

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**VARIAÇÕES NO PERFIL PROTÉICO E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS A
POTENCIAIS CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO EM
BODES SAANEN CRIADOS NO NORDESTE DO BRASIL**

Ítalo Cordeiro Silva Lima

Zootecnista

FORTALEZA-CE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**VARIAÇÕES NO PERFIL PROTÉICO E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS A
POTENCIAIS CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO EM
BODES SAANEN CRIADOS NO NORDESTE DO BRASIL**

***AUTOR:* ÍTALO CORDEIRO SILVA LIMA**

ORIENTADOR: Prof^o ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE N. MOURA, PhD.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Reprodução Animal.

FORTALEZA-CE

Maio de 2011

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

-
- L698v Lima, Ítalo Cordeiro Silva.
Variações no perfil protéico e atividade antioxidante do plasma seminal associadas a potenciais condições de estresse térmico em bodes Saanen criados no Nordeste do Brasil / Ítalo Cordeiro Silva Lima. – 2011.
84 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Reprodução Animal.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura.
Coorientação: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo.
1. Bioclimatologia. 2. Stress oxidativo. 3. Proteômica. 4. Caprino. 5. Reprodução animal. I. Título.
-
- CDD 636.08

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de
Catalogação e classificação da Biblioteca Central
da UFC**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

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

ÍTALO CORDEIRO SILVA LIMA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM _____/_____/2011

Prof. PhD. ARLINDO DE ALENCAR ARARIPE N. MOURA

ORIENTADOR

Prof. Dr. AIRTON ALENCAR DE ARAÚJO

CO-ORIENTADOR (UECE)

Profº Dr. MARCELO BERTOLINI

CONSELHEIRO (UNIFOR)

Dr. CARLOS EDUARDO AZEVEDO SOUZA
CONSELHEIRO (UFC)

Dra. CLAUDIA ROBERTA DE ANDRADE
CONSELHEIRA (UFC)

EPÍGRAFE

O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário "Albert Einstein"

Aos meus queridos pais Joaquim Neto e Marilene Cordeiro, e aos meus irmãos Nívea Maria e Clodomir Neto pelo amor, apoio, incentivo e dedicação a mim dispensados em todos os momentos da minha vida.

A minha noiva Luana Fiuza, pelo carinho, dedicação, paciência, compreensão nos momentos de ausência, incentivo, e muito mais, não sendo possível descrever em palavras o quanto és importante pra mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pela oportunidade de viver e ser fonte de inspiração, além de iluminar meus caminhos e minhas decisões durante toda a minha trajetória de vida acadêmica.

A todos de minha família (avô, avós, tios e primos) que diretamente ou indiretamente ajudaram e ajudam nesta longa caminhada.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e da minha formação acadêmica. Em especial:

À Universidade Federal do Ceará – UFC, através do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso de mestrado e pelos conhecimentos que me foram proporcionados ao longo deste período.

Ao meu orientador Prof. Arlindo Alencar Araripe Moura, pela orientação, colaboração para minha formação profissional, apoio na execução dos meus experimentos e por todos os conselhos profissionais.

Ao Prof. Dr. José Tadeu de Oliveira e toda equipe do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (Departamento de Bioquímica – UFC), em especial aos amigos Hélio Filho e Darcy Mayra, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e apoio durante a execução do experimento.

Ao Prof. e Co-orientador Airton Alencar e a D^{ra}. Gorete Sales por terem disponibilizado as amostras de plasma seminal dos caprinos para realização da análise proteômica que foi o carro chefe deste trabalho, minha gratidão eterna.

Ao Prof. Dr. Magno Candido, pela oportunidade e credibilidade na realização do experimento extra, envolvendo nutrição proteica e reprodução de ovinos, mostrando que as minhas ideias experimentais são possíveis, bem como aos integrantes do Núcleo de Ensino e Estudos em Forragicultura (NEEF) que auxiliaram na condução do experimento.

A banca examinadora composta pelos pesquisadores Airton Alencar, Carlos Eduardo, Claudia Andrade e Marcelo Bertolini pela troca de experiência, discussões e valiosas sugestões na correção do presente trabalho.

