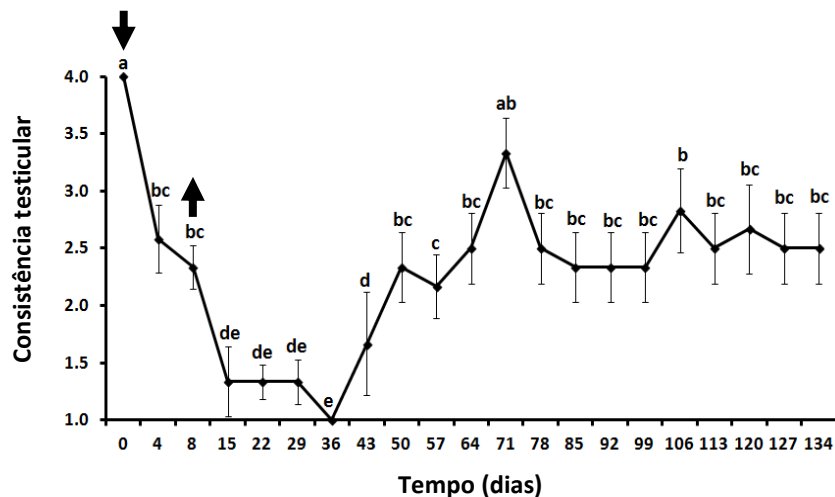


Figura 3: Mudanças na consistência testicular em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p > 0,05$).

5.3. Parâmetros seminais

Motilidade massal, percentagem de espermatozoides móveis e vigor espermático foram significativamente reduzidos quatro dias após o início da insulação escrotal e atingiram valores próximos de zero no dia 8 ($p < 0,05$). A partir daí até o dia 71, os espermatozoides não mostraram sinais de motilidade. Entre os dias 71 e 78, os critérios associados com motilidade espermática iniciaram seu aumento e, mudanças ($p < 0,05$) tornaram-se evidentes no dia 92. A motilidade massal, retornou aos valores pré-insulação no dia 92 e a percentagem de espermatozoides móveis e vigor espermático foram equivalentes à pré-insulação no dia 113. A concentração espermática foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida oito dias após o início da insulação e, no dia 29, todos os carneiros tornaram-se azoospérmicos, permanecendo

assim até o dia 71, exceto para um animal que teve um início de recuperação (63 dias após o fim da insulação). Os valores retornaram ao normal no dia 92 (Figura 4A-D).

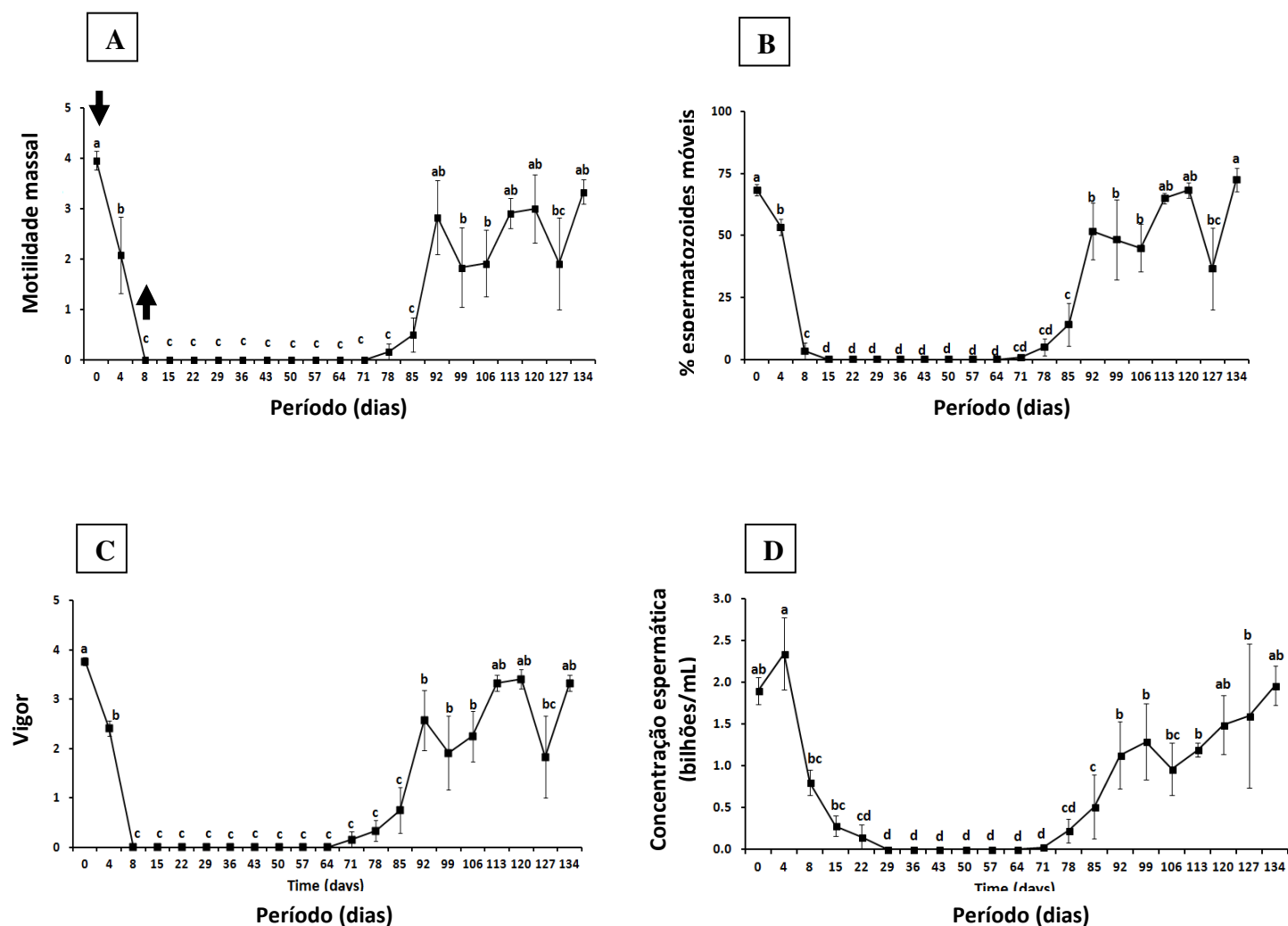


Figura 4: Mudanças na motilidade massal (A), percentagem de células móveis (B), vigor espermático (C) e concentração espermática (D) em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p > 0,05$).

Como resultado da insulação testicular, a percentagem de células morfológicamente normais também foi afetada, reduzindo de $92 \pm 2,7\%$ na pré-insulação para $82 \pm 6,9\%$ e $39 \pm 4,2\%$ no dia 4 e 8, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 5). Após o dia 8, a percentagem de espermatozoides normais continuou seu decréscimo e os animais tornaram-se azoospérmicos do dia 29 ao 64. Após o dia 64, (56 dias após o término da insulação escrotal), os ejaculados mostraram um pequeno número de espermatozoides normais, porém, este com retorno aos valores pré-insulação somente no dia 106 (98 dias após o fim da insulação; Figura 5).

Precedendo a insulação escrotal, as amostras de sêmen apresentaram muitas células com gota citoplasmática distal (0,8%), cauda enrolada (4,7%) e cabeça solta normal (5%). Oito dias após o início da insulação, os ejaculados tiveram $40 \pm 8,7\%$ de células anormais, aumentando em 29% quando comparados aos valores determinados antes da insulação (Figura 5). Também aos oito dias após a insulação, os ejaculados tiveram 6, 21, 13 e 12,5% de células com gota citoplasmática distal, cauda enrolada, cauda dobrada e decapitados, respectivamente. Nas primeiras duas semanas após o fim da insulação escrotal, (dias 15 e 22), as amostras de sêmen ainda apresentaram defeitos de cabeça (piriforme: 4,6% e cabeça de contorno anormal: 4,2%) e defeitos de peça intermediária (peça dobrada: 4%). No dia 106, os ejaculados apresentavam-se com $90 \pm 2,1\%$ de espermatozoides normais, os quais foram equivalentes aos valores de pré-insulação ($p > 0,05$). Nesta fase (dia 106), a ocorrência de células com gota citoplasmática distal (3,5%), cauda enrolada (2%) e cabeça solta normal (3,5%) foi equivalente aos observados na pré-insulação.

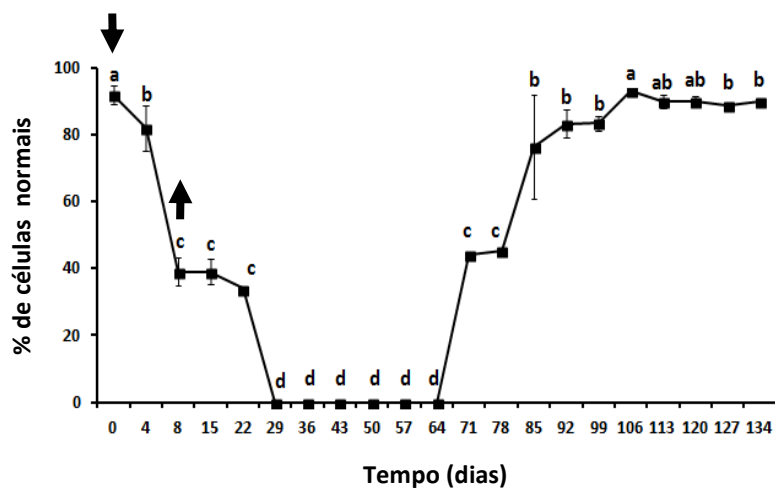


Figura 5: Mudanças no percentual de células normais em carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p > 0,05$).

5.4. Proteínas do plasma seminal

Antes da insulação escrotal, houve uma média 256 ± 31 spots por gel 2-D do plasma seminal, com 132 spots consistentemente presentes em todos os géis. Após oito dias de insulação, o número de spots por gel diminuiu para $151 \pm 8,8$ ($p < 0,05$). No dia 29 (21 dias após a remoção da bolsa de insulação), houve somente 104 ± 14 spots/gel ($p < 0,05$), com 57 spots presentes em cada mapa proteico do match set. Após o dia 29, o número de spots/gel mostrou uma gradual recuperação, alcançando um valor de 183 ± 9 e 223 ± 19 spots nos dias 113 e 134, respectivamente, o qual foi equivalente ($p > 0,05$) aos mapas 2-D avaliados antes da insulação testicular (Figura 6).

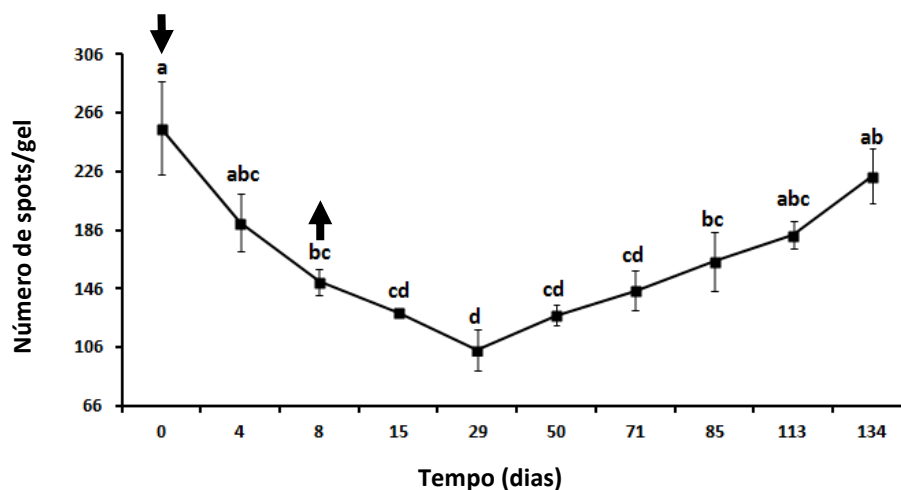


Figura 6: Mudanças no número de spots proteicos no plasma seminal de carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). As setas indicam o início (dia 0) e remoção (dia 8) da bolsa de insulação. Os valores do dia 0 representam a média de duas avaliações, retiradas sete dias antes e no dia da aplicação da bolsa. Valores seguidos por letras idênticas não são estatisticamente diferentes. ($p > 0,05$).

Alguns spots detectados nos géis de plasma seminal coletado antes da insulação foram completamente ausentes quando os ejaculados apresentaram reduzidos valores de motilidade ou foram azoospermicos (Figura 7). Esses spots correspondem a isoformas de albumina, arilsulfatase A, plasma glutamato carboxipeptidase, catepsina F, transferrina, alfa-2-macroglobulina, enzima conversora de angiotensina (ACE), alfa fucosidase, beta galactosidase, chaperoninas contendo TCP-1, proteínas de choque térmico 70 kDa (Figura 7, caixa A), clusterina, “palate, lung and nasal epithelium clone” (PLUNC) (Figura 7, caixas B and C), “ram seminal vesicles protein” (RSVP) 22 kDa (Figure 7, caixas D and E), bodesina 2 (Figura 7, caixas E and F), RSVP 14 kDa, superóxido dismutase (SOD), cistatina B (Figura 7, caixa F), peroxiredoxina 5 (PRX5),

tecido inibidor de metaloproteinase 2 (TIMP-2; Figura 7, caixa G). As identidades desses spots foram obtidos pelo “matching” dos seus valores de kDa e ponto isoelétrico (pI) com esses mesmo spots descritos em estudos prévios sobre o proteoma do plasma seminal de carneiros deslanados (SOUZA *et al.*, 2012). Com exceção da clusterina, RSVP 14 e 22 kDa e bodesina 2, todas as outras proteínas listadas acima desapareceram completamente como consequência da insulação. Embora, as RSVPs e bodesina 2 (Bdh-2) estivessem presentes em todos os períodos (antes, durante e após insulação), houve uma grande variação no número de spots de RSVP e Bdh-2 presentes nos géis após os animais terem sido insulados. A quantidade de spots para estas proteínas diminuíram após a aplicação da bolsa de insulação e a menor quantidade de spots foi observada no dia 29. (Figura 7, caixa D e E (RSVP22), caixas E e F (Bdh2), caixa F (RSVP 14). Após o dia 29, o número de spots para essas três proteínas aumentaram e retornaram para um valor similar a pré-insulação por volta do dia 134. Uns poucos spots de clusterina (Figura 7, caixas B e C) apareceram com intensidade fraca já nos dias quatro e oito, porém, muitos spots permaneceram quase indetectáveis entre os dias 15 e 29. No dia 50, cinco spots de clusterina apareceram novamente nos géis (Figura 7, caixa C) e, no dia 71, sete spots adicionais foram encontrados (Figura 7, caixa B). No dia 85, o número de spots de clusterina aumentaram progressivamente (Figura 7, caixas B e C), mas alguns spots (caixas B e C; Figura 7) ainda estavam ausentes mesmo até o dia 134, quando comparados aos géis obtidos de antes da insulação.

Dentre as proteínas remanescentes, a primeira a ser detectada novamente após a insulação foi a cistatina B (15 dias), seguida por alfa-2-macroglobulina (50 dias), ACE, alfa-L-fucosidase, chaperonina contendo TCP1subunidade β (TCP1 β) e PLUNC (71 dias), TCP-1 α e ϵ subunidades (85 dias), catepsina F, SOD e PRX5 (113 dias), e

finalmente plasma glutamato carboxipeptidase, transferrina, β galactosidase e TIMP-2 (134 dias). Todas essas proteínas seguiram um padrão similar, aparecendo primeiro como um spot fraco, mas com aumentos na intensidade até os valores tornarem-se similares a pré-insulação, por volta do dia 134.

A intensidade dos 21 spots, referentes às 17 proteínas, foram significativamente alteradas nos mapas do plasma seminal como resultado da insulação escrotal (Figura 8). Após o insulto térmico no testículo dos carneiros, o plasma seminal teve maior expressão de actina (duas isoformas), albumina, “heat shock protein” 70 kDa (HSP70.3), proteína DJ-1 (PDJ-1), “HRPE773-like”, proteína C-reativa (CRP), bodesina-2 (uma isoforma), espermedesinas “porcine seminal plasma” (PSP)/PSP-I e PSP-II (Figura 9A). Os spots protéicos alcançaram uma maior intensidade entre o dia 8 (fim da insulação escrotal) e 29, retornando aos valores pré-insulação no dia 113. A exceção refere-se a uma isoforma de actina, retornando ao normal no dia 134, PDJ-1 e CRP, as quais não retornaram aos valores pré-insulação mesmo após o dia 134 (126 dias após o fim da insulação escrotal; Figura 9A). Em alguns casos, mais de uma proteína foi identificada no mesmo spot (Figura 9 A-C, caixas 1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 19 e 21).

Algumas proteínas do plasma seminal tiveram suas expressões diminuídas como resultado da insulação escrotal foram identificadas como a dipeptidil peptidase 3 (DPP3), duas isoformas da HSP 90 kDa (HSP90.1) e da RSV22 e três isoformas de MMP2 e de Bdh-2 (Figura 9B).

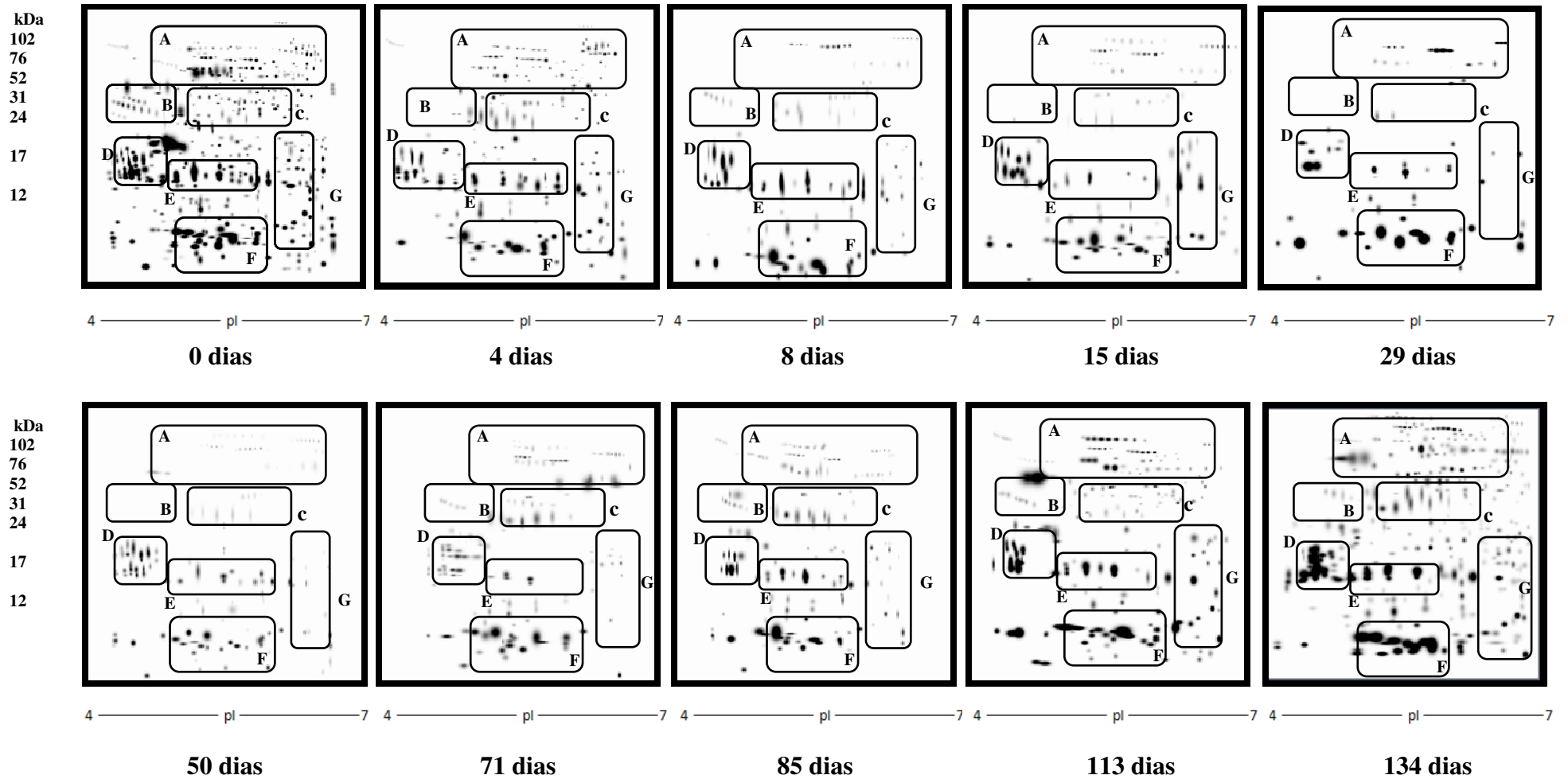


Figura 7: Mapas representativos do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco antes (dia 0), durante (4 e 8 dias) e após a insulação escrotal. Os géis foram corados com azul de coomassie e analisados usando o software PDQuest (Bio-Rad, USA).

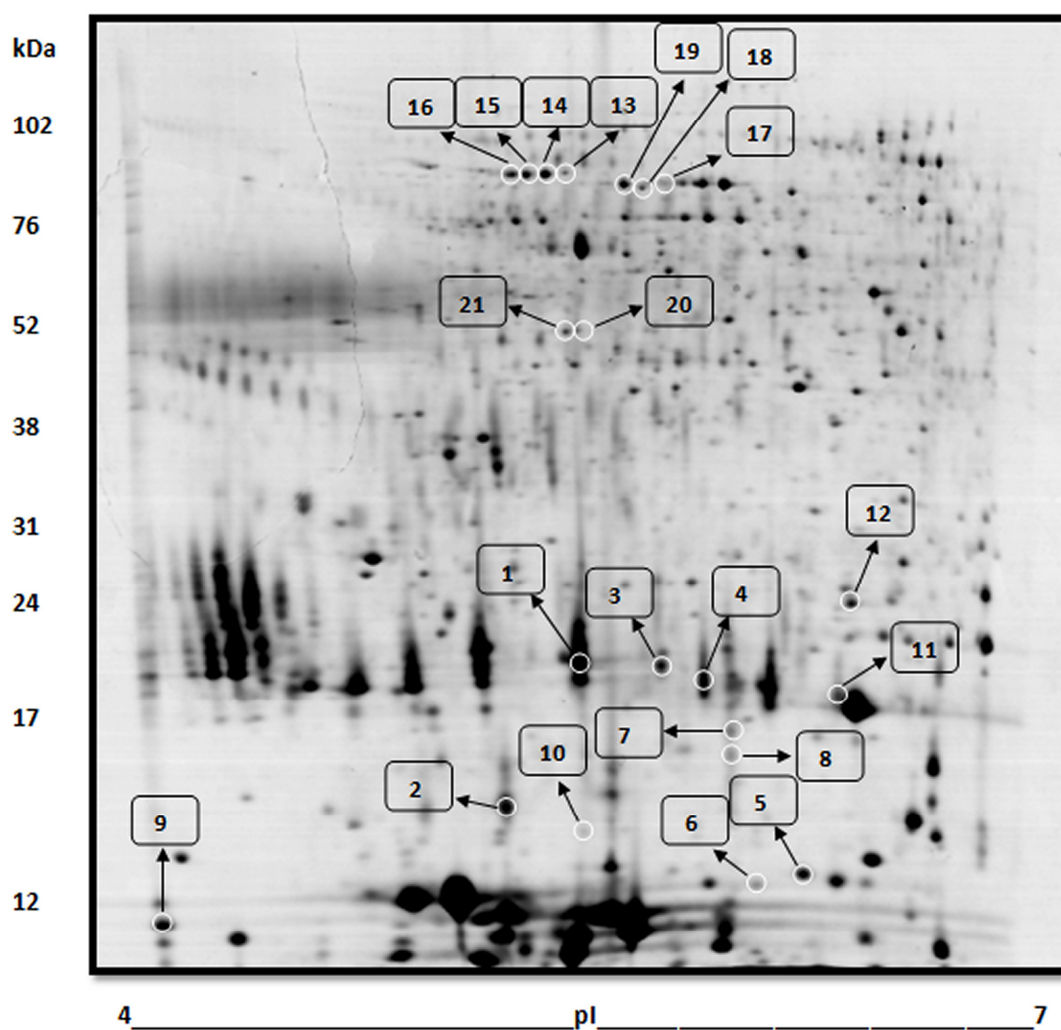
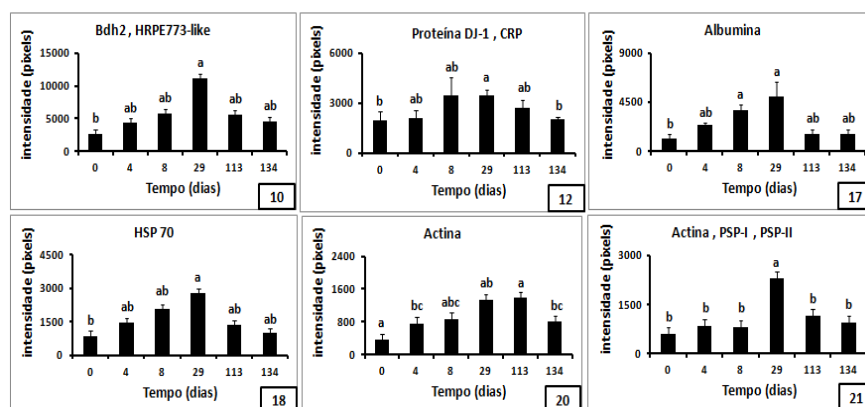
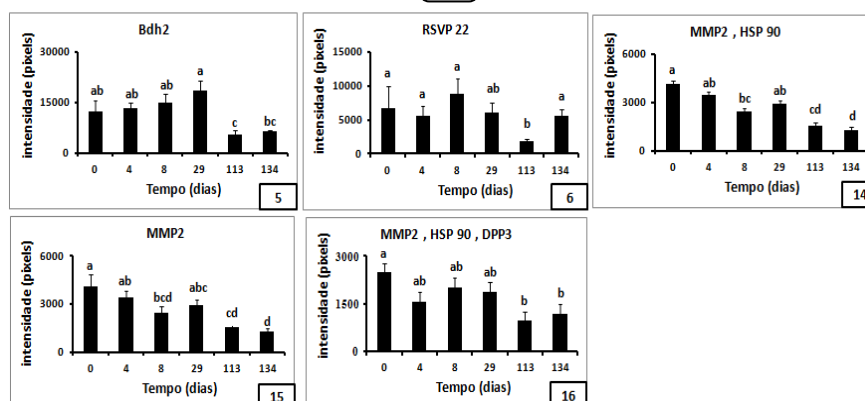


Figura 8: Mapa bidimensional do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco. A imagem corresponde ao gel referência obtido antes da insulação (dia 0). Os spots numerados representam os que foram expressos diferencialmente em função da insulação escrotal, e referem-se aos mostrados no anexo como Tabela 1. As proteínas foram coradas com azul de coomassie e identificadas por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF).

A



B



C

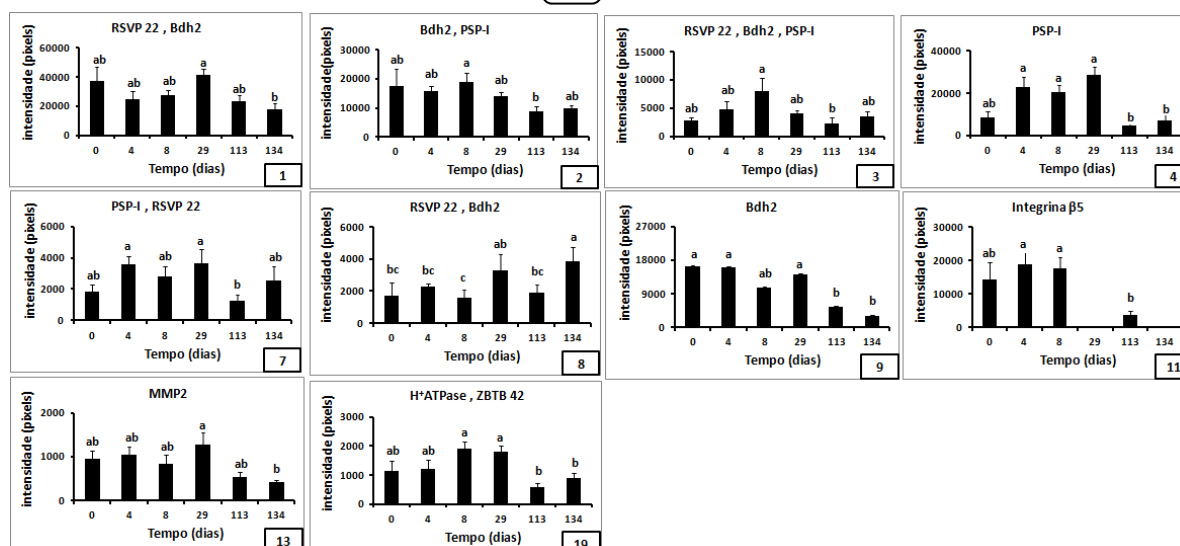


Figura 9: Mudanças na intensidade dos spots protéicos expressos diferencialmente nos mapas do plasma seminal de carneiros Morada Nova branco submetidos a insulação escrotal (média \pm erro-padrão). Valores seguidos por letras idênticas não são diferentes (p > 0,05).

Como parte desse grupo, RSVP22, DPP3, Bdh-2 (todas as isoformas) e uma isoforma de MMP2 e HSP90.1 foram reduzidas somente no dia 113 (RSVP22) e 134 dias (todas as outras). A expressão de duas isoformas de MMP2 e uma de HSP90.1 foi reduzida durante o experimento, alcançando seu menor valor no dia 134 (126 dias após a remoção da bolsa de insulação).

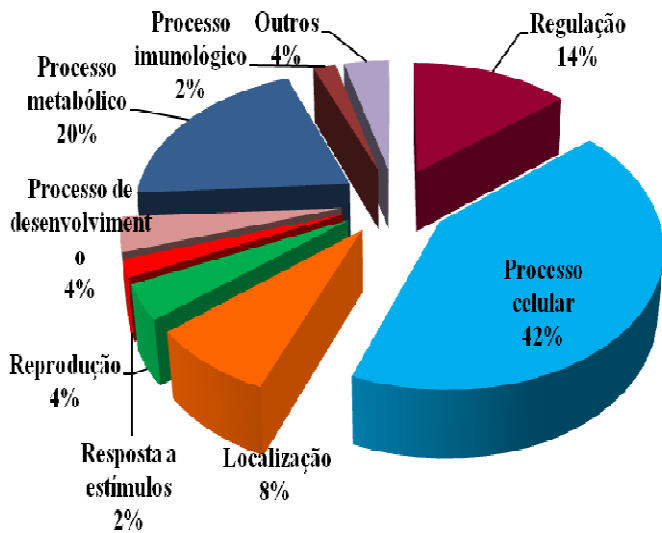
Spots identificados como integrina $\beta 5$, subunidade A da ATPase H^+ tipo V, “ZBTB 42-like protein”, duas isoformas de Bdh-2, PSP-I e uma de RSVP22 foram aumentadas após a insulação. As intensidades desses spots alcançaram seus valores máximos ($p < 0,05$) oito dias após o início da insulação ou no dia 29 (quando os ejaculados foram azoospermicos). Baseado nas intensidades dos spots, a expressão dessas proteínas retornaram aos níveis de pré-insulação no dia 113. Uma isoforma de MMP2, entretanto, retornou a expressão pré-insulação somente no dia 134 (Figura 9C).

5.5 Análises de Ontologia Gênica e Interação entre Proteínas

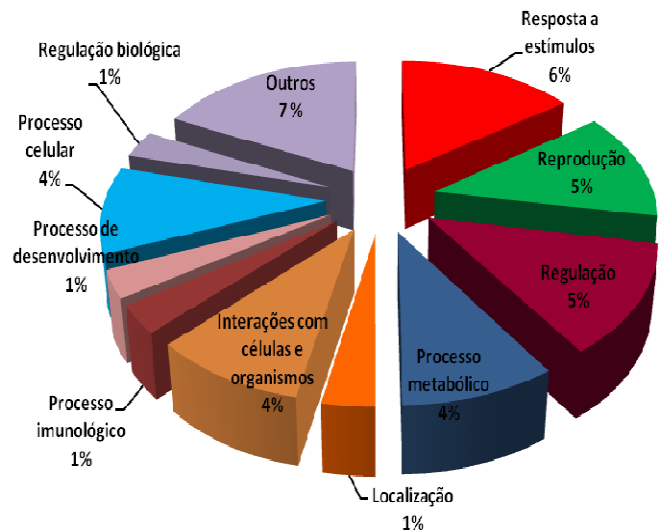
As 17 proteínas identificadas por espectrometria de massas e diferencialmente expressadas no plasma seminal como resultados da insulação escrotal participam principalmente em processos biológicos associados com resposta a estímulos (6%), reprodução (5%) e regulação (5%), entre outros eventos metabólicos, além de interações com células e organismos (Figura 10). A maioria dessas proteínas apresentam função de ligação (14%), atuando como chaperonas (4%), e com atividades catalítica (3%) e antioxidante (3%). Também, algumas proteínas são secretadas (9%) ou são componentes do citoplasma, núcleo, citoesqueleto, membrana

plasmática e complexos macromoleculares. Informações detalhadas sobre todas as classes da ontologia gênica são mostrada no anexo como Tabela 2.

PROCESSO BIOLÓGICO

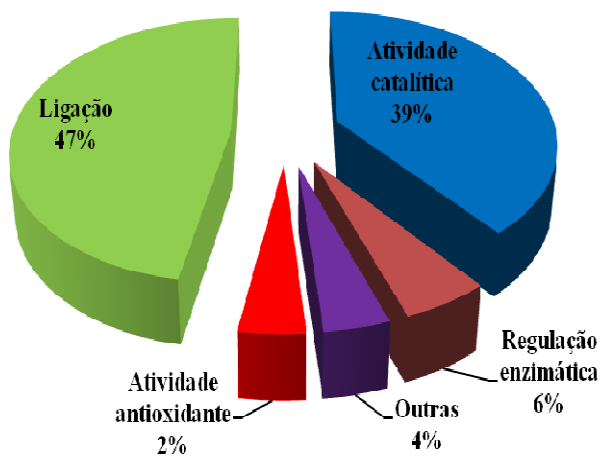


DIA 0

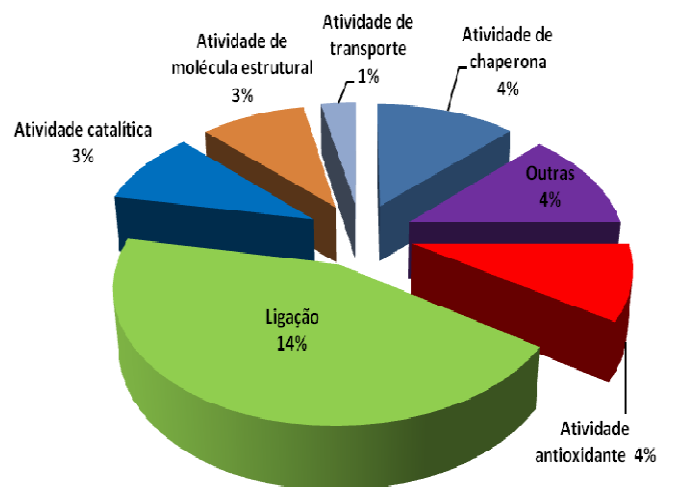


DIA 29

FUNÇÃO MOLECULAR

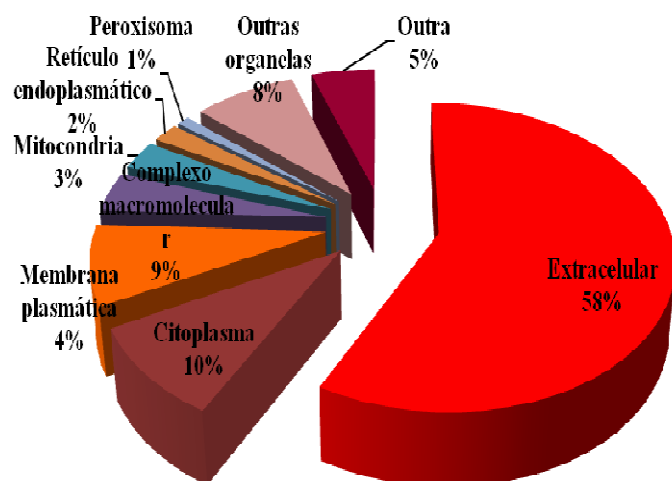


DIA 0

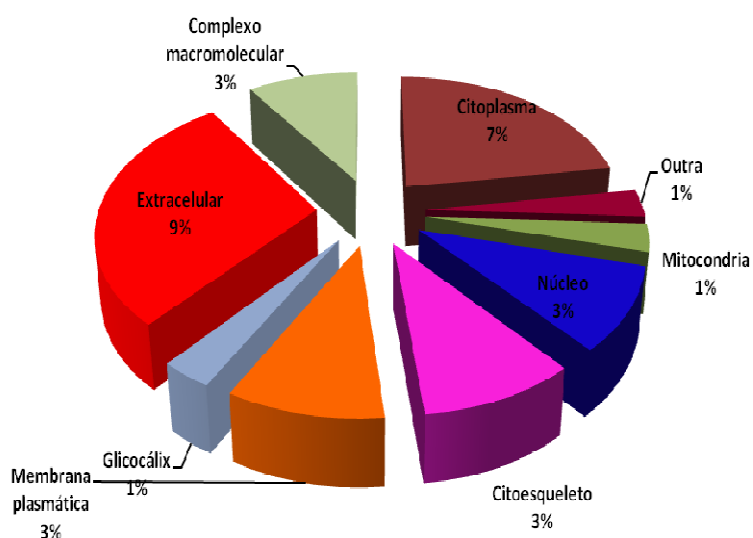


DIA 29

COMPONENTE CELULAR



DIA 0

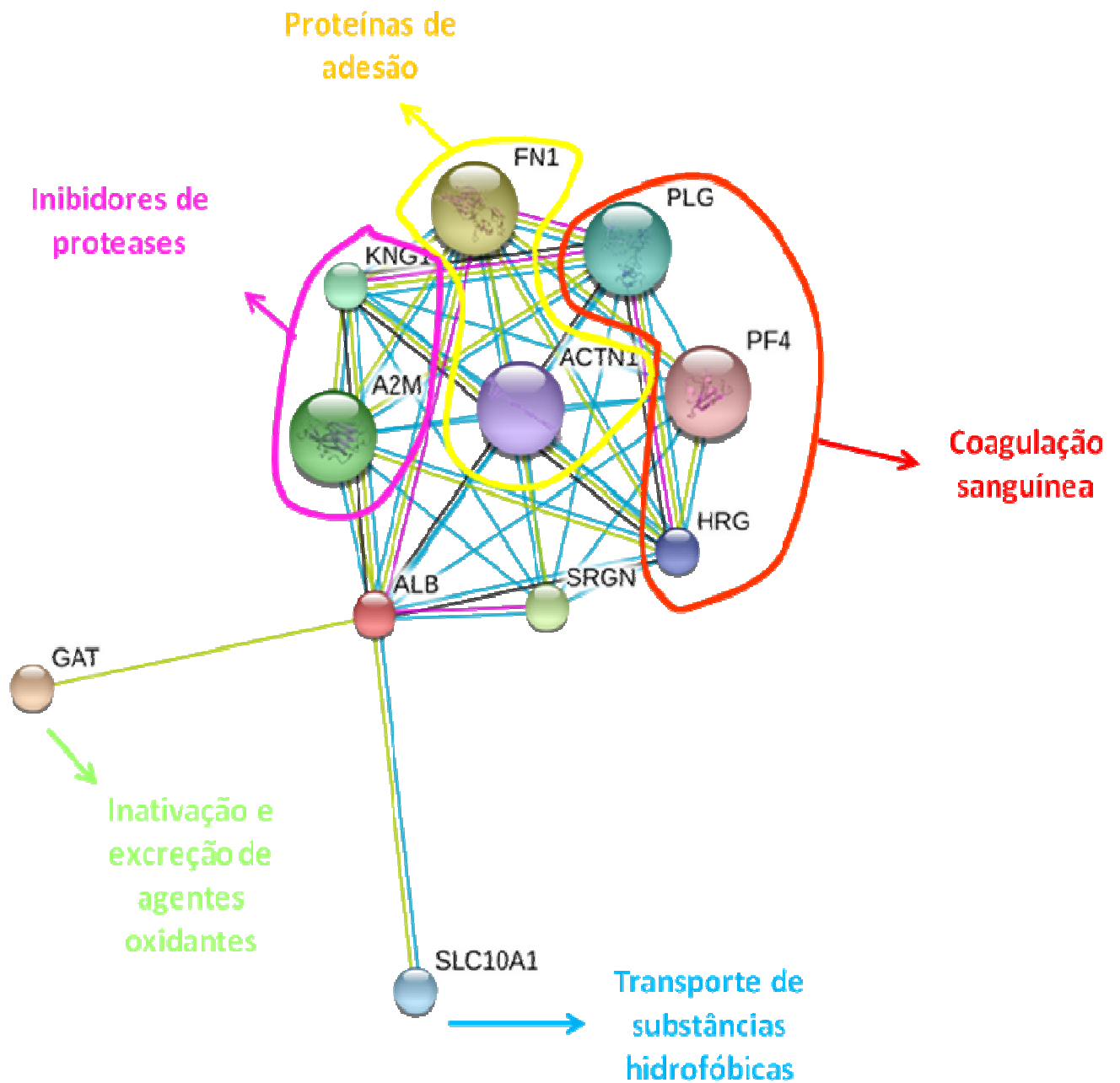


DIA 29

Figura 10: Gráficos que mostram as categorias de ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos à insulação escrotal, com base nos seus processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares.

As análises de interação interprotéica mostram que a rede de interações da albumina se dá principalmente por ligação com proteínas envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo proteínas de ligação (fibronectina), estruturais (α -actinina), proteases (serglicina, precursor de plasminogênio) e seus inibidores (α -2-macroglobulina, precursor de cininogênio), proteínas transportadoras (SLC10A1) e citocinas (fator 4 derivado de plaquetas).