À professora Ana Claudia N. Campos pelo apoio e ensinamentos técnico-científicos fornecidos durante toda minha jornada acadêmica.

Aos meus amigos Erika Bezerra, Rodrigo Oliveira, Ana Gláudia, Revia Granja, Gyselle Aguiar e Carla Renata, pelo apoio em todos os momentos, pelo companheirismo e amizade.

À toda equipe da Reprodução Animal (Lab. de Fisiologia), Mauricio van Tilburg (Carioca), Jorge Martins (Sr. Jorge), Carlos Eduardo, Carlos Lobo, Claudia Andrade, David Rocha, Marco Antonio, Alethéia Souza, João Paulo, Veronica Cadavid, pelo ajuda, troca de experiência e os momentos de descontração.

À toda equipe do Lab. 1085 (Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa) da UFC, Fredy, Vladimir, Johnatan, Alexandra, Davi, Pedro Filho, pela troca de conhecimento, ajuda, conversas e momentos de descontração.

A todos os amigos do curso de Pós-graduação em Zootecnia, em especial ao Igo Renan, Michelle Moura, João Jose, Danilo Camilo, Josy Arruda, Felipe Silveira, Rildson Fontenelle, Marcos Goes, Jeane Pereira, Gabriel Bandeira, Marco Antonio, Emanuel Limaverde.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo financiamento.

Aos tantos professores que tive na UFC, dentre os quais destaco os professores do Departamento de Zootecnia UFC, por toda a contribuição durante toda a minha formação profissional.

Meus sinceros agradecimentos!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros seminais em caprinos da raça Saanen criados na região do Nordeste do Brasil, em diferentes períodos do ano.....	47
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eficiência dos processos de dissipação de calor..... 26
- Figura 2.** Valores climatológicos médios de precipitação (mm/ano), umidade relativa do ar (%) e 40
temperaturas mensais (°C) ao longo do ano experimental (SALES, 2010).....
- Figura 3.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Saanen. A figura a 49
esquerda representa o mapa de referência, do qual o gel sintético foi primeiramente gerado, e a figura a
direita representa o gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado na combinação
dos *spots* de todos os membros utilizados no estudo.....
- Figura 4.** Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de bodes Saanen. A figura 4A 50
representa o gel master gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado no pareamento
de todos os géis utilizado no estudo. As proteínas foram coradas com Comassie blue coloidal.
“Spots” marcados com as setas referem-se àqueles cujas intensidades diferiram ($p < 0,05$) entre os
períodos do ano. A figura 4B corresponde à imagem do gel de referência.....
- Figura 5.** Intensidades dos “spots” protéicos que diferiram ($p < 0,05$) entre os períodos do ano. Os 51
números dos “spots” referem-se àqueles identificados no máster gel do plasma seminal, como
demonstrado na Figura 4.....
- Figura 6.** Proteoma do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos (RÊGO et al., 2010) 52
- Figura 7.** Comparação entre o mapa protéico do plasma seminal de caprinos da raça Saanen (à 53
esquerda) e proteínas do plasma seminal de ovinos da raça Santa Inês adultos (RÊGO et al.,
2011).....
- Figura 8.** Atividade enzimática da superóxido-dismutase (SOD; 1.15.1.1) e Catalase (CAT; EC 54
1.11.1.6) no plasma seminal de bodes da raça Saanen criados no Nordeste do Brasil ao longo do
ano.....

LISTA DE ABREVIÇÕES

μg - micrograma

μL – microlitro

μm - micrometro

μM - micromolar

μmol – micromoles

2D – eletroforese bidimensional

AMT – alterações morfológicas totais

aSFP - acidic seminal fluid protein

CAT - catalase

CHAPS - 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato.