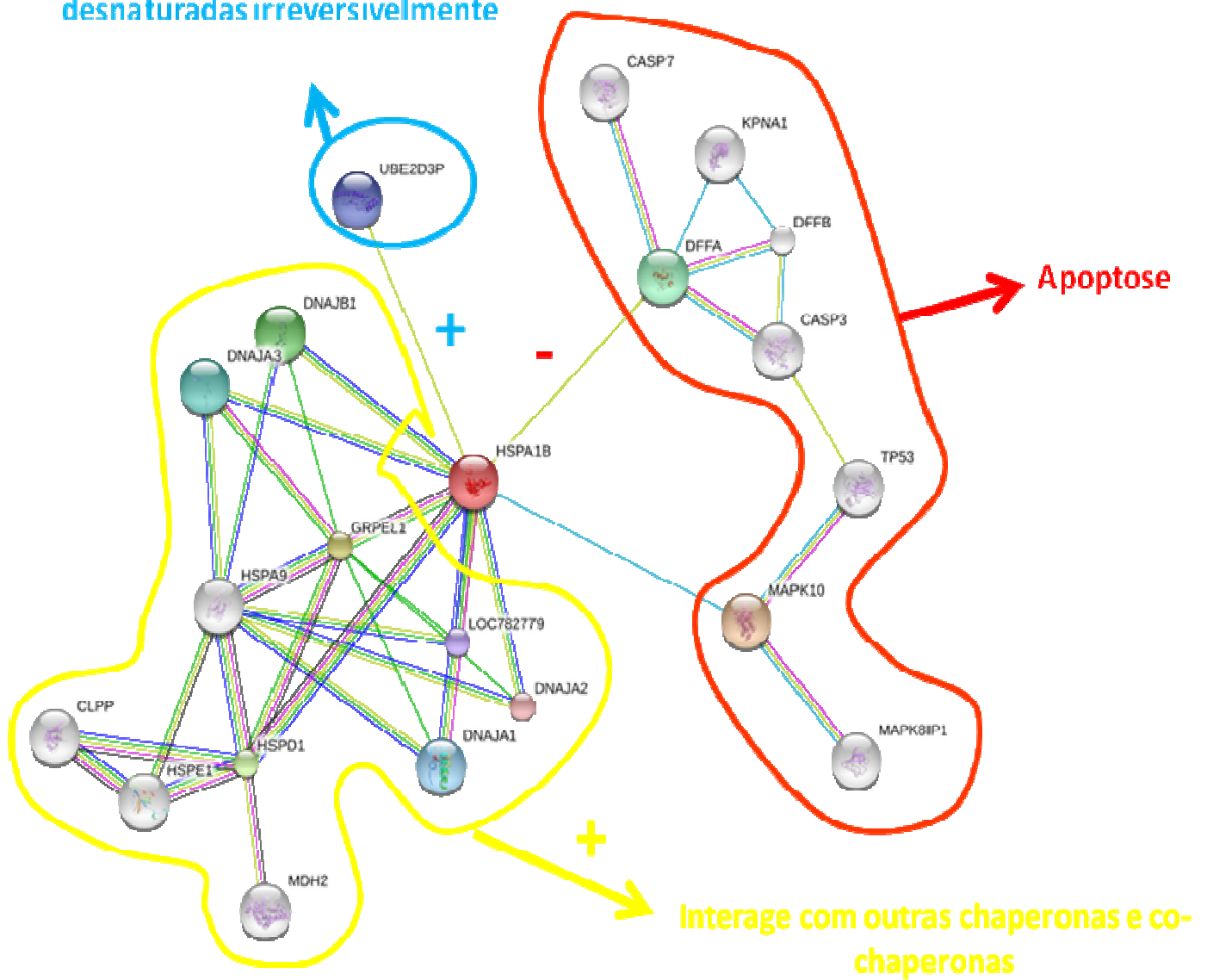
ALBUMINA



A

HSP 70

Degradação de proteínas
desnaturadas irreversivelmente



B

PROTEÍNA DJ-1

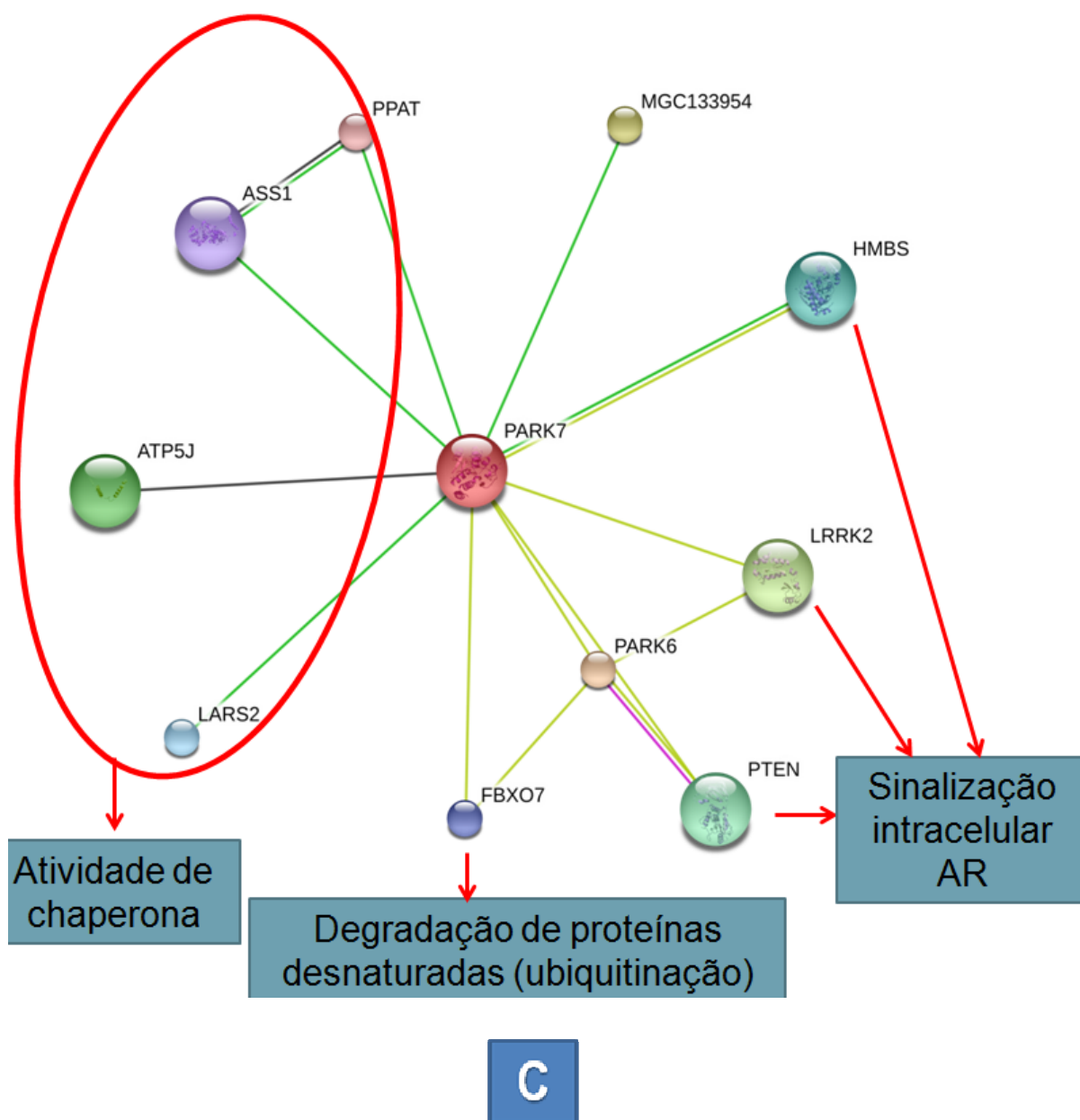


Figura 11: Redes de interação interprotéica das proteínas albumina (A), heat shock protein 70 kDa (B) e proteína DJ-1 (C) obtidas com base no banco de dados STRING (v. 9.0) mostrando as interações no modo evidência.

A HSP70 interage principalmente com três grupos funcionais distintos de proteínas, incluindo outras chaperonas e co-chaperonas (HSPA9, DNAJA1, DNAJA2, DNAJA3, DNAJB1, entre outras), proteína de inibição da via apoptótica (DFFA) e da via de ubiquitinação (UBE2D3P). A proteína DJ-1, por outro lado, interage com proteínas associadas a vias de sinalização associadas ao receptor de andrógenos, incluindo quinases (PARK6 e LRRK2) e fosfatases (PTEN e PPAT), além de proteínas da via de ubiquitinação (FBXO7) e metilação (MGC133954).

6. DISCUSSÃO

6.1. Temperaturas retal e testicular

A temperatura retal diminuiu quatro dias após o início da insulação escrotal, contudo, mesmo com esta redução, os valores observados estão dentro dos limites fisiológicos para a espécie ovina. As medidas retornaram ao equivalente na pré-insulação já aos 8 dias, mantendo-se assim durante todo o experimento. Embora este evento não fosse esperado, pode ser o reflexo de uma adaptação temporária dos animais a um insulto térmico agudo nas gônadas. A temperatura superficial do testículo aumentou drasticamente, quatro e oito dias após a insulação escrotal, com um gradual retorno aos valores pré-insulação sete dias após a remoção da bolsa de insulação, similar a estudos prévios (ROSS e ENTWISTLE, 1979; WILDEUS e ENTWISTLE, 1983; VOGLER *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 2001; COELHO *et al.*, 2006). Assim, parece claro que o efeito da insulação nas temperaturas retal e testicular foi transitória e

restrita aos dias de tratamento, sem sinais de quaisquer consequências posteriores sobre essas variáveis para além desse período.

6.2. Medidas biométricas e consistência testicular

A circunferência escrotal (CE) aumentou quatro dias após o início da insulação, mas foi consistentemente reduzida posteriormente, atingindo o menor valor no dia 36. Após este período, o aumento da CE foi retomado e atingiu valor pré-insulação no dia 71. Tendência semelhante foi observada para o diâmetro, volume e o comprimento testicular. Tais resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados com outras raças de carneiros (SANTOS e SIMPLÍCIO, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001). O aumento no tamanho do testículo nos primeiros quatro dias de insulação escrotal pode ser o resultado do acúmulo de líquido e, de fato, foi detectado redução de 37,5% na consistência testicular coincidentemente nessa fase particular, sendo também uma indicação de perda celular na gônada. Outra hipótese indica que o estresse térmico provocou dilatação temporária dos vasos sanguíneos, como tentativa de dissipar o excesso de calor gerado enquanto a bolsa estava no testículo. Nesse caso, ocorre inicialmente vasodilatação local, acompanhada por aumento da permeabilidade vascular, induzidas por substâncias pró-inflamatórias liberadas em resposta ao insulto térmico. Em consequência, ocorre acúmulo de fluidos na região intersticial, resultando em aumento de volume e redução na consistência testicular na fase mais aguda. O aumento transitório no tamanho do testículo causado pela insulação escrotal tem sido descrito anteriormente em touros (MATTHEW *et al.*, 1975).

Ambos, tamanho e consistência testicular retornaram aos valores normais no dia 71, (63 dias após o fim da insulação). A duração da espermatogênese na espécie ovina varia de 42 a 53 dias (COUROT *et al.*, 1970) e trânsito epidídimo dura de 13 a 15 dias (SWIERSTRA, 1968). Assim, o intervalo entre a insulação e o retorno do tamanho testicular aos valores normais coincide com o tempo total da espermatogênese e trânsito epididimário. Daí sugere-se que reduções pronunciadas no tamanho e consistência testicular após a insulação escrotal de carneiros Morada Nova estão associadas com a degeneração testicular. De fato, estudos anteriores realizados em mamíferos mostram que o estresse térmico gonadal causa redução na proporção volumétrica do epitélio seminífero e número de espermatócitos e espermatídes, afetando particularmente as fases meióticas e espermiogênicas da espermatogênese (MALMGREN e LARSSON, 1989; ROCKETT *et al.*, 2001; DEVKOTA *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2011). Tal perda celular no epitélio seminífero devido ao estresse térmico ocorre por apoptose (SHIKONE *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2012) e provocadas por estresse oxidativo (IKEDA *et al.*, 1999). Além disso, células em degeneração caracterizam-se pela presença de vacúolos e núcleos picnóticos, associados a irreversível condensação da cromatina (DEVKOTA *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2012). A consistência testicular está relacionada à capacidade de produção de espermatozoide e parâmetros quantitativos da espermatogênese (MARAI *et al.*, 2006). De fato, touros com baixa consistência testicular, mostram reduzida qualidade seminal e degeneração do epitélio seminífero (MULLER *et al.*, 1992; CHACÓN *et al.*, 1999; CHACÓN *et al.*, 2002). De acordo com estes estudos, a diminuição da consistência testicular observada em carneiros Morada Nova foi coincidente com drásticas reduções na motilidade espermática, concentração e a percentagem de células morfológicamente normais.

6.3. Parâmetros seminais

Aumentos na temperatura testicular causada pela insulação escrotal foram prejudiciais à qualidade do sêmen, como relatado em outros tipos de ruminantes (KASTELIC *et al.*, 1996; BRITO *et al.*, 2003; ARTEAGA *et al.*, 2005; ARMAN *et al.*, 2006; PEZZINI *et al.*, 2006; NEWTON *et al.*, 2009). Parâmetros como a motilidade massal, percentual de espermatozoides móveis e vigor foram reduzidos logo aos quatro dias após a aplicação da bolsa de insulação e, no dia 15 (sete dias após a retirada da bolsa), células móveis tornaram-se ausentes no ejaculado. O número de espermatozoides morfológicamente normais também foi rapidamente afetado pelo tratamento, e gotas citoplasmáticas, células decapitadas e cauda enrolada tornaram-se as alterações mais comuns, como também descritas por SETCHELL (1978) e BARTH e BOWMAN (1994). Resultados semelhantes foram descritos em carneiros Santa Inês (MOREIRA *et al.*, 2001) e *Bos indicus* e touros mestiços (BRITO *et al.*, 2003), onde espermatozoides decapitados e células com defeitos de cauda foram as primeiras anormalidades a serem encontradas após a insulação escrotal.

Considerando 13-15 dias, como a duração do trânsito epididimário em carneiros (SWIERSTRA, 1968), torna-se evidente em nosso estudo que a maioria dos espermatozoides coletados entre os dias 4 e 22 já estavam no epidídimo quando o testículo foi insulado, sugerindo que inicialmente as alterações nos parâmetros seminais foram causadas por interrupções na maturação dos espermatozoides e na função do epididimária. De fato, a insulação dos testículos de touro reduz as reservas de espermatozoides do epidídimo (WILDEUS e ENTWISTLE, 1983), induz a absorção de células morfológicamente anormais (RAO *et al.*, 1980) e afetam a viabilidade dos

espermatozoides da cauda do epidídimo (BARTH e OKO, 1989; VOGLER *et al.*, 1993; KASTELIC *et al.*, 1996).

O estresse térmico direcionado para o epidídimo altera as concentrações de oxigênio, água e transporte de íons, síntese proteica e secreção (SEILER *et al.*, 2000), bem como a expressão gênica (LI *et al.*, 2008). Dessa forma, esses eventos resultam em estresse oxidativo (BANKS *et al.*, 2005), causando danos para ambos, metabolismo mitocondrial (SIKKA *et al.*, 1995) e membrana de espermática (WECHALEKAR *et al.*, 2010). Como consequência final, há uma redução no número de espermatozoides móveis e normais no ejaculado, como pode ser observado no presente estudo. Após o dia 29, o ejaculado tornou-se azoospérmico e foram mantidos como tal por 42 dias (até o dia 71). No dia 29, as células que formam o esperma, seriam da espermiogênese, enquanto, que no dia 71, as células que seriam do início da meiose (ORTAVANT *et al.*, 1977). Assim, parece que as células testiculares mostram distintas sensibilidades ao estresse térmico, sendo as fases da meiose e diferenciação das espermátides como a mais vulnerável, como relatadas anteriormente para outras espécies (YIN *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2011).

Em contraste com a rápida diminuição após insulação escrotal, o retorno aos valores pré-insulação de motilidade espermática foi lenta e gradual. O parâmetro de motilidade massal retornou ao normal 84 dias após o fim da insulação, seguido pela morfologia espermática (98 dias), percentagem de células móveis e vigor espermático (105 dias). Assim, é evidente que mesmo após a temperatura testicular ter retornado ao normal logo após a remoção da bolsa, além da CE e concentração espermática 63 e 84 dias, respectivamente, as gônadas e epidídimos parecem reter os danos por períodos mais longos, devido ao fato de que a plena motilidade das células levou mais

tempo para se recuperar. De fato, foi observado o mesmo efeito da insulação escrotal em outro estudo anterior realizado com carneiros (MOREIRA *et al.*, 2001), quando a motilidade espermática demorou mais do que o concentração espermática para voltar ao normal.

6.4. Proteínas do plasma seminal

O número de spots por gel 2-D, das proteínas do plasma seminal foi reduzido após insulação escrotal, atingindo um nadir no dia 29. Esta mudança foi coincidente com o decréscimo na qualidade do sêmen e azoospermia. Em seguida, a quantidade de spots/gel começou uma recuperação progressiva, atingindo valores pré-insulação por volta do dia 113, também coincidente com a recuperação de vários parâmetros espermáticos, além da biometria testicular. Relatos anteriores mostraram que a injúria térmica afeta proteínas específicas de espermatozoides de touros *Bos taurus* (NEWTON *et al.*, 2009) e o proteoma do testículo humano (ZHU *et al.*, 2010), e o presente estudo revela que o número de proteínas normalmente encontradas no sêmen foi drasticamente alterado. Apesar das proteínas encontradas no plasma seminal originarem-se, principalmente, dos fluidos da cauda do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias, algumas delas também podem aparecer como resultado de clivagem de proteínas presentes na membrana espermática, produto da ação de proteases contidas nos referidos fluidos (THIMON *et al.*, 2005; SULLIVAN *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012).

Assim, a diminuição do número de spots como função da insulação escrotal certamente reflete uma alteração na capacidade que secretora do epidídimo. Na

verdade, a hipertermia altera padrões de expressão gênica do epidídimo e síntese de proteínas (SEILER *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2008). Dado que as proteínas do plasma seminal também vêm de glândulas sexuais acessórias, os efeitos da insulação escrotal em tais componentes devem ser indiretos. Estudos confirmam que a insulação escrotal afeta secreção de testosterona pelas células de Leydig em ovinos (BYERS, 1984; BYERS e GLOVER, 1984). Assim, uma vez que muitas proteínas do epidídimo (BROOKS, 1976; LI *et al.*, 2008; ROBAIRE e HAMZEH, 2011) e glândula sexuais acessórias (NASS *et al.*, 1990) estão sob controle de andrógenos, alterações na concentração plasmática de testosterona foi certamente uma das razões para a diminuição de proteínas no plasma seminal de origem da glândula sexual acessória.

No presente trabalho, foram encontrados vários spots protéicos com intensidades diferenciais como resultado da insulação escrotal, enquanto que outros spots desapareceram temporariamente dos mapas protéicos. Estas proteínas estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos, tais como proteção do espermatozoide, maturação, capacitação e interação com o oviduto. Assim, pode-se discutí-las por funções e suas associações com os processos biológicos.

6.4.1. Proteínas envolvidas na proteção espermática

Os espermatozoides lidam com fontes potenciais de danos em seu caminho até chegar ao oócito, como estresse oxidativo, contato com microorganismos e o sistema imunológico da fêmea. Assim, o plasma seminal contém várias proteínas que desempenham um papel na proteção de espermatozoide, assegurando que uma quantidade mínima de células viáveis alcance o oviduto. Algumas destas proteínas

foram afetadas pela insulação escrotal. O metabolismo espermático gera espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAKER e AITKEN, 2005; KOTHARI *et al.*, 2010) mas o excesso de ROS afeta negativamente a função celular (AITKEN e CLARKSON, 1987). Entre as proteínas antioxidantes afetadas pela insulação escrotal, foram encontradas a peroxiredoxina 5, SOD, albumina e transferrina. A SOD catalisa a conversão de íons superóxido em peróxido de hidrogênio (KOWALOWKA *et al.*, 2008) e a peroxiredoxina, por sua vez, é tioredoxina peroxidase dependente, que neutralizam o H₂O₂ (MATOS *et al.*, 2009). Juntamente com a SOD (ZINI *et al.*, 2002; KANKOFER *et al.*, 2005; KOWALOWKA *et al.*, 2008) e outras enzimas, a peroxiredoxina 5 protege o espermatozoide contra a excessiva concentração de ROS durante o trânsito epididimário e armazenamento (PARK *et al.*, 2012).

Considerando que os espermatozoides têm uma capacidade limitada para lidar com ROS (VERNET *et al.*, 2004), eles dependem da atividade de proteínas antioxidantes presentes no plasma seminal para manter a sua viabilidade. A albumina é um dos principais componentes do plasma seminal de carneiros e vem do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias (DACHEUX *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012). Albumina liga-se a radicais livres, protegendo assim os espermatozoides contra a peroxidação lipídica (ARMSTRONG *et al.*, 1998; ROCHE *et al.*, 2008). Análise de interação mostra que a albumina possui parceiros de ligação envolvidos em diversas vias bioquímicas. Portanto, alterações na albumina induzidas pela insulação escrotal afetam potencialmente um grande número de processos fisiológicos. Transferrina é uma proteína ligadora de ferro, e é também um componente abundante do plasma seminal (ZALATA *et al.*, 1996) e pode agir para proteger o espermatozoide. Ferro livre gera radical de peróxido lipídico que causa dano oxidativo (AGARWAL e PRABAKARAN,

2005) e é essencial para o crescimento bacteriano (KOKHAN, 2010). Pela quelação de ferro livre, a transferrina impede o estresse oxidativo e o crescimento de microorganismos, ajudando a manter a viabilidade do espermatozoide.

Nesse estudo, houve um aumento na intensidade do spot de albumina durante e nas primeiras semanas após insulação escrotal, atingindo valores máximos no dia 29. Durante este período, sugere-se que o estresse oxidativo resultante tenha prejudicado função do espermatozoide (TURNER e LYSIAK, 2008). Assim, estes resultados são consistentes com um papel protetor da albumina no plasma seminal. Na fase pós-insulação a intensidade dos spots de albumina, diminuíram, retornando aos níveis de pré-insulação por volta do dia 113, quando a qualidade do sêmen voltou ao normal. Spots de transferrina, SOD e peroxiredoxina 5 desapareceram dos géis durante a insulação permanecendo indetectáveis até o dia 113 (SOD e PRX5) ou dia 134 (transferrina). Durante esse intervalo (entre a insulação e o retorno dos critérios seminais ao normal), é provável que o estresse oxidativo tenha sido elevado, resultando em danos ao DNA e apoptose, afetando adversamente o espermatozoide e tecidos reprodutivos (IKEDA *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2012). Somente a albumina aumentou sua intensidade durante esse período, provavelmente como uma maneira de atenuar os efeitos negativos das espécies reativas de oxigênio.

Particularmente durante a insulação e as primeiras quatro semanas pós-insulação, uma combinação do aumento da produção de ROS e de defesas antioxidantes limitadas, resultou no comprometimento da qualidade do sêmen, até que o ejaculado tornou-se azoospérmico. Embora a maioria destas proteínas não pudesse ser detectada mesmo quando o espermatozoide estavam presentes nos ejaculados, é possível que outras defesas antioxidantes, como catalase (FOOTE, 1962)

e glutathione peroxidase (VERNET *et al.*, 1999; DREVET, 2006) estivessem ativas, garantindo assim a sobrevivência do espermatozoide. “Palate, lung and nasal epithelium clone” (PLUNC) é outra proteína com propriedades antibacterianas pertencentes à família de proteínas do BPI (“bactericidal/permeability-increasing”) (BINGLE e CRAVEN, 2002). Proteínas BPI foram identificadas anteriormente no plasma seminal de carneiros (SOUZA *et al.*, 2012) e juntamente com outras defensinas representam uma barreira contra a infecção. No presente estudo, PLUNC foi completamente ausente do plasma seminal durante a insulação (dias 4 e 8) e somente detectada novamente pelo dia 71, precedendo imediatamente o retorno gradual e normal da motilidade e concentração espermática.

Chaperonas no plasma seminal, tais como proteínas de choque térmico 70 kDa (HSP70) e 90 kDa (HSP90), clusterina, chaperoninas contendo complexo- T e proteína DJ-1 foram afetadas pela insulação dos testículos de carneiros Morada Nova. Estas proteínas são secretadas em resposta a danos celulares e protegem células, ligando-se a proteínas desnaturadas e recuperando seu dobramento, ou auxiliando na degradação daquelas proteínas desnaturadas irreversivelmente (GEORGOPOULOS e WELSH, 1993). Esses componentes também modulam reações imunes (BAILEY e GRISWOLD, 1999) e inibem a atividade de proteínas pró-apoptóticas (BEERE, 2004). O gráfico de interações protéicas para a PDJ-1 mostra que esta proteína interage com proteínas associadas a vias de sinalização associadas ao receptor de andrógenos, além de proteínas da via de ubiquitinação. Esses achados são compatíveis com sua atividade chaperônica, e sugerem que o aumento em sua expressão pode estar relacionado a flutuações na concentração de andrógenos, bem como com a eliminação de proteínas danificadas pelo insulto térmico.

Proteínas de choque térmico são secretadas em resposta ao estresse, tais como o calor e o estresse oxidativo (GARRIDO *et al.*, 2006; GOLLI-BENNOUR e BACHA, 2011) e, em condições normais, os membros da família HSP70 desempenham um papel crucial na espermatogênese (FOUCAULT, 1999; DUN *et al.*, 2012). No presente estudo, a intensidade do spot de HSP70 aumentou durante a insulação e início da pós-insulação (29 dias), diminuindo posteriormente. De acordo com estudos anteriores, pode-se observar que o estresse térmico local induz a expressão de HSP70 no testículo e epidídimo (LÉGARÉ *et al.*, 2004; PEI *et al.*, 2011). Neste estudo, o aumento de HSP70 provavelmente ocorreu como uma tentativa de proteger os tecidos reprodutivos contra os efeitos da acumulação de proteínas desnaturadas, e para prevenir as células germinativas da apoptose (SHIKONE *et al.*, 1994; BEERE, 2004). Essa hipótese é reforçada pelos resultados de análises preditivas de interações interprotéicas, mostrando que a HSP70 interage principalmente com chaperonas e co-chaperonas, proteínas anti-apoptóticas e aquelas associadas a degradação de proteínas desnaturadas por ubiquitinação.

HSP90, por sua vez, diminuiu em resposta a insulação escrotal, com a menor intensidade coincidindo com os períodos de menor qualidade do sêmen em carneiros. HUANG *et al.* (1999) mostrou que HSP90 regula a motilidade do espermatozoide e que a expressão reduzida de HSP90 está associada com baixo número de espermatozoides móveis em resposta ao choque pelo frio. No entanto, a razão pela qual a intensidade da HSP90 diminuiu no plasma seminal é atualmente desconhecida. HSP90 não é um membro típico de HSP, dado que esta proteína já é abundante em condições normais, funcionando na maior parte das vezes regulando o dobramento tridimensional das proteínas, após a transdução no retículo endoplasmático (PICARD, 2002). Uma possível

explicação para a variação de HSP90 em função da insulação é que a proteína pode ter diminuído em consequência de dano celular. Alternativamente, *spots* de HSP90 também continham MMP2. A julgar pelo índice de abundância de proteína exponencialmente modificado (emPAI) encontrado nos resultados de pesquisa do mascote, HSP90 foi um componente menor de ambos os *spots*. Portanto, a diminuição de dois *spots* também poderia estar relacionada à variações na abundância de MMP2, ao invés de HSP90.

Clusterina é uma proteína da família das chaperonas, secretada pelas células de Sertoli (LAW e GRISWOLD, 1994), epidídimo (HUMPHREYS *et al.*, 1999; MOURA *et al.*, 2010b) e glândulas sexuais acessórias (MOURA *et al.*, 2007b; SOUZA *et al.*, 2012). Esta proteína está envolvida na modulação da lise celular induzida pelo sistema complemento e reabsorção de espermatozoide defeituoso (BAILEY e GRISWOLD, 1999; MERI e JARVA, 2001). Em estudos anteriores, a insulação escrotal de carneiros resultou em um aumento na ligação de clusterina com o espermatozoide, seguido de um número elevado de células morfologicamente anormais, com uma consequente queda na qualidade do sêmen e fertilidade (IBRAHIM *et al.*, 2001). Neste caso, clusterina é provavelmente secretada para acelerar a remoção de espermatozoides anormais e mortos (BAILEY *et al.*, 2002). Neste estudo, o número de *spots* de clusterina inicialmente foi diminuído em função da insulação escrotal. Esse declínio ocorreu quase em paralelo com a diminuição da percentagem de espermatozoides normais após insulação e pode ser uma consequência de uma maior ligação da clusterina a espermatozoides defeituosos, como mostrado por IBRAHIM *et al.* (2001). Além disso, a redução do número de *spots* de clusterina pode ter ocorrido também como um efeito direto da injúria térmica ao testículo e a capacidade secretora do epidídimo. O fato da

clusterina não ter desaparecido do plasma seminal após a insulação é intrigante. A clusterina aparece no plasma seminal de carneiros, touros (e fluidos epididimário e das glândulas sexuais acessórias) (MOURA *et al.*, 2007b; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012) e porcos selvagens (resultados não publicados) como múltiplas isoformas. É possível, portanto, que a expressão das isoformas são diferentemente controladas por hormônios e fatores externos. A clusterina nas glândulas sexuais acessórias é aumentada em touros de alta fertilidade (MOURA *et al.*, 2006b) e está ausente no sêmen de homens inférteis (THACKER *et al.*, 2011), sugerindo que esta proteína é crucial para a boa fertilidade. Na verdade, por volta do dia 71, como a quantidade de espermatozoide defeituoso começou a diminuir, o número de spots de clusterina no plasma seminal iniciou o aumento e por volta do dia 113, quando a qualidade do sêmen voltou ao normal, a maioria dos spots de clusterina já estavam presentes nos mapas bidimensionais do plasma seminal.

A proteína DJ-1 (PDJ-1) é outro componente com atividade de chaperona encontrado nas células de Sertoli, Leydig, células germinativas, epidídimo, espermatozoide e próstata (UTLEG *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003). A PDJ-1 é induzida por estresse oxidativo e tem atividades anti-apoptóticas e antioxidantes, particularmente em resposta ao peróxido de hidrogênio (TAIRA *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2005). Embora a PDJ-1 tenha sido anteriormente detectada no plasma seminal humano e do espermatozoide (YOSHIDA *et al.*, 2003), este é o primeiro relato de sua presença no plasma seminal de ruminantes. O spot da PDJ-1 mostrou um padrão de variação similar ao da HSP70, aumentando durante a insulação e, em seguida, lentamente diminuindo após 29 dias, até atingir valores de pré-insulação no dia 134.

Provavelmente, estas chaperonas atuam em conjunto para proteger as células contra insultos térmicos e oxidativos.

A proteína C reativa (PCR) é liberada em resposta a danos celulares (SULICKA *et al.*, 2012), mostrando o aumento das suas concentrações durante condições inflamatórias (BLACK *et al.*, 2004). No trato reprodutivo, PCR aumenta durante a orquite e epididimite (TROJIAN *et al.*, 2009) e media a apoptose através de estresse oxidativo (FUJII *et al.*, 2006). No presente estudo, a intensidade do spot da PCR aumentou como resultado da insulação escrotal, atingindo sua maior expressão entre os dias 8 e 29, quando a circunferência e consistência testicular foram reduzidas e os ejaculados foram severamente comprometidos ou azoospérmicos. A expressão de PCR retornou aos valores pré-insulação no dia 113. Estes achados são consistentes com resultados anteriores de degeneração e morte celular por apoptose mediada pelo estresse oxidativo, como resultado da insulação escrotal (SIDIBÉ *et al.*, 1992), sugerindo que essa proteína C reativa pode desempenhar um papel nos processos de danos celulares.

6.4.2. Proteínas envolvidas na maturação espermática

A maturação do espermatozoide refere-se à reestruturação da membrana e mudanças na atividade metabólica (BAKER *et al.*, 2005; DACHEUX *et al.*, 2005; COOPER e YEUNG, 2006) e resulta na aquisição de motilidade espermática e habilidade fertilizante (SOSTARIC *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2011; CABALLERO *et al.*, 2011).

Nesse estudo, dois grandes grupos de proteínas afetadas pela insulação escrotal têm, supostamente, funções na maturação do espermatozoide: as proteases e seus

inibidores e as glicosidasas. Entre as proteases e inibidores de protease afetadas pela insulação, foram identificadas a enzima conversora de angiotensina (ACE), matriz metaloproteinase 2 (MMP2), dipeptidil peptidase 3 (DPP3), catepsina F, tecido inibidor de metaloproteinase 2 (TIMP-2), alfa-2-macroglobulina e cistatina. A ACE presente no plasma seminal, resulta do sua liberação a partir da membrana espermática, por clivagem, durante o trânsito epididimário (MÉTAYER *et al.*, 2002b) e está envolvida na translocação da membrana do espermatozoide (YAMAGUCHI *et al.* 2006) e redução da motilidade espermática durante o armazenamento (KOHN *et al.*, 1998; SHUM *et al.*, 2011). ACE certamente desempenha um papel importante na fecundação (KONDOH *et al.*, 2005), porque sua inativação resulta em infertilidade (KREGGE *et al.*, 1995; HAGAMAN *et al.*, 1998). As metaloproteinases do plasma seminal (MMP2 e DPP3) e proteinases cisteínicas (catepsinas) originam-se principalmente do epidídimo (AGRAWAL e VANHA-PERTULLA, 1986; IGDOURA *et al.*, 1995; FOUCHÉCOURT *et al.*, 2000; MÉTAYER *et al.*, 2002a; MOURA *et al.*, 2010b) e, semelhante a ACE, estas proteínas afetam a função espermática, agindo sobre a remodelação membrana durante o trânsito epididimário (GATTI *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2006a). Todas as proteases foram diminuídas como consequência da insulação, desaparecendo do plasma seminal durante a insulação, com exceção da MMP2. Enquanto os spots de MMP2 não desapareceram completamente, a intensidade do spot foi significativamente reduzida até o final da insulação (dia 8), com uma redução até o dia 134. Outras proteases recuperaram-se lentamente, encontrando-se novamente no plasma seminal entre 113 e 134 dias.

A expressão de inibidores de protease TIMP-2, alfa-2-macroglobulina e cistatina B foram também alteradas como resultado da insulação escrotal. TIMP-2 é um potente

inibidor de MMP2 e tem sido descrita previamente como um componente do plasma seminal de carneiros (SOUZA *et al.*, 2012). Sua presença na membrana espermática se correlaciona com a fertilidade em touros (BELLIN *et al.*, 1996). Cistatinas são inibidores de proteases cisteínicas (TURK e BODE, 1991) secretadas pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias (LI *et al.*, 2005; DACHEUX *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2010b; CARLSSON *et al.*, 2011). Alfa-2-macroglobulina, por sua vez, é um inibidor de protease de ampla gama, interagindo tanto com catepsinas e metaloproteinases (PELOILLE *et al.*, 1997), e sua concentração no plasma seminal está relacionada com a qualidade do sêmen (GLANDER *et al.*, 1996). Estes inibidores de protease presentes no plasma seminal modulam as proteases para impedir a atividade excessiva e clivagens indesejáveis, potencialmente prejudiciais ao espermatozoide. A expressão de inibidores de proteases foi diminuída pela insulação e sua recuperação, entretanto, difere consideravelmente. Enquanto a cistatina B retornou mais precocemente (15 dias), a alfa-2-macroglobulina levou 50 dias e TIMP-2 134 dias, tempo necessário para serem detectadas no plasma seminal após o estresse térmico. Considerando que enzimas e inibidores vêm principalmente do epidídimo (MÉTAYER *et al.*, 2002a;b), mudanças na sua expressão resulta provavelmente de alterações na função do epidídimo induzida pela insulação.

As glicosidases epididimárias estão envolvidas na maturação do espermatozoide (DACHEUX e VOGLMAYR, 1983) e modificam resíduos glicanos de glicoproteínas presentes na membrana do espermatozoide (TULSIANI *et al.*, 1995). No entanto, vários estudos relatam que estas proteínas ligam-se ao espermatozoide, atuando como sítios de ligação para resíduos de carboidratos da zona pelúcida, como os casos de β -galactosidase e N-acetylglucosaminidase (MIRANDA *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*,

2000; TULSIANI e ABOU-HAILA, 2011). Alfa fucosidase liga-se à membrana do espermatozoide (AVILÉS *et al.*, 1996; VENDITTI e BEAN, 2009) e a intensidade do spot no fluido da cauda do epidídimo correlaciona-se a fertilidade do touro (MOURA *et al.*, 2006a), provavelmente por um mecanismo semelhante de outras glicosidases.

A insulação escrotal afetou a expressão de beta galactosidase e alfa fucosidase, causando o desaparecimento desses spots nos mapas 2-D do plasma seminal no dia oito de insulação e durante a maior parte do período pós-insulação (dias 15 a 85), sendo detectado novamente somente no dia 113. Esta fase foi marcada por ejaculados com reduzida qualidade ou azoospermicos. A secreção alterada dessas proteínas tem sido sugerido como uma baixa capacidade de fertilização dos espermatozoides de touros de *Bos indicus* submetidos a insulação escrotal (FERNANDES *et al.*, 2008).

A acidificação do lúmen epididimário ajuda a manter o espermatozoide em um estado quiescente (ACOTT e CARR, 1984). Esta acidificação é promovida por uma H-ATPase de membrana das células do epidídimo (BRETON *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1997), um processo controlado por andrógenos (DA SILVA *et al.*, 2007; SHUM *et al.*, 2011). Falhas em promover a diminuição do pH do epidídimo adequadamente, resulta em alterações na funcionalidade do espermatozoide e reduz a fertilidade (PASTOR SOLER *et al.*, 2005; JOSEPH *et al.*, 2010). Nos carneiros Morada Nova, usados no experimento, a intensidade do spot da "V-type H⁺-ATPase" nos géis de plasma seminal foi máxima entre os dias 8 e 29, coincidentes com períodos de baixa qualidade seminal. A intensidade do spot foi então reduzida nos dias 113 e 134, quando a qualidade do sêmen voltou ao normal. Assim, a expressão alterada da "V-type H⁺-ATPase" foi associada com a baixa qualidade seminal e essas mudanças provavelmente

refletem o dano às células epididimárias. Isso constitui outro mecanismo potencial pelo qual o calor afeta negativamente a reprodução masculina.

6.4.3. Proteínas envolvidas na capacitação espermática e ligação ao oviduto

Componentes do plasma seminal diferencialmente expressos como resultado da insulação escrotal também foram identificados como bodesina 2, PSP-I e PSP-II, ambos pertencentes à família das espermadesinas. As espermadesinas estão entre as proteínas mais abundantes do plasma seminal em diversas espécies, tais como suínos (CABALLERO *et al.*, 2008), garanhões (CALVETE *et al.*, 1995) e carneiros (BERGERON *et al.*, 2005) e os domínios destas proteínas interagem com os lipídios, carboidratos e resíduos glicanos da zona pelúcida (SANZ *et al.*, 1992; BORK e BECKMANN, 1993).

As espermadesinas originam-se principalmet *alente* das glândulas sexuais acessórias (MOURA *et al.*, 2007b; GARCÍA *et al.*, 2008) e ligam-se ao espermatozoide durante a ejaculação (CABALLERO *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2012). Estão implicadas na capacitação do espermatozoide, ligação deste ao oviduto e na interação espermatozoide-oócito (TOPFER-PETERSEN *et al.*, 1998; TOPFER-PETERSEN, 1999; CABALLERO *et al.*, 2005; TALEVI e GUALTIERI, 2010), como já discutido anteriormente (SOUZA *et al.*, 2012). O complexo PSP-I/PSP-II é o mais abundante do plasma seminal de suínos (CALVETE *et al.*, 1995b) e tem um efeito protetor sobre a viabilidade espermática (CENTURION *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2006), associado com suas propriedades descapacitantes (CABALLERO *et al.*, 2009) e imunomodulatórias (ASSREUY *et al.*, 2003). Spots relacionados às PSPs, aumentaram durante a insulação e o início da pós-insulação (entre os dias 4 e 29), reduzindo a sua intensidade

posteriormente e retornando aos valores pré-insulação no dia 113. A Bodesina-2 seguiu a mesma tendência, mostrando redução da intensidade nos dias 113 e 134, em comparação aos da insulação/pós-insulação (até 29 dias). Embora abundante em suínos, este é o primeiro relato de uma espermadesina (PSP) no plasma seminal de carneiros.

As RSVPs representam outro grupo de proteínas afetadas pela insulação escrotal em carneiros Morada Nova. RSVPs são as mais abundantes proteínas do plasma seminal de carneiros (SOUZA *et al.*, 2012), representada por duas proteínas de 14 kDa (RSVP14) e 22 kDa (RSVP22). No plasma seminal, RSVP14 caracteriza-se por dois grandes spots ácidos em torno de 12-14 kDa. Estes dois spots nunca estiveram ausentes nos géis do plasma seminal, mas suas intensidades diminuíram em função da insulação, com a menor intensidade vista no dia 50. Posteriormente, as intensidades desses spots aumentaram lentamente até próximo do dia 134, quando se tornaram similares aos valores de pré-insulação. RSVP22 caracteriza-se por um padrão altamente polimórfico, consistindo de mais de 15 diferentes spots com variáveis pesos moleculares e pontos isoeletricos. Diversos spots da RSVP22 desapareceram completamente dos géis 2-D do plasma seminal entre o período de insulação (dias 4 e 8) até o final da pós-insulação (dia 113). Outros spots da RSVP22 mantiveram-se presente durante todo o experimento, mas suas intensidades mudaram drasticamente entre os diferentes períodos. O número de spots de RSVP22 na região ácida do gel diminuiu com a insulação, atingindo o menor valor no dia 29. A quantidade de spots, em seguida, começou a aumentar e, no dia 134, o valor foi novamente equivalente aos valores pré-insulação. As RSVPs pertencem à família de proteínas “Binder of Sperm” (BSP) (MANJUNATH *et al.*, 2009) e, semelhante às espermadesinas, são produzidas

principalmente pelas glândulas vesiculares (MANJUNATH *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2012). As BSPs ligam-se aos espermatozoides bovinos (MANJUNATH *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011) e carneiros (SOUZA *et al.*, 2012) durante a ejaculação e estão principalmente envolvidas na capacitação de espermatozoides (THÉRIEN *et al.*, 1997; THÉRIEN *et al.*, 2001) e interação do espermatozoide-oviduto (GWATHMEY *et al.*, 2006). Sob certas condições, as BSPs formam oligômeros e atuam como chaperonas (SANKHALA e SWAMY, 2010; SANKHALA *et al.*, 2011), como reportado anteriormente (SOUZA *et al.*, 2012). Isso explica porque a expressão de algumas isoformas de RSVP22 permaneceram elevadas durante a insulação escrotal, provavelmente com o objetivo de proteger o espermatozoide contra os efeitos da injúria térmica. No entanto, mudanças na expressão de spermadesinas e BSPs causadas por insulação escrotal são intrigantes, uma vez que estas proteínas são oriundas principalmente das glândulas sexuais acessórias, que não estavam sob o efeito direto da insulação. Dado que a atividade dessas glândulas está sob controle de andrógeno (NASS *et al.*, 1990), é possível que a insulação tenha reduzido a secreção de testosterona pelas células de Leydig, desse modo, modificando o padrão normal de secreção de proteínas das glândulas sexuais acessórias.