CONC – concentração espermática

DTT – Ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

g – gravidade

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

H_2O_2 . Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

IAA – Iodoacetamida

IPG – “Immobilized pH gradient”

kDa - quiloDalton

M - molar

mA - miliAmpere

mgP – miligramas de proteína

min - minutos

MIP – motilidade individual progressiva

mL – mililitro

mM - milimolar

mm/ano – milímetros por ano

MS/MS - espectrometria de massas acoplada

NBT - Nitro Azul de Tetrazólio

ng - nanograma

nm - nanómetro

° C - graus Celsius

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PEM – porcentagem de espermatozóides moveis

pI – Ponto isoelétrico

ppm - partes por milhão

PS – plasma seminal

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SDS/PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SOD - Superóxido Dismutase

TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

Tris - 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

TURB – turbilhamento

UA - unidade de atividade

UPLC - cromatografia líquida de ultra-alta pressão

V – Volt

VE – volume do ejaculado

W – Watts

Resumo

As proteínas do plasma seminal participam da regulação de diversos processos associados à fisiologia reprodutiva. Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo avaliar as variações do perfil protéico e determinar se ocorrem mudanças na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no plasma seminal de caprinos Saanen criados em clima tropical, em diferentes períodos do ano. Amostras de sêmen de oito caprinos Saanen foram coletadas ao longo de 12 meses e o plasma seminal foi obtido através de centrifugação e submetido à eletroforese bidimensional. Os géis foram corados com Coomassie coloidal, digitalizados e analisados por meio do aplicativo PDQuest. A atividade antioxidante da CAT e da SOD também foi determinada no plasma seminal. Avaliou-se as variações ao longo do ano no perfil protéico e atividade enzimática antioxidante através de delineamento em blocos casualizados. Diferenças significativas foram observadas com relação às intensidades de 34 “spots” dos mapas protéicos entre os períodos do ano. Dentre desses “spots”, verificou-se maior número de “spots” que diferiram entre os períodos seco e chuvoso, num total de 19 “spots”. A expressão de “spots” protéicos com valores de kDa e pI equivalente ao das proteínas “heat-shock protein” 70 kDa, glutamato carboxipeptidase e arilsulfatase A foi maior no período seco em comparação ao chuvoso, enquanto que a clusterina apresentou maior intensidade no período chuvoso. A atividade enzimática da SOD foi maior no plasma seminal ($p < 0,05$) no período de transição chuvoso-seco em comparação com o período chuvoso. Verificou-se também menor atividade da CAT no período chuvoso quando comparado ao período seco. Considerando o conjunto de resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que as características seminais, perfil protéico e atividade de enzimas antioxidantes do plasma seminal de caprinos Saanen criados em clima tropical variam ao longo do ano, sendo

registrada a maior intensidade das proteínas do plasma seminal e atividade da catalase no período de maior temperatura ambiente (transição seco-chuvoso e seco), coincidente com reduções na qualidade seminal.

ABSTRACT

Seminal plasma proteins are involved in the regulation of different mechanisms associated with reproductive physiology. Thus, the present study was designed to investigate the protein profile and determine variations on catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) antioxidant activity on seminal plasma from Saanen goats raised under tropical conditions, in different periods of the year. Semen from eight goats was collected along 12 months (during dry and wet seasons and transition periods), seminal plasma was obtained through by centrifugation and submitted to 2-D electrophoresis, as well as analyses of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) antioxidant activity. Gels were stained with colloidal Coomassie blue, scanned and analyzed using tools of the PDQuest software. Data were analyzed using randomized block designs to evaluate possible variations in the protein profile and antioxidant activity. Intensity of 34 spots of protein maps was significantly different among periods of the year. From these 34 spots, 19 spots were different between the dry and rainy periods. The expression of protein spots with values of kDa and pI similar to heat-shock protein (70 kDa), glutamate carboxypeptidase and arylsulfatase A proteins was higher during the dry period in comparison to rainy season, while the clusterin showed more intensity in the rainy period. The SOD antioxidant activity was higher in the seminal plasma ($p < 0.05$) during the rainy/dry transition in comparison to rainy period. Also, CAT activity was lower in the rainy when compared to dry period. Considering the results obtained in the present study, we conclude that protein profile and antioxidant activity in the seminal plasma from Saanen goat breed raised under tropical conditions varies throughout the year, given that we observed more intensity of seminal plasma proteins and CAT activity in the period with