6.4.4. Proteínas intracelulares

No presente trabalho, actina e integrina $\beta 5$ foram encontradas no plasma seminal de carneiros insulados, embora estas sejam típicos componentes celulares. Integrinas têm subunidades α e β , provenientes de dois diferentes genes (RUPP e LITTLE, 2001; STUPACK e CHERESH, 2002) e geralmente estão localizadas nas

membranas celulares, mediando à comunicação célula-célula e ativando vias de sinalização intracelular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999). No trato reprodutivo, as integrinas são encontradas na membrana plasmática das células de Sertoli e nas células germinativas e espermatozoides (FUSI *et al.*, 1996; SHINOHARA *et al.*, 1999). As integrinas espermáticas estão envolvidas na interação espermatozoide-óvulo (FÉNICHEL e DURAND-CLÉMENT, 1998; BARRAUD-LANGE *et al.*, 2007). Danos celulares produzidos por calor ou estresse oxidativo resulta em perda das integrinas da superfície da célula para o meio extracelular, o que desencadeia sinais pró-apoptóticos (GAILIT *et al.*, 1993; MAJDA *et al.*, 1994). Actina, por sua vez, é um componente do citoesqueleto, contudo, é comumente encontrada em fluidos do trato reprodutivo, tais como os fluidos de glândula vesicular e cauda do epidídimo (DACHEUX *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2010b; SOUZA *et al.*, 2012).

A intensidade do spot da integrina $\beta 5$ foi elevada durante a insulação escrotal, enquanto que a actina aumentou progressivamente até 29 dias. Após este período, a expressão de ambas as proteínas diminuíram, com uma concomitante melhora dos parâmetros seminais. Por volta do dia 113, quando a qualidade do sêmen retornou a normalidade, a intensidade dos spots de integrina e actina alcançaram os valores equivalentes à pré-insulação. Estes achados sugerem que o aparecimento destas duas proteínas no plasma seminal provavelmente foi resultado de danos celulares. Após a insulação escrotal, a redução da integrina e actina no plasma seminal foi provavelmente uma consequência da recuperação do tecido em ambos, testículos e epidídimo.

6.4.5. Novas proteínas encontradas no plasma seminal de carneiros

Proteínas do plasma seminal, identificadas como ZBTB42 e HRPE773, também foram afetadas pela insulação. Tais componentes nunca haviam sido antes reportados no plasma seminal. A intensidade do spot da ZBTB42 foi aumentada nos dias 8 e 29, coincidentes com as fases de baixa qualidade seminal. ZBTB42 desempenha um papel na transcrição gênica e alterações na sua expressão nas células de Sertoli, resulta na interrupção da espermatogênese (GIESE *et al.*, 2012). Esta proteína foi recentemente encontrada no fluido da cauda do epidídimo de carneiros (SOUZA *et al.*, 2012), e sua presença em quantidade detectável no plasma seminal de animais insulados, foi provavelmente causada por danos às células do epidídimo e testículos.

A HRPE773, por sua vez, aumentou progressivamente após o estresse térmico, atingindo um pico aos 29 dias e, em seguida, retornou aos níveis pré-insulação nos dias 113 e 134, em um padrão muito semelhante ao de outras proteínas protetoras, como HSP70 e PDJ-1, esta última, também identificada pela primeira vez no plasma seminal ovino no presente trabalho. Esta proteína regula interações célula-célula (KANAGAWA *et al.*, 2011) e tem propriedades antibacterianas, quando presente em fluidos biológicos (MULLINS *et al.*, 2007), e provavelmente é induzida em resposta a danos celulares, atuando em conjunto com outras moléculas para a proteção dos tecidos. MARTINS *et al.* (2013) demonstraram anteriormente que a HRPE773 presente no plasma seminal de carneiros Morada Nova, variedade vermelha, tem a capacidade de se ligar à heparina. No entanto, o presente trabalho é o pioneiro em identificar a HRPE773 no plasma seminal ovino sem o auxílio de técnicas artificiais de enriquecimento, como a cromatografia de afinidade utilizada pelos referidos autores.

7. CONCLUSÕES

A insulação das gônadas em carneiros durante oito dias produziu alterações pronunciadas sobre os parâmetros seminais, biometria testicular e proteoma do plasma seminal. Partindo destes achados, pode-se concluir que a maturação espermática e a espermatogênese foram alteradas. Estas mudanças, assim como para a biometria e as características seminais, em sua maior parte foram reversíveis, mas um longo tempo foi necessário para sua recuperação.

O retorno à normalidade dos parâmetros de biometria testicular e características seminais apresentou uma evolução semelhante. Entretanto, o perfil proteico (proteoma) não acompanhou a mesma evolução de retorno à normalidade, não apresentando exatamente, ao final, o mesmo padrão inicial. Isto significa que a recuperação ao nível molecular é mais lenta ainda, em relação aos aspectos macro e microscópicos da atividade testicular. As proteínas afetadas estão potencialmente envolvidas em diferentes eventos fisiológicos, incluindo proteção, maturação espermática e fertilização, o que pode representar um não retorno da plena capacidade fecundante do espermatozoide.

O presente estudo mostrou novos aspectos moleculares relacionados aos efeitos do estresse térmico testicular na função reprodutiva, uma vez que este trabalho mostrou proteínas identificadas pela primeira vez no plasma seminal ovino, contribuindo assim para um melhor conhecimento das respostas moleculares de carneiros ao estresse térmico testicular.

8. REFERÊNCIAS

ACOTT, T. S.; CARR, D. W. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. **Biology of Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 926-935, 1984.

ACOTT, T. S.; KATZ, D. F.; HOSKINS, D. D. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 389-399, 1983.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive biology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, n. 11, p. 963-974, 2005.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 1-12, 2002.

AGRAWAL, N.; VANHA-PERTULLA, T. Dipeptidyl peptidases in bovine reproductive organs and secretions. **International Journal of Andrology**, v. 9, n. 6, p. 435-452, 1986.

AHAMMAD, M. U.; NISHINO, C.; TATEMOTO, H. *et al.* Maturational changes in motility, acrosomal proteolytic activity, and penetrability of the inner perivitelline layer of fowl sperm, during their passage through the male genital tract. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1100-1109, 2011.

AHMAD, G. Température et spermatogenèse chez l'homme: conséquences potentielles d'une hyperthermie modérée des testicules et des épидидymes sur l'intégrité du génome des spermatozoides. 2011. 212 (Doctorat). **Biologie Santé Biotechnologies**, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse.

AHMAD, G.; MOINARD, N.; ESQUERRÉ-LAMARE, C. *et al.* Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 3, p. 546-553, 2012.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 66-69, 2006.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 459-469, 1987.

AITKEN, R. J.; RYAN, A. L.; BAKER, M. A. *et al.* Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.

AKTAS, C.; KANTER, M. A morphological study on Leydig cells of scrotal hyperthermia applied rats in short-term. **Journal of Molecular Histology**, v. 40, n. 1, p. 31-39, 2009.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 1129-1136, 1983.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L. *et al.* Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, v. 2, p. 37-58, 1981.

_____. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 89-98, 1989.

AMANN, R. P.; CRISTANELLI, M. J.; SQUIRES, E. L. Proteins in seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 113-120, 1987.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. R. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 4, p. 361-381, 1993.

AMANN, R. P.; HAY, S. R.; HAMMERSTEDT, R. H. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 723-733, 1982.

AMANN, R. P.; KAVANAUGH, J. F.; GRIEL JR., L. C. *et al.* Sperm production of Holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after cannulation of rete testis or vas deferens, and by daily ejaculation. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 1, p. 93-99, 1974.

AMIR, D.; ORTAVANT, R.; BURE, A. Influence de la fréquence des collectes sur la durée du transit des spermatozoïdes dans le canal épидидymaire du bélier. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 8, n. 2, p. 195-207, 1968.

ARMAN, C.; QUINTANA-CASARES, P. I.; SANCHEZ-PARTIDA, L. G. *et al.* Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 4, p. 411-418, 2006.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. *et al.* Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 4, p. 412-419, 1998.

ARTEAGA, A. A.; BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 408-415, 2005.

ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S. *et al.* Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1836-1841, 2003.

AVILÉS, M.; ABASCAL, I.; MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ, J. A. *et al.* Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral pH optimum α -L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 318, p. 821-831, 1996.

BAILEY, J. L. Factors regulating sperm capacitation. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 56, n. 5, p. 334-348, 2010.

BAILEY, R.; GRISWOLD, M. D. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 151, p. 17-23, 1999.

BAILEY, R. W.; ARONOW, B.; HARMONY, J. A. K. *et al.* Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/apoJ knock-out mice. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1042-1053, 2002.

BAKER, M. A.; AITKEN, R. J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 67-76, 2005.

BAKER, M. A.; WITHERDIN, R.; HETHERINGTON, L. *et al.* Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 5, p. 1003-1012, 2005.

BANKS, S.; KING, S. A.; IRVINE, D. S. *et al.* Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, p. 505-514, 2005.

BARRAUD-LANGE, V.; NAUD-BARRIANT, N.; SAFFAR, L. *et al.* Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 102, 2007.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M. *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1531-1537, 2000.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 93-102, 1994.

BARTH, A. D.; OKO, R. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. New York: Wiley-Blackwell, 1989. 285 ISBN 978-0813801124. Disponível em: < <http://www.blackwellpublishing.com/book.asp?ref=9780813801124> >.

BATHIA, V. N.; PERLMAN, D. H.; COSTELLO, C. E. *et al.* Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 23, p. 9819-9823, 2009.

BEDFORD, J. M. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: GREEP, R. O. e ASTWOOD, E. B. (Ed.). **Handbook of physiology**. Washington, DC: American Physiological Society, v.5, 1975. cap. 7, p.303-317.

BEERE, H. M. 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 2641-2651, 2004.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N. *et al.* Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 173-182, 1996.

BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E. *et al.* Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BENDAHMANE, M.; LYNCH, C. N.; TULSIANI, D. R. P. Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 390, n. 1, p. 1-8, 2001.

BENOFF, S.; HURLEY, I. R.; COOPER, G. W. *et al.* Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. **Human Reproduction**, v. 8, n. 12, p. 2155-2166, 1993.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C. *et al.* Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 461-470, 2005.

BERNDTSON, W. E.; IGBOELI, G.; PARKER, W. G. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 60-67, 1987.

BINGLE, C. D.; CRAVEN, C. J. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 8, p. 937-943, 2002.

BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C-reactive protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48487-48490, 2004.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; JOHNSON, L. *et al.* Testicular and hormonal changes in stallions with thermally induced testicular degeneration. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 56, p. 51-59, 2000.

BLASCHUK, O.; BURDZY, K.; FRITZ, I. B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7714-7720, 1983.

BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. F.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 673-677, 1988.

BOISVERT, M.; BERGERON, A.; LAZURE, C. *et al.* Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 656-661, 2004.

BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 2, p. 539-545, 1993.

BOULANGER, J.; FAULDS, D.; EDDY, E. M. *et al.* Members of the 70 kDa heat shock protein family specifically recognize sulfoglycolipids: Role in gamete recognition and mycoplasma-related infertility. **Journal of Cellular Physiology**, v. 165, n. 1, p. 7-17, 1995.

BRADEN, A. W. H.; MATTNER, P. E. The effects of scrotal heating in the ram on semen characteristics, fecundity and embryonic mortality. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 12, p. 509-518, 1970.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRETON, S.; SMITH, P. J. S.; LUI, B. *et al.* Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. **Nature Medicine**, v. 2, n. 4, p. 470-472, 1996.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; WILDE, R. E. *et al.* Testicular vascular cone development and its association with scrotal temperature, semen quality, and sperm production in beef bulls. **Animal Reproduction Science**, 2012.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T. *et al.* Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, 2003.

BROOKS, D. E. Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. **Biochemical Journal**, v. 156, n. 3, p. 527-537, 1976.

BROWN, D.; BRETON, S. H(+)V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. Pt 1, p. 137-145, 2000.

BROWN, D.; SMITH, P. J.; BRETON, S. Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 257-262, 1997.

BURFENING, P. J.; ELLIOT, D. S.; EISEN, E. J. *et al.* Survival of embryos resulting from spermatozoa produced by mice exposed to elevated ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 4, p. 578-582, 1970.

BYERS, S. W. Effect of scrotal insulation on the ability of ram testes to produce testosterone *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, n. 1, p. 17-21, 1984.

BYERS, S. W.; GLOVER, T. D. Effect of scrotal insulation on the pituitary-testicular axis of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, n. 1, p. 23-31, 1984.

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

CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J. M.; GARCÍA, E. M. *et al.* Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 6, p. 766-773, 2006.

CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. M.; MAYOR, G. M. *et al.* PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 5, p. 505-513, 2009.

CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J. M.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. *et al.* Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. **Zygote**, v. 13, n. 1, p. 11-16, 2005.

CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 13, 2011.

CALDERWOOD, S. K.; MAMBULA, S. S.; GRAY JR, P. J. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1113, p. 28-39, 2007.

CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHAFER, B. *et al.* Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**, v. 310, p. 615-622, 1995.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARLSSON, L.; RONQUIST, G.; RONQUIST, G. *et al.* Association of cystatin C with prostasomes in human seminal plasma. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 4, p. 363-368, 2011.

CARREAU, S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 65-72, 2001.

CARREAU, S.; BOURGUIBA, S.; LAMBARD, S. *et al.* Reproductive system: aromatase and estrogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 193, n. 1-2, p. 137-143, 2002.

CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B. *et al.* Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 211-223, 1999.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALAND, C. *et al.* Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 35, 2003.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J. *et al.* The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 940-950, 2010.

CASCIERI, M.; AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 3, p. 787-793, 1976.

CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e sua aplicação em estudos da reprodução de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 1997.

CENTURION, F.; VAZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J. *et al.* Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 640-646, 2003.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; MULLER, E. *et al.* Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 221-231, 1999.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermiogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 41-50, 2002.

CHO, C. Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. **Nature Reviews Urology**, 2012.

CHOWDHURY, A. K.; STEINBERGER, E. A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes. **American Journal of Anatomy**, v. 115, n. 3, p. 509-524, 1964.

_____. Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, p. 205-212, 1970.

CHRISTENSEN, A. K. Leydig cells. In: HAMILTON, D. W. e GREEP, R. O. (Ed.). **Handbook of Physiology**. Washington, DC: American Physiological Society, 1975. cap. 5, p.57-94.

COELHO, L. A.; SASA, A.; NADER, C. E. *et al.* Características do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmara bioclimática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 544-549, 2006.

COHEN, D. J.; MALDERA, J. A.; VASEN, G. *et al.* Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 672-678, 2011.

COLAS, G. Seasonal variations of the quality of sperm in the Ile-de-France ram. I. study of the cellular morphology and massal motility. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 20, n. 6, p. 1789-1799, 1980.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 653-671, 1994.

COOPER, T. G.; YEUNG, C. H. Sperm maturation in the human epididymis. In: DE JONGE, C. J. e BARRATT, C. L. R. (Ed.). **The sperm cell**. New York: Cambridge University Press, 2006. cap. 4, p.72-107. ISBN 978-0-511-22123-1.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2009.

CORNWALL, G. A.; HANN, S. R. Specialized gene expression in the epididymis. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 5, p. 379-383, 1995.

COULTER, G. H. Thermography of bull testes. 12th Tech Conf Artific Insem Reprod Natl Assoc Anim Breeders, 1988.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D., *et al* (Ed.). **The testis**. New York: Academic Press, v.1, 1970. cap. 6, p.339-432.

COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 30, p. 47-60, 1981.

COURTENS, J. L. Etude ultrastructurale et cytochimique de la spermiogenèse de quelques mammifères domestiques. Définition de quelques facteurs impliqués dans la morphogenèse des spermatozoides. 1983. 250 **These de Doctorat** (D.Sc.). Reproduction Animal, L'Université François-Rabelais de Tours, Tours, France.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.

CUASNICÚ, P.; COHEN, D. J.; ELLERMAN, D. A. *et al*. Changes in sperm proteins during epididymal maturation. In: ROBAIRE, B. e HINTON, B. T. (Ed.). **The epididymis: from molecules to clinical practice**. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p.389-404. ISBN 0-306-46684-8.

DA SILVA, N.; SHUM, W. W.; BRETON, S. Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 476-482, 2007.

DACHEUX, J. L.; BELGHAZI, M.; LANSON, Y. *et al*. Human epididymal secretome and proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 36-42, 2006.

DACHEUX, J. L.; BELLEANNÉE, C.; GUYONNET, B. *et al*. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 4, p. 197-210, 2012.

DACHEUX, J. L.; BELLEANNÉE, C.; JONES, R. *et al*. Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, p. 45-50, 2009.

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

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F.; PAQUIGNON, M. Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 3, p. 635-651, 1989.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 7-17, 2003.

DACHEUX, J. L.; PAQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 20, n. 4A, p. 1085-1099, 1980.

DACHEUX, J. L.; VOGLMAYR, J. K. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1033-1046, 1983.

DE LAMIRANDE, E.; BARDIN, C. W.; GAGNON, C. Aprotinin and a seminal plasma factor inhibit the motility of demembrated reactivated rabbit spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 788-796, 1983.

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 175-194, 1997.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, 1992.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 4, p. 425-435, 1994.

DEVKOTA, B.; SASAKI, M.; MATSUI, M. *et al.* Effects of scrotal insulation and pathological lesions on α -smooth muscle actin (SMA) and vimentin in the bull testes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 187-190, 2010.

DIAMANDIS, E. P.; ARNETT, W. P.; FOUSSIAS, G. *et al.* Seminal plasma biochemical markers and their association with semen analysis findings. **Urology**, v. 53, p. 596-603, 1999.

DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 70-79, 2006.

DUN, M. D.; AITKEN, R. J.; NIXON, B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. **Human Reproduction Update**, 2012.

EDDY, E. M. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 23-30, 1999.

EHRENWALD, E.; PARKS, J. E.; FOOTE, R. H. Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. **Gamete Research**, v. 20, n. 2, p. 145-157, 1988.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; GOHR, K.; WAGNER, A. *et al.* Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 536-545, 2005.

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J. *et al.* The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v. 17, n. 11, p. 2904-2911, 2002.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 395-405, 2003.

FÉNICHEL, P.; DURAND-CLÉMENT, M. Role of integrins during fertilization in mammals. **Human Reproduction**, v. 13, n. suppl. 4, p. 31-46, 1998.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D. *et al.* Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-1568, 2008.

FLORMAN, H. M.; DUCIBELLA, T. Fertilization in mammals. In: NEILL, J. D., *et al.* (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Third. New York: Elsevier Inc., v.1, 2006. cap. 2, p.55-112. ISBN 978-0-12-515400-0

FOOTE, R. H. Catalase content of rabbit, ram, bull and boar semen. **Journal of Animal Science**, v. 21, p. 966-968, 1962.

FOUCHÉCOURT, S.; MÉTAYER, S.; LOCATELLI, A. *et al.* Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1790-1803, 2000.

FOURNIER-DELPECH, S.; COLAS, G.; COUROT, M. *et al.* Epididymal sperm maturation in the ram : motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 19, n. 3A, p. 597-605, 1979.

FOURNIER-DELPECH, S.; COURTENS, J. L.; PISSELET, C. *et al.* Acquisition of zona binding by ram spermatozoa during epididymal passage, as revealed by interaction with rat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 5, n. 4, p. 403-408, 1982.

FRIDD, C. W.; MARPHY, J.; LINKE, C. A. *et al.* Response of rat testis to localized induced hyperthermia. **Urology**, v. 5, p. 76-82, 1975.

FRITZ, I. B.; BURDZY, K.; SETCHELL, B. P. *et al.* Ram rete testis fluid contains a protein (Clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1173-1188, 1983.

FUJII, H.; LI, S. H.; SZMITKO, P. E. *et al.* C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, n. 11, p. 2476-2482, 2006.

FUKUI, N. Action of body temperature on the testicle. **Japan Medicine World**, v. 3, p. 160, 1923.

FURUTA, I.; PORKKA-HEISKANEN, T.; SCARBROUGH, K. *et al.* Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1315-1321, 1994.