higher environmental temperatures (dry/rainy transition and dry), coincident with decrease in the semen quality.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Caprinos da raça Saanen.....	20
2.2 Estacionalidade reprodutiva.....	21
2.3 Homeotermia e termorregulação.....	23
2.4 Estresse térmico e seu efeito sobre a reprodução de machos.....	27
2.5 Proteínas do plasma seminal e sua relação com a função espermática.....	30
2.5.1 Proteínas envolvidas com a proteção espermática.....	32
2.5.2 Proteínas associadas com a motilidade espermática.....	33
2.5.3 Proteínas que participam da capacitação espermática.....	34
2.5.4 Proteínas que participam da reação acrossômica e interação entre gametas.....	35
2.6 Estresse oxidativo.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais experimentais.....	39
3.2 Eletroforese bidimensional do plasma seminal.....	41
3.3 Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais.....	42
3.4 Determinação da atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase.....	43
3.5 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Parâmetros seminais.....	46
4.2 Proteínas do plasma seminal.....	47
4.3 Atividade antioxidante da superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT).....	54
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1- INTRODUÇÃO

Na região do Nordeste do Brasil, o clima é caracterizado por apresentar substanciais variações temporais e espaciais da precipitação pluviométrica, e elevadas temperaturas ao longo do ano (AZEVEDO et al., 1998). Nesta região, trabalhos têm atribuído alterações no desempenho reprodutivo de caprinos às mudanças climáticas, uma vez que, nos trópicos, o fotoperíodo não é fator limitante para a reprodução (LEBOEUF et al., 2000; NUNES, 1988).

A exposição a elevadas temperaturas altera o mecanismo de termorregulação testicular devido ao aumento da temperatura na superfície do escroto (KASTELIC et al., 1999), causando danos nas células germinativas, resultando em falhas na espermatogênese devido a degeneração do epitélio germinativo gonadal (SETCHELL et al., 1971; KASTELIC et al. 1997) e reduções nos parâmetros quantitativos e qualitativos do sêmen (MOREIRA et al., 2001). Além disso, em condição de estresse térmico escrotal promove também um quadro de hipóxia testicular e estresse oxidativo, resultante de uma redução na tensão de oxigênio abaixo da requerida para a função normal celular nesse tecido (PAUL et al., 2009). Isso pode ser dar em resposta ao fluxo sanguíneo inadequado no tecido ou redução na capacidade de transporte de oxigênio (HOCKEL & VAUPEL, 2001). Sob condições de estresse térmico, o estresse oxidativo pode desempenhar um papel fundamental na indução de apoptose das células germinativas testiculares (IKEDA et al., 1999).

Dentre os fatores que podem influenciar a fertilidade, o plasma seminal dos mamíferos é uma complexa secreção, composta pelos fluidos das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos, que serve como veículo durante a ejaculação e sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino (MOURA et al., 2007).

Além disso, o plasma seminal contém uma variedade de constituintes moleculares, alguns dos quais são relativamente específicos para o mecanismo de regulação da função do espermatozóide (STREZEZEK et al., 1992). As proteínas seminais participam de diversos processos associados à fertilidade do macho, que incluem motilidade (ELZANATY et al., 2002), integridade do DNA (CHEN et al., 2002), proteção das células contra choque térmico, reações oxidativas e imunológicas (MUIÑO-BLANCO et al., 2008), capacitação espermática e reação acrossômica (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002), e interação com o oviduto e fecundação do oócito (RIFFO & PÁRRAGA, 1997; YUAN et al., 2003; GWATHMEY et al., 2003).

Portanto, dados estes atributos das proteínas seminais, coloca-se a hipótese de que as variações na qualidade espermática de bodes Saanen observadas no Nordeste do Brasil podem estar relacionadas, em parte, com a expressão de proteínas e atividade enzimática antioxidante no plasma seminal. Para testar essa hipótese, o presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil protéico e atividade enzimática antioxidante da catalase e da superóxido dismutase no plasma seminal de caprinos Saanen criados em clima tropical, durante épocas distintas do ano.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Raça Saanen

A caprinocultura leiteira vem ganhando impulsos e incentivos nos últimos anos pelo potencial que representa, podendo ser considerada um instrumento eficaz de promoção de desenvolvimento da zona semi-árida no Nordeste brasileiro (QUEIROGA et al., 2006). No entanto, o leite de cabra e seus derivados ainda são pouco consumidos no Brasil, principalmente pela falta de esclarecimento sobre a qualidade dos produtos e reduzido mercado (NOGUEIRA FILHO et al., 2010).

A região Nordeste do Brasil possui quase a totalidade do plantel de caprinos do país (92,6%). Entretanto, responde por menos de 45% da produção nacional de leite (NOGUEIRA FILHO et al., 2010). Dentre os fatores que contribuem para a baixa eficiência produtiva e reprodutiva observadas nos caprinos no Nordeste, destacam-se os baixos investimentos e níveis tecnológicos utilizados, em termos de alimentação, infraestrutura, manejo sanitário e reprodutivo. No sistema de produção de leite, a raça Saanen destaca-se como uma das raças mais utilizadas para produção e melhoramento genético do rebanho de caprinos leiteiros. A cabra Saanen é originária da Suíça, do Vale de Saanen, sul do Cantão de Berna e Appenzell, região de clima temperado onde as temperaturas médias anuais não ultrapassam 9,5°C. Os animais Saanen apresentam pelame branco, bem assentado, espesso, comprido e pouco denso (AIURA et al., 2010). Este grupo genético vem sendo amplamente explorado nos países europeus e Estados Unidos, entre outros, em virtude da elevada produção leiteira e persistência da lactação, características que contribuem para uma maior abrangência desta raça (EMBRAPA, 2011). No entanto, em condições de clima tropical, a raça Saanen não possui desempenho similar aos verificado

nos países de clima temperado e esta diferença deve-se principalmente às condições climáticas marcantes entre o ambiente temperado e tropical (OLIVEIRA, 2007).

2.2. Estacionalidade reprodutiva

Em regiões de clima temperado (latitudes superiores a 35°), a estacionalidade reprodutiva em pequenos ruminantes é condicionada pelo fotoperíodo, ou seja, pelo número diário de horas de luz (CHEMINEAU et al., 1991). A ausência da atividade reprodutiva em determinadas épocas do ano é o resultado de uma alteração da secreção de GnRH induzida por diversos sistemas neuronais inibitórios no hipotálamo, via alterações no padrão de secreção de melatonina pela glândula pineal durante a fase escura do ciclo claro e escuro (NAGY et al., 2000). Do ponto de vista reprodutivo, os caprinos são denominados como espécies de dias curtos, por apresentarem maior eficiência reprodutiva em razão da diminuição da duração do dia.

Entretanto, em regiões de Nordeste brasileiro, e em clima tropical (latitudes inferiores a 25°), os caprinos se reproduzem ao longo do ano, sendo considerados como poliéstricos contínuos, uma vez que o fotoperíodo não sofre grandes variações durante o ano (NUNES, 1988). Contudo, estudos demonstraram decréscimo nos parâmetros seminais de caprinos em determinados períodos do ano, e estas variações estacionais foram atribuídas às mudanças nas condições climáticas, as quais resultam em alterações na disponibilidade e qualidade do alimento (NUNES, 1988; VIEIRA et al., 2008), e condições de desconforto térmico (SILVA et al., 2001).

Estudos conduzidos em diversas regiões do Nordeste brasileiro constataram que nos períodos mais quentes do ano (período seco) ocorreu decréscimo na qualidade seminal dos caprinos, tais como volume do ejaculado (SILVA & NUNES, 1998; SOUZA et al., 2009;

VIEIRA et al., 2008), turbilhonamento (VIEIRA et al., 2008; AGUIAR, 2008) concentração espermática (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2005), percentagem de espermatozóides vivos (SILVA & NUNES, 1998; VIEIRA et al., 2008), vigor (VIEIRA et al., 2008) e morfologia (SILVA & NUNES, 1998; AGUIAR, 2008). Além disso, estudos demonstraram também que os caprinos da raça Boer nascidos na estação chuvosa atingiram a puberdade mais precocemente em comparação aos nascidos no período seco (BEZERRA et al., 2009). Outros resultados também demonstram a ocorrência de reduções nos parâmetros reprodutivos de machos caprinos, tais como a circunferência escrotal (FREITAS & NUNES, 1992) e peso testicular (CAMPOS et al., 2003), entre o período chuvoso e seco, com maiores valores no período seco.