FUSI, F. M.; TAMBURINI, C.; MANGILI, F. *et al.* The expression of $\alpha_v\beta_3$ and α_3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 169-175, 1996.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciência Agrária e Saúde**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.

GADELLA, B. M. Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v. 7, n. 1, p. 265-285, 2010.

GAILIT, J.; COLFLESH, D.; RABINER, I. *et al.* Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 264, n. 1, p. F149-F157, 1993.

GALIL, K. A. A.; SETCHELL, B. P. Effects of local heating of the testis on testicular blood flow and testosterone secretion in the rat. **International Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-85, 1988.

GARCÍA, E. M.; VAZQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J. *et al.* Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 3, p. 434-443, 2006.

GARCÍA, E. M.; VÁZQUEZ, J. M.; PARRILLA, I. *et al.* Localization and expression of spermadhesin PSP-I/PSP-II subunits in the reproductive organs of the boar. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 4, p. 408-417, 2008.

GARRIDO, C.; BRUNET, M.; DIDELOT, C. *et al.* Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2592-2601, 2006.

GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F. *et al.* Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 321-339, 2004.

GATTI, J. L.; DRUART, X.; GUÉRIN, Y. *et al.* A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 937-945, 1999.

GEORGOPOULOS, C.; WELSH, W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 601-634, 1993.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y. *et al.* Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, p. 1028-1033, 1999.

GIESE, S.; HOSSAIN, H.; MARKMANN, M. *et al.* Sertoli-cell-specific knockout of connexin 43 leads to multiple alterations in testicular gene expression in prepubertal mice. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 6, p. 895-913, 2012.

GILMONT, R. R.; SENGER, P. L.; SYLVESTER, S. R. *et al.* Seminal transferrin and spermatogenic capability in the bull. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 1, p. 151-157, 1990.

GLANDER, H. J.; KRATZSCH, J.; WEISBRICH, C. *et al.* Insulin-like growth factor-I and α 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. **Human Reproduction**, v. 11, n. 11, p. 2454-2460, 1996.

GLOVER, T. D. Some effects of scrotal insulation on the semen of rams. **Proceedings. Society for the Study of Fertility**, v. 7, p. 66-75, 1955.

_____. The effect of scrotal insulation and the influence of the breeding season upon fructose concentration in the semen of the ram. **Journal of Endocrinology**, v. 13, p. 235-242, 1956.

GOLLI-BENNOUR, E. E.; BACHA, H. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. **Toxicology**, v. 287, n. 1-3, p. 1-7, 2011.

GOMEZ, M.; MANZANO, A.; FIGUERAS, A. *et al.* Sertoli-secreted FGF-2 induces PFKFB4 isozyme expression in mouse spermatogenic cells by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 6, p. E695-E707, 2012.

GONÇALVES, R. F.; CHAPMAN, D. A.; BERTOLLA, R. P. *et al.* Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects *in vitro* fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 375-383, 2008.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; BARNABE, V. H. *et al.* Influence of osteopontin in bovine uterine tube fluid on sperm binding and fertilization in RCA-1 lectin-treated oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 152-155, 2009.

GRASA, P.; CÉBRIAN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. **Reproduction**, v. 132, p. 721-732, 2006.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, n. 4, p. 411-416, 1998.

GRISWOLD, M. D.; MCLEAN, D. The Sertoli cell. In: NEILL, J. D., *et al* (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3rd. New York, NY: Academic Press, v.1, 2006. cap. 19, p.949-975. ISBN 978-0-12-515400-0.

GUNN, S. A.; GOULD, T. C. Vasculature of the testes and adnexa. In: GREEP, R. O. e ASTWOOD, E. B. (Ed.). **Handbook of Physiology**. Washington, DC: American Physiological Society, 1975. cap. 7, p.117-142.

GUO, C.; TANG, T.; MU, X. *et al*. Cloning of novel temperature-related expressed sequence tags in rat testis during spermatogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 258, n. 2, p. 401-406, 1999.

GUPTA, V. K.; GOWDA, L. R. Alpha-1-proteinase inhibitor is a heparin binding serpin: molecular interactions with the Lys rich cluster of helix-F domain. **Biochimie**, v. 90, n. 5, p. 749-761, 2008.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L. *et al*. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 501-507, 2006.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; SUAREZ, S. S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p. 809-815, 2003.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7a. ed. Barueri: Manole, 2004.

HAGAMAN, J. R.; MOYER, J. S.; BACHMAN, E. S. *et al*. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 2552-2557, 1998.

HAMMERSTEDT, R. H.; HAY, S. R.; AMANN, R. P. Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 745-754, 1982.

HAN, Z.; WANG, Z.; CHENG, G. *et al*. Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 8, p. 751-757, 2012.

HANDROW, R. R.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. **Journal of Experimental Zoology**, v. 252, n. 2, p. 174-182, 1989.

HAO, Y.; MURPHY, C. N.; SPATE, L. *et al*. Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 2, p. 291-298, 2008.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 199-204, 1996.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J. F. *et al.* Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 390-397, 1995.

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

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

HINTON, B. T.; PALLADINO, M. A.; RUDOLPH, D. *et al.* The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 33, p. 61-102, 1996.

HIROHASHI, N.; KAMEI, N.; KUBO, H. *et al.* Egg and sperm recognition systems during fertilization. **Development, Growth & Differentiation**, v. 50, p. 221-238, 2008.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; LOCATELLI, A.; PERREAU, C. *et al.* Effects of a single brief period of moderate heating of the testes on seminiferous tubules in hypophysectomized rams treated with pituitary extract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 381-387, 1993.

HOLLAND, M. K.; STOREY, B. T. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 198, p. 273-280, 1981.

HOLMES, S. D.; SPOTTS, G.; SMITH, R. G. Rat Sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 9, p. 4076-4080, 1986.

HORAN, A. H.; BEDFORD, J. M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. **Reproduction**, v. 30, n. 3, p. 417-423, 1972.

HOWARTH JR, B. Fertility in the ram following exposure to elevated ambient temperature and humidity. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 19, p. 179-183, 1969.

HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; LEE, W. C. *et al.* Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, n. 5, p. 1007-1016, 1999.

HUMPHREYS, D. T.; CARVER, J. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. *et al.* Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 6875-6881, 1999.

HUNG, P. H.; SUAREZ, S. S. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 67, p. 257-266, 2010.

_____. Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 88, 2012.

IBRAHIM, N. M.; ROMANO, J. E.; TROEDSSON, M. H. T. *et al.* Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 863-877, 2001.

IBRAHIM, N. M.; TROEDSSON, M. H. T.; FOSTER, D. N. *et al.* Reproductive tract secretions and bull spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. **Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 230-240, 1999.

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, P. Effect of local heat in vivo on the fine structure of the basement membrane and the sertoli cells of the rat testis. **Fertility and Sterility**, v. 17, n. 5, p. 689-695, 1966.

IGDOURA, S. A.; MORALES, C. R.; HERMO, L. Differential expression of cathepsins B and D in testis and epididymis of adult rats. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 545-557, 1995.

IGNOTZ, G. G.; CHO, M. Y.; SUAREZ, S. S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 6, p. 906-913, 2007.

IKEDA, M.; KODAMA, H.; FUKUDA, J. *et al.* Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 2, p. 393-399, 1999.

ILIO, K. Y.; HESS, R. A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. **Microscopy Research and Technique**, v. 29, n. 6, p. 432-467, 1994.

IPE, D., 1987. Performing the Friedman test and the associated multiple comparison test using PROC GLM, **Twelfth Annual SAS User Group International Conference**, pp. 1146-1148.

JALKANEN, J.; KOTIMAKI, M.; HUHTANIEMI, I. *et al.* Novel epididymal protease inhibitors with kazal or WAP family domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, p. 245-254, 2006.

JERVIS, K. M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 696-703, 2001.

JEULIN, C.; SOUFIR, J. C.; WEBER, P. *et al.* Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 185-186, 1989.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E. *et al.* Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; TATUM, M. E. *et al.* Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 3, p. 404-410, 1991.

JOHNSTON, D. S.; JELINSKY, S. A.; BANG, H. J. *et al.* The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 404-413, 2005.

JONES, R. Plasma membrane composition and organisation during maturation of spermatozoa in the epididymis. In: ROBAIRE, B. e HINTON, B. T. (Ed.). **The epididymis: from molecules to clinical practice**. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. cap. 405-416, p.565. ISBN 0-306-46684-8.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977.

JONES, R. C.; MURDOCH, R. N. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 553-568, 1996.

JOSEPH, A.; HESS, R. A.; SCHAEFFER, D. J. *et al.* Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 5, p. 948-957, 2010.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.

KANAGAWA, M.; SATOH, T.; IKEDA, A. *et al.* Crystal structures of human secretory proteins ZG16p and ZG16b reveal a Jacalin-related β -prism fold. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, n. 1, p. 201-205, 2011.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J. *et al.* Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1354-1365, 2005.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, p. 935-941, 1995.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. *et al.* Ejaculation increases scrotal surface temperature in bulls with intact epididymides. **Theriogenology**, v. 46, n. 5, p. 889-892, 1996a.

_____. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996b.

KATO, T.; ESAKI, M.; MATSUZAWA, A. *et al.* NR5A1 is required for functional maturation of Sertoli cells during postnatal development. **Reproduction**, v. 143, n. 5, p. 663-672, 2012.

KERR, J. B.; LOVELAND, K. L.; O'BRYAN, M. K. *et al.* Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: NEILL, J. D., *et al.* (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction** Third. New York: Elsevier Inc., v.1, 2006. cap. 18, p.827-947. ISBN 978-0-12-515400-0

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KILGOUR, R. J.; PISSELET, C.; DUBOIS, M. P. *et al.* Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli cell numbers and onset of spermatogenesis. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 38, n. 5, p. 539-550, 1998.

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

KIM, B.; PARK, K.; RHEE, K. Heat stress response of male germ cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2012.

KIM, J. M.; GHOSH, S. R.; WEIL, A. C. P. *et al.* Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3809-3816, 2001.

KISHORE, P. N.; RAO, A. R. Effect of induced testicular degeneration on characteristics of bucks. **Indian Veterinary Journal**, v. 60, n. 4, p. 281-286, 1983.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K. A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, n. 3, p. 299-303, 1993.

KOHN, F. M.; MULLER, C.; DRESCHER, D. *et al.* Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 207-215, 1998.

KOKHAN, I. V. Role of iron in bacterial infections and microelement immunity. **Mikrobiologichnyi Zhurnal**, v. 72, n. 5, p. 59-69, 2010.

KONDOH, G.; TOJO, H.; NAKATANI, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. **Nature Medicine**, v. 11, p. 160-166, 2005.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A. *et al.* Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 425-435, 2010.

KOTSAMPASI, B.; BALASKAS, C.; PAPADOMICHELAKIS, G. *et al.* Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1-3, p. 135-147, 2009.

KOWALOWKA, M.; WYSOCKI, P.; FRASER, L. *et al.* Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 490-496, 2008.

KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOZIOROWSKI, M.; STRZEZEK, J. *et al.* Seasonal changes in antioxidant defense systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. **Reproductive Biology**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2011.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. *et al.* Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 1, p. 33-46, 2005.

KREGE, J. H.; JOHN, S. W.; LANGENBACH, L. L. *et al.* Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature**, v. 375, n. 6527, p. 146-148, 1995.

LAFORTUNE, E.; BLANC, M. R.; PELLETIER, J. *et al.* Variations in the plasma levels of gonadotrophin and testosterone and in Leydig and Sertoli cell populations between birth and adulthood in Romanov lambs born in spring or autumn. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 24, n. 6, p. 937-946, 1984.

LAW, G. L.; GRISWOLD, M. D. Activity and form of sulfated glycoprotein 2 (clusterin) from cultured Sertoli cells, testis, and epididymis of the rat. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 3, p. 669-679, 1994.

LÉGARÉ, C.; THABET, M.; SULLIVAN, R. Expression of heat shock protein 70 in normal and cryptorchid human excurrent duct. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 197-202, 2004.

LI, X.; LIU, Q.; LIU, S. *et al.* The spatiotemporal expression changes of 16 epididymis-specific genes induced by testosterone, heat, and combination treatment in cynomolgus monkey. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 8, p. 721-728, 2008.

LI, Y.; PUTNAM-LAWSON, C. A.; KNAPP-HOCH, H. *et al.* Immunolocalization and regulation of cystatin 12 in mouse testis and epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 872-880, 2005.

LIN, M.; HESS, R. A.; AITKEN, R. J. Induction of sperm maturation *in vitro* in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. **Reproduction**, v. 124, p. 107-117, 2002.

LIU, Z.; STOCCO, D. M. Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2722-2728, 1997.

LUNSTRA, D. D., K. E. GREGORY; L. V. CUNDIFF. Heritability estimates and adjustment factors for the effects of bull age and age of dam on yearling testicular size in breeds of bulls. **Theriogenology** 30:127, 1988

LUSIGNAN, M. F.; BERGERON, A.; CRÊTE, M. H. *et al.* Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 424-432, 2007.

MACPHERSON, M. L.; SIMMEN, R. C. M.; SIMMEN, F. A. *et al.* Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 648-654, 2002.

MAIN, S. J.; DAVIES, R. V.; SETCHELL, B. P. Feedback control by the testis of gonadotrophin secretion: an examination of the inhibin hypothesis. **Journal of Endocrinology**, v. 79, p. 255-270, 1978.

MAINES, M. D.; EWING, J. F. Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1070-1079, 1996.

MAJDA, J. A.; GERNER, E. W.; VANLANDINGHAM, B. *et al.* Heat shock-induced shedding of cell surface integrins in A549 human lung tumor cells in culture. **Experimental Cell Research**, v. 210, n. 1, p. 46-51, 1994.

MALDERA, J. A.; VASEN, G.; ERNESTO, J. I. *et al.* Evidence for the involvement of zinc in the association of CRISP1 with rat sperm during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 3, p. 503-510, 2011.

MALMGREN, L. Experimentally induced testicular alterations in boars: hormonal changes in mature and peripubertal boars. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 31, n. 1, p. 97-107, 1990.

MALMGREN, L.; LARSSON, K. Experimentally induced testicular alterations in boars. **Journal of Veterinary Medicine, Series A**, v. 36, n. 1-10, p. 3-14, 1989.

MANANDHAR, G.; MIRANDA-VIZUETE, A.; PEDRAJAS, J. R. *et al.* Peroxiredoxin 2 and peroxidase enzymatic activity of mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 6, p. 1168-1177, 2009.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E. *et al.* Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 27-37, 1994.

MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P. S. *et al.* New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 394-397, 2009.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, v. 7, n. 3, p. 231-238, 1987.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-119, 2002.

MARAI, I. F. M.; EL-DARAWANY, A. A.; ISMAIL, E. S. A. F. *et al.* Tunica dartos index as a parameter for measurement of adaptability of rams to subtropical conditions of Egypt. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 5, p. 487-494, 2006.

MARIANTE, A. S. Endangered livestock breeds in south america. In: WIENER, G., Animal genetic resources: a global programme for sustainable development, 1989, Rome, Italy. Food and Agriculture Organization of the United Nations, September 1989. p.118-126.

MARTINS, J. A. M.; SOUZA, C. E. A.; SILVA, F. D. A. *et al.* Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research**, 2013.

MATSUMOTO, A. M.; BREMNER, W. J. Endocrinology of the hypothalamic-pituitary-testicular axis with particular reference to the hormonal control of spermatogenesis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 71-87, 1987.

MATSUMOTO, A. M.; KARPAS, A. E.; BREMNER, W. J. Chronic human chorionic gonadotropin administration in normal men: evidence that follicle-stimulating hormone is necessary for the maintenance of quantitatively normal spermatogenesis in man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 6, p. 1184-1192, 1986.

MATTHEW, A.; SILVA, N. O.; AHMAD, A. A. Experimental testicular degeneration by scrotal insulation in a bull. 11th FAO/SID. An International Postgraduate Course on Animal Production, 1975, Stockholm. Royal Veterinary College. p.2-9.

MCCAULEY, T. C.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. Localization of a heparin-binding protein to distinct regions of bovine sperm. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 429-438, 1996.

MCCAULEY, T. C.; ZHANG, H. M.; BELLIN, M. E. *et al.* Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 336-341, 2001.

MCLACHLAN, R. I.; O'DONNELL, L.; MEACHAM, T. N. *et al.* Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. **Endocrine Reviews**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

MCLACHLAN, R. I.; WREFORD, N. G.; ROBERTSON, D. M. *et al.* Hormonal control of spermatogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 95-101, 1995.

MEDEIROS, A. A. Utilização do azul de bromofenol como método de coloração vital para avaliação da morfologia espermática do espermatozóide ovino. 2004. 78 (Mestrado). **Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

MEEHAN, T.; SCHLATT, S.; O'BRYAN, M. K. *et al.* Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. **Developmental Biology**, v. 220, n. 2, p. 225-237, 2000.

MEINHARDT, A.; PARVINEN, M.; BACHER, M. *et al.* Expression of mitochondrial heat shock protein 60 in distinct cell types and defined stages of rat seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 4, p. 798-807, 1995.

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. **Nature Encyclopedia of Life Sciences**, v. 1, p. 1-8, 2001.

MÉTAYER, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J. L. *et al.* Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1219-1229, 2002a.

_____. Germinal angiotensin I-converting enzyme is totally shed from the rodent sperm membrane during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1763-1767, 2002b.

MIEUSSET, R.; QUINTANA CASARES, P. I.; SANCHEZ-PARTIDA, L. G. *et al.* Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 2, p. 337-343, 1992.

MILLER, D.; BROUGH, S.; AL-HARBI, O. Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. **Human Reproduction**, v. 7, n. 5, p. 637-645, 1992.

MIRANDA, P. V.; GONZÁLEZ-ECHEVERRÍA, F.; BLAQUIER, J. A. *et al.* Evidence for the participation of β -hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction *in vitro*. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 8, p. 699-706, 2000.

MIRANDA, P. V.; GONZALEZ-ECHEVERRÍA, F.; MARÍN-BRIGGILER, C. I. *et al.* Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding *in vitro*. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 5, p. 399-404, 1997.

MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P. (Ed.). **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Davis, CA: University of California, 2000. p.1-22.

MOORE, C.; OSLUND, R. Experiments on the sheep testis—cryptorchidism, vasectomy and scrotal insulation. **American Journal of Physiology**, v. 67, n. 3, p. 595-607, 1924.

MOORE, C. R. The behavior of the testis in transplantation, experimental cryptorchidism, vasectomy, scrotal insulation, and heat application. **Endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 493-508, 1924.

MOREAU, R.; FRANK, P. G.; PERREAULT, C. *et al.* Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1438, p. 38-46, 1999.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1487, p. 24-32, 2000.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A.; ARAUJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1704-1711, 2001.

MORTENSEN, C. J.; CHOI, Y. H.; ING, N. H. *et al.* Heat shock protein 70 gene expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures *in vitro* or *in vivo* after exercise of donor mares. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 374-383, 2010.

MOULE, G. R.; WAITES, G. M. H. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 433-446, 1963.

MOUNIER, N.; ARRIGO, A. P. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? **Cell Stress and Chaperones**, v. 7, n. 2, p. 167-176, 2002.

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 and Development**, v. 74, n. 2, p. 214-222, 2007a.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H. *et al.* Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 4, p. 534-541, 2006a.

_____. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 169-188, 2007b.

MOURA, A. A.; ERICKSON, B. H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testis size and number of Sertoli and germ cells in yearling beef bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 183-190, 1997.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A. *et al.* Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006b.

MOURA, A. A.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. *et al.* Proteínas do plasma seminal e função espermática. In: NUNES, J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes**. Fortaleza: Tecnograf, v.1, 2010a. p.91-117.

MOURA, A. A.; SOUZA, C. E. A.; STANLEY, B. A. *et al.* Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-2020, 2010b.

MUCCILOLO, R. G.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Semen picture in rams after induced testicular degeneration. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 155-177, 1974.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. Supp. 4, p. 18-31, 2008.

MULLER, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BRADEN, S. *et al.* Testicular ultrastructure of zebu bulls in Costa Rica. **Journal of Veterinary Medicine, Series A**, v. 39, n. 1-10, p. 382-391, 1992.

MULLINS, J. J.; MULLINS, L. J.; DUNBAR, D. R. *et al.* Identification of a human ortholog of the mouse Dcpp gene locus, encoding a novel member of the CSP-1/Dcpp salivary protein family. **Physiological Genomics**, v. 28, n. 1, p. 129-140, 2007.

MURPHY, B. D.; LALLI, E.; WALSH, L. P. *et al.* Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 8, p. 1255-1263, 2001.

NAABY-HANSEN, S.; HERR, J. C. Heat shock proteins on the human sperm surface. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 1, p. 32-40, 2010.

NASS, S. J.; MILLER, D. J.; WINER, M. A. *et al.* Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 3, p. 237-246, 1990.

NELSON, R. J.; KITA, M.; BLOM, J. M. *et al.* Photoperiod influences the critical caloric intake necessary to maintain reproduction among male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 2, p. 226-232, 1992.

NEWTON, L. D.; KASTELIC, J. P.; WONG, B. *et al.* Elevated testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in Holstein bulls. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 1, p. 109-118, 2009.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M. *et al.* Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

NOZAKI, A.; TANAKA, K.; NAGANUMA, A. *et al.* Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C. **Nihon Rinsho**, v. 60, n. 4, p. 819-829, 2002.

NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. Washington, DC: National Academy Press, 2007. ISBN 978-0-309-10213.

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. Fortaleza, CE: Editora Gráfica LCR, 1997. 157.

OLIVEIRA, A. A. P.; LIMA, V. P. M. S. Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira. In: LEITE, E. R. I., I Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira, 1994, Brasília. EMBRAPA/CNPC. p.7-46.

ORGBIN-CRIST, M. C. Recherches expérimentales sur la durée de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme du taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 2, n. 1, p. 51-108, 1962.

ORTAVANT, R. **Le cycle spermatogénétique chez le bélier**. 1958. 127 (Doctorat). L'Université Paris VI, Paris.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T. Spermatogenesis in domestic animals. In: COLE, H. H. e CUPPS, P. T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. New York: Academic Press, 1977. p.203-227.

OU, C. M.; TANG, J. B.; HUANG, M. S. *et al.* The mode of reproductive-derived spink (serine protease inhibitor Kazal-type) action in the modulation of mammalian sperm activity. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 1, p. 52-62, 2011.

PAPADOPOULOS, V. Environmental factors that disrupt Leydig cell steroidogenesis. In: PAYNE, A. H. e HARDY, M. P. (Ed.). **The Leydig cell in health and disease**. Totowa: Humana Press, 2007. p.393-413.

PARK, K.; JEON, S.; SONG, Y. J. *et al.* Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and

peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 135, n. 1-4, p. 53-61, 2012.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; UGUZ, C. *et al.* Differences in the role of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1099-1108, 1994.

PASTOR-SOLER, N.; PIÉTREMENT, C.; BRETON, S. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. **Physiology**, v. 20, n. 6, p. 417-428, 2005.

PEI, Y.; WU, Y.; QIN, Y. Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. **Cell Stress and Chaperones**, v. epub, 2011.

PELOILLE, S.; ESNARD, A.; DACHEUX, J. L. *et al.* Interactions between ovine cathepsin L, cystatin C and α 2-macroglobulin - potential role in the genital tract. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, n. 1, p. 140-146, 1997.

PEREIRA, C. C. J. **Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal**. Belo Horizonte, MG: FEPMVZ, 2005.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 425-434, 2001.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M. *et al.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

PEZZINI, T. G.; SARTORI, R.; SILVA, T. A. S. N. *et al.* Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 863-868, 2006.

PICARD, D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1640-1648, 2002.

PLANTE, G.; THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Characterization of recombinant murine binder of sperm protein homolog 1 and its role in capacitation. **Biology of Reproduction**, 2012.

QUEIROZ, G. C.; CARDOSO, F. M. Avaliação histológica do rendimento da espermatogênese de carneiros deslanados adultos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 2, p. 99-108, 1989.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T. *et al.* Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of

spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246-1257, 2011.

RAO, A. R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B. K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980.

RAO, B.; SOUFIR, J. C.; MARTIN, M. *et al.* Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 127-134, 1989.

RATHORE, A. K. A note on the effect of scrotal wool cover on morphological changes in ram spermatozoa due to heat stress. **Animal Production**, v. 11, n. 4, p. 561-563, 1969.

RIFFO, M. S.; PARRAGA, M. Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine. **Journal of Experimental Zoology**, v. 275, n. 6, p. 459-468, 1996.

RITZEN, E. M.; VAN DAMME, M. P.; FRÖYSA, B. *et al.* Identification of estradiol produced by sertoli cell enriched cultures during incubation with testosterone. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 533-535, 1981.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 523-532, 1991.

ROBAIRE, B.; HAMZEH, M. Androgen action in the epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 592-599, 2011.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. In: NEILL, J. D., *et al* (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. New York, NY: Elsevier Inc., v.1, 2006. cap. 22, p.1071-1148. ISBN 978-0-12-515400-0

ROBERTSHAW, D.; VERCOE, J. E. Scrotal thermoregulation of the bull (*Bos sp*). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, p. 401-404, 1980.

ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N. R. *et al.* The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, v. 582, n. 13, p. 1783-1787, 2008.

ROCKETT, J. C.; MAPP, F. L.; GARGES, J. B. *et al.* Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 229-239, 2001.

RODRIGUES, M. A. M.; SOUZA, C. E. A.; MARTINS, J. A. M. *et al.* Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2-3, p. 94-100, 2013.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J. *et al.* Seminal plasma proteins: what role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. Suppl. 1, p. 11-22, 2011.

RODRIGUEZ, C. M.; KIRBY, J. L.; HINTON, B. T. Regulation of gene transcription in the epididymis. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 41-48, 2001.

ROSS, A. D.; ENTWISTLE, K. W. The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. **Theriogenology**, v. 11, n. 2, p. 111-129, 1979.

RUPP, P. A.; LITTLE, C. D. Integrins in vascular development. **Circulation Research**, v. 89, p. 566-572, 2001.

RUSSELL, L. D. Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: RUSSELL, L. D. e GRISWOLD, M. D. (Ed.). **The Sertoli cell**. Clearwater, FL: Cache River Press, 1993. p.1-37.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P. *et al.* **Histological and Histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, FL: Cache River Press, 1990. ISBN 0962742201.

SALOIS, D.; MÉNARD, M.; PAQUETTE, Y. *et al.* Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 288-297, 1999.

SAMPAIO, I.B.M., 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. **FEP MVZ Editora**, Belo Horizonte.

SANKHALA, R. S.; DAMAI, R. S.; SWAMY, M. J. Correlation of membrane binding and hydrophobicity to the chaperone-like activity of PDC-109, the major protein of bovine seminal plasma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17330, 2011.

SANKHALA, R. S.; SWAMY, M. J. The major protein of bovine seminal plasma, PDC-109, is a molecular chaperone. **Biochemistry**, v. 49, n. 18, p. 3908-3918, 2010.

SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 1835-1841, 2000.

SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Scrotal-testicular and ejaculation characteristics in crossbred bucks submitted to scrotal insulation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 287-291, 1998.

SANZ, L.; CALVETE, J. J.; MANN, K. *et al.* The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. **FEBS Letters**, v. 300, n. 3, p. 213-218, 1992.

SAS, I. I. **SAS/STAT® 6.2 User's guide**. 4th. Cary: SAS Publishing, 2003. 208 ISBN 978-1-60764-247-3.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 7, p. 32-36, 1936.

SCHILL, W. B.; KRASSNIGG, F.; MULLER-ESTERL, W. *et al.* Quantitative determination of different proteins in normal and pathological semen. In: PEETERS, H. (Ed.). **Protides of the biological fluids**. New York: Pergamon Press, 1984. p.293-295.

SEILER, P.; COOPER, T. G.; NIESCHLAG, E. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 65-76, 2000.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 7, p. 32-36, 1936.

SENSIBAR, J. A.; QIAN, Y.; GRISWOLD, M. D. *et al.* Localization and molecular heterogeneity of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) among ventral prostate, seminal vesicle, testis, and epididymis of rats. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 2, p. 233-242, 1993.

SETCHELL, B. P. **The mammalian testis**. New York: Cornell University Press, 1978. 450 ISBN 9780801411403.

_____. The parkes lecture: heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SETCHELL, B. P.; LOCATELLI, A.; PERREAU, C. *et al.* Long-term changes in the number, size and in vivo function of the Leydig cells following a single brief period of moderate heating of the testes of hypophysectomized rams treated with pituitary extract. **Journal of Endocrinology**, v. 131, p. 101-112, 1991.

SETCHELL, B. P.; WAITES, G. M. H. The effects of local heating of the testis on the flow and composition of rete testis fluid in the rat, with some observations on the effects of age and unilateral castration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 225-233, 1972.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E. e NEILL, J. D. (Ed.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Second. New York, NY: Raven Press, v.1, 1994. p.1363-1434.

SHIKONE, T.; BILLIG, H.; HSUEH, A. J. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 5, p. 865-872, 1994.

SHINOHARA, T.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. α_1 - and α_6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 5504-5509, 1999.

SHUM, W. W.; RUAN, Y. C.; DA SILVA, N. *et al.* Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 576-586, 2011.

SI, W.; MEN, H.; BENSON, J. D. *et al.* Osmotic characteristics and fertility of murine spermatozoa collected in different solutions. **Reproduction**, v. 137, p. 215-223, 2009.

SIDIBÉ, M.; FRANCO, L. A.; FREDRIKSSON, G. *et al.* Effects on testosterone, LH and cortisol concentrations, and on testicular ultrasonographic appearance of induced testicular degeneration in bulls. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 33, n. 3, p. 191-196, 1992.

SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464-468, 1995.

SIVA, A. B.; KAMESHWARI, D. B.; SINGH, V. *et al.* Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 7, p. 452-462, 2010.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 20, p. 9523-9525, 1980.

SKUDLAREK, M. D.; TULSIANI, D. R. P.; NAGDAS, S. K. *et al.* β -D-galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 204-213, 1993.

SKUDLAREK, M. D.; TULSIANI, D. R. P.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Rat epididymal luminal fluid acid beta-D-galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. **Biochemical Journal**, v. 286, p. 907-914, 1992.

SMITH, E. P.; HALL, S. H.; MONACO, L. *et al.* A rat Sertoli cell factor similar to basic fibroblast growth factor increases c-fos messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 954-961, 1989.

SMITH, M. F.; MORRIS, D. L.; AMOSS, M. S. *et al.* Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality, and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v. 16, n. 4, p. 379-397, 1981.

SOMLEV, B.; SUBEV, M. Dynamics of exogenous kallikrein-stimulated bovine sperm motility in the presence of seminal plasma kallikrein. **Theriogenology**, v. 47, p. 1087-1092, 1997.

SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B. M. *et al.* The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 237-248, 2008.

SOUZA, C. E. A.; ARAÚJO, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644-653, 2010.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; LIMA-SOUZA, A. C. B. *et al.* Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 535-543, 2011.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; MONACO, E. *et al.* Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 72-89, 2008.

SOUZA, C. E. A.; REGO, J. P.; LOBO, C. H. *et al.* Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-4456, 2012.

SPROTT, L. R.; HARRIS, M. D.; FORREST, D. W. *et al.* Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 4, p. 795-798, 2000.

SRIVASTAVA, A.; OLSON, G. E. Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, n. 4, p. 357-364, 1991.

STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H. *et al.* Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, v. 29, n. 1-2, p. 35-52, 1992.

STRZEZEK, J.; WYSOCKI, P.; KORDAN, W. *et al.* Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 3, p. 279-290, 2005.

STUPACK, D. G.; CHERESH, D. A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3729-3738, 2002.

SUAREZ, S. S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 455-462, 2008.

SULICKA, J.; SURDACKI, A.; MIKOLAJCZYK, T. *et al.* Elevated markers of inflammation and endothelial activation and increased counts of intermediate monocytes in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Immunobiology**, 2012.

SULLIVAN, R.; FRENETTE, G.; GIROUARD, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 483-491, 2007.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J. *et al.* Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2005.

SWIERSTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. **Anatomical Record**, v. 161, p. 171-186, 1968.

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

SYNTIN, P.; DACHEUX, F.; DRUART, X. *et al.* Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 5, p. 956-974, 1996.

SZKLARCZYK D *et al.* Nucleic Acids Res. 2011 39: D561 [PMID: 21045058]

TAIRA, T.; SAITO, Y.; NIKI, T. *et al.* DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. **EMBO Reports**, v. 5, n. 2, p. 213-218, 2004.

TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.

TALEVI, R.; GUALTIERI, R. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. **Theriogenology**, v. 73, n. 6, p. 796-801, 2010.

TANNERT, A.; KURZ, A.; ERLEMANN, K. R. *et al.* The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet. **European Biophysics Journal**, v. 36, n. 4-5, p. 461-475, 2007.

TAPANAINEN, J.; TILLY, J. L.; VIHKO, K. K. *et al.* Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 5, p. 643-650, 1993.

TASH, J. S.; MEANS, A. R. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 75-104, 1983.

THACKER, S.; YADAV, S.; SHARMA, R. K. *et al.* Evaluation of sperm proteins in infertile men: A proteomic approach. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 8, p. 2745-2748, 2011.

THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1372-1379, 1995.

THÉRIEN, I.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 41-51, 2001.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

_____. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 590-598, 1999.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

THIMON, V.; MÉTAYER, S.; BELGHAZI, M. *et al.* Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 881-890, 2005.

THOM, E.C. **The discomfort index Weatherwise**. 1959. 60:12-57

TOPFER-PETERSEN, E. Molecules on the sperm's route to fertilization. **Journal of Experimental Zoology**, v. 285, n. 3, p. 259-266, 1999.

TOPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P. F. *et al.* Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 217-224, 1998.

TOSHIMORI, K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2003.

TROJIAN, T. H.; LISHNAK, T. S.; HEIMAN, D. Epididymitis and orchitis: an overview. **American Family Physician**, v. 79, n. 7, p. 583-587, 2009.

TULSIANI, D. R. P.; ABOU-HAILA, A. Molecular events that regulate mammalian fertilization. **Minerva Ginecologica**, v. 63, n. 2, p. 103-118, 2011.

TULSIANI, D. R. P.; SKUDLAREK, M. D.; ARAKI, Y. *et al.* Purification and characterization of two forms of β -D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoproteins. **Biochemical Journal**, v. 305, p. 41-50, 1995.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: proteins inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, p. 213-219, 1991.

TURNER, T. T.; LYSIAK, J. J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 5, p. 488-498, 2008.

UNGERFELD, R.; SILVA, L. Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 251-259, 2004.

UTLEG, A. G.; YI, E. C.; XIE, T. *et al.* Proteomic analysis of human prostasomes. **Prostate**, v. 56, n. 2, p. 150-161, 2003.

VEERAMACHANENI, D. N. R.; AMANN, R. P. Endocytosis of androgen-binding protein, clusterin, and transferrin in the efferent ducts and epididymis of the ram. **Journal of Andrology**, v. 12, n. 5, p. 288-294, 1991.

VENDITTI, J. J.; BEAN, B. S. Stabilization of membrane-associated α -L-fucosidase by the human sperm equatorial segment. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 556-562, 2009.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

VERNET, P.; ROCK, E.; MAZUR, A. *et al.* Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 4, p. 362-370, 1999.

VIARD, I.; WEHRLI, P.; JORNOT, L. *et al.* Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 112, n. 3, p. 290-296, 1999.

VIJAYARAGHAVAN, S.; CRITCHLOW, L. M.; HOSKINS, D. D. Evidence for a role for cellular alkalization in the cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate mediated initiation of motility in bovine caput spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 489-500, 1985.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 39-48, 2003.

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G. D. *et al.* The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 2, p. 242-248, 1998.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.

VISCONTI, P. E.; NING, X.; FORNÉS, M. W. *et al.* Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **Developmental Biology**, v. 214, p. 429-443, 1999.

VOGLER, C. J.; BAME, J. H.; DEJARNETTE, J. M. *et al.* Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207-1219, 1993.

VOGLMAYR, J. K.; SAWYER JR., R. F.; DACHEUX, J. L. Glycoproteins: a variable factor in surface transformation of ram spermatozoa during epididymal transit. **Biology of Reproduction**, v. 33, n. 1, p. 165-176, 1985.

WAI-SUM, O.; CHEN, H.; CHOW, P. H. Male genital tract antioxidant enzymes—Their ability to preserve sperm DNA integrity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 80-83, 2006.

WAITES, G. M. H.; ORTAVANT, R.; BURE, A. *et al.* Effets précoces d'une brève élévation de la température testiculaire sur la spermatogenèse du bélier. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 8, n. 3, p. 323-331, 1968.

WAKABAYASHI, H.; MATSUMOTO, H.; HASHIMOTO, K. *et al.* Inhibition of iron/ascorbate induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 955-957, 1999.

WALKER, W. H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 2, p. 116-120, 2011.

WATTS, M. J.; DANKERT, J. R.; MORGAN, E. P. Isolation and characterization of a membrane-attack-complex-inhibiting protein present in human serum and other biological fluids. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 2, p. 471-477, 1990.

WAZZAN, W. C.; GWATKIN, R. B. L.; THOMAS JR., A. J. Zona drilling enhances fertilization by mouse caput epididymal sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 27, n. 4, p. 332-336, 1990.

WECHALEKAR, H.; SETCHELL, B. P.; PEIRCE, E. J. *et al.* Whole-body heat exposure induces membrane changes in spermatozoa from the cauda epididymidis of laboratory mice. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, p. 591-598, 2010.

WEST, J. W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. Supplement 2, p. 21-35, 1999.

WETTEMANN, R. P.; DESJARDINS, C. Testicular function in boars exposed to elevated ambient temperature **Biology of Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 235-241, 1979.

WIDLAK, W.; VYDRA, N.; MALUSECKA, E. *et al.* Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes. **Genes to Cells**, v. 12, n. 4, p. 487-499, 2007.

WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K. W. Spermogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls after scrotal insulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, p. 711-716, 1983.

WROBEL, K. H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annals of Anatomy**, v. 177, n. 1, p. 19-32, 1995.

XU, J.; ZHONG, N.; WANG, H. *et al.* The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 9, p. 1231-1241, 2005.

YAMAGUCHI, R.; YAMAGATA, K.; IKAWA, M. *et al.* Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace)- and calmeglin (Clgn)-deficient mice. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 760-766, 2006.

YAMAMOTO, Y.; SHIMAMOTO, K.; SOFIKITIS, N. *et al.* Effects of hypercholesterolaemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. **Human Reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1516-1521, 1999.

YIN, Y.; HAWKINS, K. L.; DEWOLF, W. C. *et al.* Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 159-165, 1997.

YOSHIDA, K.; SATO, Y.; YOSHIKE, M. *et al.* Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, n. 4, p. 391-397, 2003.

YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; YOSHIDA, K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3446-3457, 2008.

YOUNG, K. A.; NELSON, R. J. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. **Reproduction**, v. 122, p. 677-685, 2001.

YUAN, H.; ZHANG, L.; LIU, A. *et al.* Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 299-307, 2006.

YUAN, Y. Y.; CHEN, W. Y.; SHI, Q. X. *et al.* Zona pellucida induces activation of phospholipase A₂ during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 904-913, 2003.

ZALATA, A.; HAFEZ, T.; SCHOONJANS, F. *et al.* The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 761-764, 1996.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N. *et al.* Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 207-216, 1998.

ZHANG, M.; JIANG, M.; BI, Y. *et al.* Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41412, 2012.

ZHOU, C. X.; ZHANG, Y. L.; XIAO, L. *et al.* An epididymis-specific α -defensin is important for the initiation of sperm maturation. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 458-464, 2004.

ZHU, H.; CUI, Y.; XIE, J. *et al.* Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with transient scrotal hyperthermia reveals the potential targets for contraceptive development. **Proteomics**, v. 10, n. 19, p. 3480-3493, 2010.

ZIGO, M.; JONÁKOVÁ, V.; MANÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ, P. Electrophoretic and zymographic characterization of proteins isolated by various extraction methods from ejaculated and capacitated boar sperms. **Electrophoresis**, v. 32, p. 1309-1318, 2011.

ZINI, A.; FISCHER, M. A.; MAK, V. *et al.* Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. **Urological Research**, v. 30, p. 321-323, 2002.

ANEXOS

Tabela 1: Proteínas expressas diferencialmente no plasma seminal de carneiros Morada Nova variedade branca como resultado da insulação escrotal. As proteínas foram separadas por eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massas. Os spots numerados referem-se aos spots mostrados na Figura 8.

Proteína	kDa/pi Teórico	Número de acesso NCBI	Escore da proteína MS/MS	Sequência coberta (%)	Peptídeos	Escore do íon	m/z	z
Ram seminal vesicles 22 KDa protein								
Spot 01	16.9/8.4	219521812	213	35	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	63	764.8248	2
					⁽⁹⁹⁾ CHFPIYR ⁽¹⁰⁶⁾	27	569.7630	2
					⁽¹¹³⁾ CTTEGSAFGLAWCSLTEYFER ⁽¹³³⁾	36	1243.0475	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDR ⁽¹⁴²⁾	47	645.2676	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	42	727.296	2
Spot 03	16.9/8.4	219521812	56	8	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	56	765.3171	2
Spot 06	16.9/8.4	219521812	166	20	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	60	764.8239	2
					⁽⁹⁹⁾ CHFPIYR ⁽¹⁰⁶⁾	26	569.7640	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDR ⁽¹⁴²⁾	44	645.7651	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	36	727.2990	2
Spot 07	16.9/8.4	219521812	170	20	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	63	764.8266	2
					⁽⁹⁹⁾ CHFPIYR ⁽¹⁰⁶⁾	25	569.7634	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDR ⁽¹⁴²⁾	40	727.2977	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	42	727.2977	2
Spot 08	16.9/8.4	219521812	167	15	⁽⁷⁶⁾ EWCSLDEDYVGR ⁽⁸⁷⁾	77	764.8239	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDR ⁽¹⁴²⁾	47	645.7661	2
					⁽¹³⁴⁾ EYAWQYCDRY ⁽¹⁴³⁾	43	727.2971	2
Bodhesin-2								
Spot 01	11.6/6.8	121484235	137	27	⁽¹²⁾ ISSFSWGPK ⁽²¹⁾	80	548.2783	2
					⁽⁸⁷⁾ SSNQPVSPFDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	59	1102.5230	2
Spot 02	11.6/6.8	121484235	190	35	⁽¹²⁾ ISSFSWGPK ⁽²¹⁾	80	548.2727	2

Spot 03	11.6/6.8	121484235	181	35	(22) CTWTILLK ⁽²⁹⁾	33	518.2814	2
					(87) SSNQPVPSPFDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	79	1103.0135	2
					(12) ISSSFSWGPK ⁽²¹⁾	80	548.2781	2
Spot 05	11.6/6.8	121484235	106	17	(22) CTWTILLK ⁽²⁹⁾	24	517.7902	2
					(87) SSNQPVPSPFDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	79	1102.5212	2
					(12) ISSSFSWGPK ⁽²¹⁾	80	548.2698	2
Spot 08	11.6/6.8	121484235	80	9	(22) CTWTILLK ⁽²⁹⁾	26	518.2832	2
Spot 11	11.6/6.8	121484235	189	35	(12) ISSSFSWGPK ⁽²¹⁾	80	548.2799	2
					(12) ISSSFSWGPK ⁽²¹⁾	86	548.2796	2
Spot 22	11.6/6.8	121484235	140	27	(22) CTWTILLK ⁽²⁹⁾	26	518.2841	2
					(87) SSNQPVPSPFDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	79	1102.5153	2
					(12) ISSSFSWGPK ⁽²¹⁾	80	548.2822	2
					(87) SSNQPVPSPFDIFYERPSA ⁽¹⁰⁵⁾	62	1102.5203	2

Serum albumin

Spot 17	69.1/5.8	57164373	42	4	(402) HLVDEPQNLIK ⁽⁴¹²⁾	6	653.3643	2
					(437) KAPQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	42	542.6432	3

Major seminal plasma glycoprotein PSP-I precursor

Spot 02	14.5/8.3	47523176	241	32	(34) LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	81	718.8536	2
					(34) LTDDYGTIFTYKGP ⁽⁴⁸⁾	39	573.6240	3
					(77) EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	70	696.3586	2
Spot 03	14.5/8.3	47523176	194	30	(115) DSGHPASPYEIIFLR ⁽¹²⁹⁾	54	851.4367	2
					(34) LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	101	718.8533	2
					(77) EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	66	696.3594	2
Spot 04	14.5/8.3	47523176	168	30	(115) DSGHPASPYEIIFLR ⁽¹²⁹⁾	28	567.9552	3
					(34) LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	81	718.8536	2
					(77) EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	38	696.3575	2
Spot 07	14.5/8.3	47523176	184	30	(115) DSGHPASPYEIIFLR ⁽¹²⁹⁾	51	567.9573	3
					(34) LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	100	718.8532	2
					(77) EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	39	696.3593	2
Spot 21	14.5/8.3	47523176	220	30	(115) DSGHPASPYEIIFLR ⁽¹²⁹⁾	47	567.9567	3
					(34) LTDDYGTIFTYK ⁽⁴⁵⁾	95	718.8521	2
					(77) EYVEILEGAPGSK ⁽⁸⁹⁾	69	696.3577	2

(115) DSGHPASPYEIIIFLR ⁽¹²⁹⁾	57	567.9566	3
---	----	----------	---

Major seminal plasma glycoprotein PSP-II

Spot 21	14.8/8.9	409260	62	12	(77) EYVEVFDGLLSGPSY GK ⁽⁹³⁾	62	930.4620	2
---------	----------	--------	----	----	---	----	----------	---

Heat shock-related 70 kDa protein 2

Spot 18	69.1/5.3	41386699	466	18	(27) VEIANDQGNR ⁽³⁷⁾	22	614.8182	2
					(38) TTPSYVAFTDTER ⁽⁵⁰⁾	100	744.3560	2
					(114) TFFPEISSMVLTK ⁽¹²⁷⁾	71	822.9182	2
					(161) DAGTITGLNVLR ⁽¹⁷²⁾	61	615.3478	2
					(173) IINEPTAAAIAYGLDK ⁽¹⁸⁸⁾	61	830.4542	2
					(234) STAGDTHLGGEDFDNR ⁽²³⁹⁾	26	564.5776	3
					(300) FEELNADLFR ⁽³⁰⁹⁾	65	627.3148	2
					(327) GQIQEIVLVGGSTR ⁽³⁴⁰⁾	44	728.9121	2
					(457) FDLTGIPPAPR ⁽⁴⁶⁷⁾	24	592.3312	2

Matrix metalloproteinase 2

Spot 13	73.8/5.5	151556868	213	10	(148) AFQVWSDVTPLR ⁽¹⁵⁹⁾	64	709.8776	2
					(244) EYTSCTDTGR ⁽²⁵³⁾	21	595.2436	2
					(298) FQGTSYDSCTTEGR ⁽³¹¹⁾	41	804.8356	2
					(472) QDIVFDGISQIR ⁽⁴⁸³⁾	35	696.3662	2
					(521) IDAVYEDPQEEK ⁽⁵³²⁾	31	718.3350	2
					(581) TYIFAGDK ⁽⁵⁸⁸⁾	24	457.7362	2
Spot 14	73.8/5.5	151556868	518	20	(129) IIGYTPDLDPQTVDDAFAR ⁽¹⁴⁷⁾	68	1054.0251	2
					(148) AFQVWSDVTPLR ⁽¹⁵⁹⁾	66	709.8783	2
					(226) YGNADGEYCK ⁽²³⁵⁾	39	588.7356	2
					(244) EYTSCTDTGR ⁽²⁵³⁾	56	595.2454	2
					(298) FQGTSYDSCTTEGR ⁽³¹¹⁾	72	804.8375	2
					(472) QDIVFDGISQIR ⁽⁴⁸³⁾	38	696.3649	2
					(502) DKPTGPLLVAFWPELPEK ⁽⁵²⁰⁾	35	713.3884	3
					(521) IDAVYEDPQEEK ⁽⁵³²⁾	62	718.3353	2
					(569) VDAAFNWSK ⁽⁵⁷⁷⁾	39	518.7649	2
					(581) TYIFAGDK ⁽⁵⁸⁸⁾	28	457.7364	2
					(598) KMDPGFPK ⁽⁶⁰⁵⁾	23	468.2386	2

Spot 15	73.8/5.5	151556868	347	16	(129) IIGYTPDLDPQTVDDAFAR ⁽¹⁴⁷⁾	58	1054.0259	2	
					(148) AFQVWSDVTPLR ⁽¹⁵⁹⁾	64	709.8763	2	
					(244) EYTSCTDTGR ⁽²⁵³⁾	60	595.2460	2	
					(298) FQGTSYDSCCTEGR ⁽³¹¹⁾	64	804.8368	2	
					(472) QDIVFDGISQIR ⁽⁴⁸³⁾	20	695.8730	2	
					(502) DKPTGPLLVAFWPELPEK ⁽⁵²⁰⁾	24	713.3869	3	
					(521) IDAVYEDPQEEK ⁽⁵³²⁾	31	718.3359	2	
					(581) TYIFAGDK ⁽⁵⁸⁸⁾	32	457.7361	2	
Spot 16	73.8/5.5	151556868	367	17	(129) IIGYTPDLDPQTVDDAFAR ⁽¹⁴⁷⁾	37	1054.0233	2	
					(148) AFQVWSDVTPLR ⁽¹⁵⁹⁾	57	709.8765	2	
					(226) YGNADGEYCK ⁽²³⁵⁾	38	588.7376	2	
					(244) EYTSCTDTGR ⁽²⁵³⁾	52	595.2463	2	
					(298) FQGTSYDSCCTEGR ⁽³¹¹⁾	48	804.8370	2	
					(472) QDIVFDGISQIR ⁽⁴⁸³⁾	34	696.3622	2	
					(502) DKPTGPLLVAFWPELPEK ⁽⁵²⁰⁾	30	713.3866	3	
					(521) IDAVYEDPQEEK ⁽⁵³²⁾	49	718.3350	2	
					(581) TYIFAGDK ⁽⁵⁸⁸⁾	30	457.7365	2	
Heat shock protein 90 beta									
Spot 14	82.4/4.9	126571549	53	1	(179) EDQTEYLEER ⁽¹⁸⁸⁾	56	656.2935	2	
Spot 16	82.4/4.9	126571549	50	1	(179) EDQTEYLEER ⁽¹⁸⁸⁾	50	656.2918	2	
Dipeptidyl peptidase 3									
Spot 16	82/5.0	164420725	64	5	(326) GEFEGFVAMVNK ⁽³²⁷⁾	26	672.3238	2	
					(406) NVSLGNVLAVAYATQR ⁽⁴²¹⁾	20	838.4628	2	
					(704) FLEDGPELEK ⁽⁷¹³⁾	18	588.7960	2	
ZBTB42 protein-like									
Spot 19	69.8/10	296475269	48	1	(115) VATMAPPR ⁽¹²²⁾	31	421.7601	2	
Vacuolar H⁺-ATPase A subunit									
Spot 19	68.3/54	162705	792	32	(45) VGHSELVGEIIR ⁽⁵⁶⁾	63	654.8679	2	
					(143) VGSHTGGDIYGIVNENSLIK ⁽¹⁶³⁾	73	729.3857	3	

(203)	FSMVQVWPVR ⁽²¹²⁾	68	632.8316	2
(221)	LPANHPLLTGQR ⁽²³²⁾	40	439.9113	3
(257)	TVISQSLSK ⁽²⁶⁵⁾	24	481.7818	2
(281)	GNEMSEVLR ⁽²⁸⁹⁾	71	525.7504	2
(290)	DFPELTMEVDGK ⁽³⁰¹⁾	59	698.8193	2
(309)	TALVANTSNPVAAAR ⁽³²³⁾	87	766.4017	2
(339)	DMGYHVSMMADSTSR ⁽³⁵³⁾	55	579.2259	3
(365)	LAEMPADSGYPAYLGAR ⁽³⁸¹⁾	60	899.4313	2
(460)	ALDEYYDK ⁽⁴⁶⁷⁾	34	508.7335	2
(468)	HFTEFVPLR ⁽⁴⁷⁶⁾	44	573.3111	2
(514)	LIKDDFLQQNGYTPYDR ⁽⁵³⁰⁾	18	696.3396	3
(537)	TVGMLSNMIAFYDMAR ⁽⁵⁵²⁾	53	934.4285	2
(565)	ITWSIIR ⁽⁵⁷¹⁾	24	444.7711	2
(572)	EHMGEILYK ⁽⁵⁸⁰⁾	31	568.2792	2

Chain A, Model Of Actin-Fimbrin Abd2 Complex

Spot 20	41.5/5.3	168177284	614	44	(18) AGFAGDDAPR ⁽²⁷⁾	78	488.7301	2
					(50) DSYVGDEAQSK ⁽⁶⁰⁾	47	599.7662	2
					(84) IWHHTFYNELR ⁽⁹⁴⁾	28	505.9206	3
					(95) VAPEEHPVLLTEAPLNPK ⁽¹¹²⁾	26	652.0234	3
					(147) TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR ⁽¹⁷⁶⁾	85	800.6524	4
					(183) DLTDYLMK ⁽¹⁹⁰⁾	30	507.7454	2
					(196) GYSFTTTAER ⁽²⁰⁵⁾	43	566.7679	2
					(238) SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵³⁾	45	895.9517	2
					(291) DLYANTVLSGGTTMYPGIADR ⁽³¹¹⁾	125	1116.0416	2
					(315) EITALAPSTMK ⁽³²⁵⁾	47	589.3118	2
					(328) IIAPPER ⁽³³⁴⁾	42	398.2400	2
					(359) QEYDESGPSIVHR ⁽³⁷¹⁾	27	506.2378	3

Actin, cytoplasmic 1

Spot 21	41.7/5.3	75832054	628	44	(19) AGFAGDDAPR ⁽²⁸⁾	78	488.7299	2
					(29) AVFPSIVGRPR ⁽³⁹⁾	34	599.8576	2
					(51) DSYVGDEAQSK ⁽⁶¹⁾	58	599.7677	2

(96)	VAPEEHPVLLTEAPLNPK ⁽¹¹³⁾	28	652.0238	3
(148)	TTGIVMDSGDGVHTVPIYEGYALPHAILR ⁽¹⁷⁷⁾	74	800.6546	4
(184)	DLTDYLMK ⁽¹⁹¹⁾	32	507.7457	2
(197)	GYSFTTTAER ⁽²⁰⁶⁾	53	566.7681	2
(239)	SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵⁴⁾	47	895.9527	2
(292)	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR ⁽³¹²⁾	82	1116.0428	2
(316)	EITALAPSTMK ⁽³²⁶⁾	45	589.3126	2
(329)	IIAPPER ⁽³³⁵⁾	40	398.2418	2
(360)	QEYDESGPSIVHR ⁽³⁷²⁾	66	506.2377	3

HRPE773-like

Spot 22	17.6/8.5	296473588	101	15	(34) DFQNDITGIR ⁽⁴³⁾	43	589.7901	2
					(44) VFIGPLGLIK ⁽⁵³⁾	29	528.8464	2

Integrin beta-5

Spot 23	87.9/6.0	111183159	36	1	(219) HLLPLTDR ⁽²²⁶⁾	36	482.7255	2
---------	----------	-----------	----	---	---------------------------------	----	----------	---

Protein DJ-1

Spot 24	20/6.8	62751849	211	25	(13) GAEEMETVIPVDVMR ⁽²⁷⁾	57	854.4022	2
					(131) DKMMNGSHYSYSENR ⁽¹⁴⁵⁾	36	617.9110	3
					(133) MMNGSHYSYSENR ⁽¹⁴⁵⁾	31	536.8721	3
					(157) GPGTSFEFALK ⁽¹⁶⁷⁾	53	577.2990	2
					(168) IVEVLVGK ⁽¹⁷⁵⁾	34	428.7790	2

C-reactive protein precursor

Spot 24	25.3/6.4	221136893	104	14	(33) ETENSYVSLK ⁽⁴²⁾	25	585.2897	2
					(77) QQPNEILIFWSK ⁽⁸⁸⁾	62	752.3991	2
					(215) GEVFIKQLW ⁽²²⁴⁾	17	608.8420	2

Tabela 2: Descrição da ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova variedade branca, expressadas diferencialmente em função da insulação escrotal.

Proteína	Ontologia gênica	Descrição da ontologia gênica	ID da ontologia gênica	Banco de dados
Ram seminal vesicles protein 22 kDa	Biological Process			
	Reproduction	fertilization sperm capacitation	GO:0007338 GO:0048240	InterPro EBI-GOA
	Molecular Function			
	Binding	lipid binding	GO:0008289	InterPro
	Chaperone activity	protein folding	GO:0006457	EBI-GOA
	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region	GO:0005615	InterPro
Bodhesin 2	Biological Process			
	Reproduction	fertilization	GO:0007338	InterPro
	Molecular Function			
	Binding	sugar binding	GO:0005529	EBI-GOA
	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region	GO:0005615	InterPro
Serum albumin	Biological Process			
	Transport	localization	GO:0006810	InterPro
	Molecular Function			
	Binding	lipid binding metal ion binding	GO:0008289 GO:0046872	UniProtKB UniProtKB

	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region	GO:0005615	UniProtKB/InterPro
	Biological Process			
	Metabolic process	proteolysis	GO:0006508	UniProtKB/InterPro
Matrix metalloproteinase 2	Molecular Function			
	Catalytic activity	metallopeptidase activity hydrolase activity	GO:0008237 GO:0016787	UniProtKB UniProtKB
	Binding	metal ion binding zinc ion binding	GO:0046872 GO:0008270	UniProtKB UniProtKB
	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region extracellular matrix	GO:0005615 GO:0031012	InterPro InterPro
	Biological Process			
	Metabolic process	proteolysis	GO:0006508	UniProtKB
	Molecular Function			
Dipeptidyl peptidase 3	Catalytic activity	dipeptidyl-peptidase activity hydrolase activity	GO:0008239 GO:0016787	InterPro UniProtKB
	Cellular Component			
	Intracellular	cytoplasm	GO:0005737	InterPro
	Biological Process			
Integrin beta	Interaction with cells Development	cell adhesion developmental process	GO:0007155 GO:0007275	UniProtKB InterPro

	Regulation	integrin-mediated signaling pathway	GO:0007229	UniProtKB
	Molecular Function			
	Binding	receptor activity receptor binding	GO:0004872 GO:0005102	InterPro InterPro
	Cellular Component			
	Membrane	membrane integral to membrane integrin complex	GO:0016020 GO:0016021 GO:0008305	UniProtKB UniProtKB InterPro
	Biological Process			
Major seminal plasma glycoprotein PSP-I	Reproduction	fertilization	GO:0007338	InterPro
	Molecular Function			
	Binding	sugar binding	GO:0005529	EBI-GOA
	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region	GO:0005576	UniProtKB
	Biological Process			
Major seminal plasma glycoprotein PSP-II	Reproduction	fertilization	GO:0007338	InterPro
	Molecular Function			
	Binding	sugar binding	GO:0005529	EBI-GOA
	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region	GO:0005576	UniProtKB
C-reactive protein	Biological Process			
	Regulation	regulation of lipid storage	GO:0010888	ENSEMBL

		regulation of macrophage-derived foam cell differentiation	GO:0010745	ENSEMBL
	Immune system process	Inflammatory response	GO:0006954	ENSEMBL
	Molecular Function			
	Binding	low-density lipoprotein particle binding	GO:0030169	ENSEMBL
	Cellular Component			
	Extracellular	extracellular region	GO:0005576	EBI-GOA
	Biological Process			
	Cellular process	cellular component movement	GO:0006928	UniProtKB
		'de novo' posttranslational protein folding	GO:0051084	Reactome
		adherens junction organization	GO:0034332	Reactome
		blood coagulation	GO:0007596	Reactome
		Protein folding	GO:0006457	Reactome
Actin	Regulation	cell junction assembly	GO:0034329	Reactome
	Response to stimulus	response to calcium ion	GO:0051592	ENSEMBL
	Molecular Function			
	Binding	nucleotide binding	GO:0000166	UniProtKB
		protein binding	GO:0005515	UniProtKB
		protein kinase binding	GO:0019901	ENSEMBL
		nitric-oxide synthase binding	GO:0050998	BHF-UCL
		kinesin binding	GO:0019894	UniProtKB
		ATP binding	GO:0005524	UniProtKB
	Structural molecule	Structure of cytoskeleton	GO:0005200	UniProtKB
	Cellular Component			
	Intracellular	cytoplasm	GO:0005737	UniProtKB
		cytoskeleton	GO:0005856	UniProtKB

	nucleus	GO:0035267	UniProtKB
		GO:0030529	
	protein complex	GO:0043234	ENSEMBL
<hr/>			
	Biological Process		
	Reproduction	fertilization	GO:0007338
	Cellular process	autophagy	GO:0006914
		hydrogen peroxide metabolic process	GO:0042743
	Response to stimulus	cellular response to hydrogen peroxide	GO:0070301
		inflammatory response	GO:0006954
		cellular response to oxidative stress	GO:0034599
		response to stress	GO:0006950
	Interaction with cells	locomotory behavior	GO:0008344
	Regulation	Regulation of dopamine uptake	GO:0051583
		membrane depolarization	GO:0051899
		membrane hyperpolarization	GO:0060081
		negative regulation of cell death	GO:0060548
		negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	GO:2001237
		negative regulation of protein binding	GO:0032091
		positive regulation of oxidative phosphorylation uncoupler activity	GO:2000277
		protein stabilization	GO:0050821
		regulation of androgen receptor signaling pathway	GO:0060765
		regulation of inflammatory response	GO:0050727
		negative regulation of apoptotic process	GO:0043524
	Cellular component	mitochondrion organization	GO:0007005
Protein DJ-1			

	organization			
	Metabolic process	proteolysis	GO:0006508	UniProtKB
	Molecular Function			
	Binding	RNA binding	GO:0003723	UniProtKB
		mRNA binding	GO:0003729	ENSEMBL
	Catalytic activity	hydrolase activity	GO:0016787	UniProtKB
		peptidase activity	GO:0008233	UniProtKB
	Antioxidant activity	peroxidase activity	GO:0004601	UniProtKB
		peroxiredoxin activity	GO:0051920	ENSEMBL
	Chaperone activity	protein homodimerization activity	GO:0042803	UniProtKB
	Cellular Component			
	Intracellular	nucleus	GO:0005634	ENSEMBL
		mitochondrion	GO:0005739	UniProtKB
		cytoplasm	GO:0005737	AgBase
	Biological Process			
	Response to stimulus	response to stress	GO:0006950	UniProtKB
	Molecular Function			
Heat shock-related 70 kDa protein 2	Binding	nucleotide binding	GO:0000166	UniProtKB
		ATP binding	GO:0005524	UniProtKB
	Chaperone activity	protein folding	GO:0006457	EBI-GOA
	Cellular Component			
	Plasma membrane	CatSper channel complex	GO:0036128	UniProtKB
	Biological Process			
Heat shock protein 90 kDa alpha	Response to stimulus	response to stress	GO:0006950	UniProtKB
	Cellular process	protein folding	GO:0006457	InterPro

	Molecular Function				
	Binding	ATP binding		GO:0005524	InterPro
	Chaperone activity	unfolded protein binding		GO:0051082	InterPro
	Cellular Component				
	-	-		-	-
	Biological Process				
	-	-		-	-
	Molecular Function				
HRPE773-like	Binding	mannose binding		GO:0005537	EBI-GOA
	Cellular Component				
	-	-		-	-