Diversos autores têm atribuído a mudança nos parâmetros reprodutivos de machos caprinos de diferentes grupos genéticos ao longo do ano ao efeito nutricional onde, no período seco predomina a baixa disponibilidade de forragens de boa qualidade (SILVA & NUNES, 1998; CAMPOS et al.; 2003; VIEIRA et al., 2008). Contudo, quando a alimentação foi uniforme ao longo do ano, os resultados demonstraram que ainda ocorrem reduções nos parâmetros reprodutivos no período de maior temperatura ambiente (SILVA et al., 2005; AGUIAR, 2008), indicando, portanto, que aspectos fundamentais da fisiologia reprodutiva dos animais são influenciados por condições de estresse térmico naquela região do Brasil. Neste contexto, em animais criados extensivamente, efeitos da estacionalidade podem ser confundidos com o estresse nutricional, que aliado ao estresse térmico determina efeitos drásticos sobre a reprodução (FATET et al., 2011).

Portanto, como consequência das alterações na qualidade seminal dos reprodutores, a fertilidade pode estar comprometida neste período. Além disso, a magnitude do efeito das

condições climáticas dos diferentes períodos do ano sobre os parâmetros seminais dos caprinos sob condições de clima tropical pode sofrer influência da raça, conformação escrotal e do manejo alimentar (SILVA & NUNES, 1998; VIEIRA et al., 2008). Vieira et al. (2008), avaliando a influência da conformação escrotal sobre as características seminais de caprinos Sem Padrão Racial Definido criados no Estado do Piauí nas épocas chuvosa e seca, constataram que os animais com maior grau de bipartição escrotal (escroto com divisão maior que 50% do comprimento testicular) apresentaram qualidade espermática superior no período seco em comparação aos demais grupos analisados (ausência de bipartição e escroto com divisão menor que 50%). Os autores associaram estas diferenças, possivelmente, a uma maior ventilação testicular, principalmente no período seco, quando se requer maior esforço dos animais para minimizar o estresse causado por temperaturas elevadas.

Nesse sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar a compreensão dos mecanismos que afetam a qualidade seminal em decorrência das alterações estacionais, fato que limita a utilização de biotecnologias da reprodução, tais como inseminação artificial e congelamento de sêmen, além de reduzir a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho.

2.3. Homeotermia e termorregulação

A evolução dos animais homeotérmicos permitiu o controle da temperatura corporal em ambientes frios, independentemente do ambiente térmico externo, mas exigiu o desenvolvimento de estratégias de perda de calor em ambientes quentes (ROBERTSHAW, 2006). Para manutenção da homeotermia, a integração dos elementos envolvidos na sua regulação torna-se essencial, tais como, os sensores térmicos (receptores

cutâneos térmicos e unidades termossensíveis no sistema nervoso central - SNC) que mediam a percepção da temperatura, o centro integrador e de comando (hipotálamo) e os sistemas eferentes (SILANIKOVE, 2000; TSIGOS & CHROUSOS, 2002).

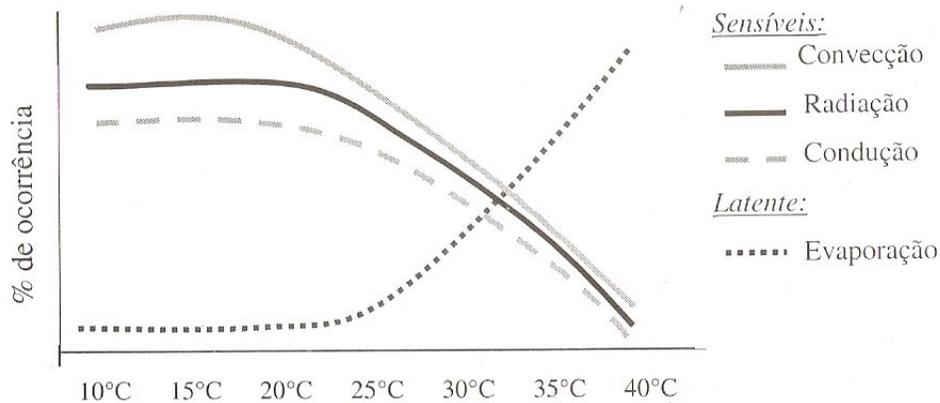
Muitas condições são capazes de causar variações normais na temperatura corporal profunda de animais homeotérmicos, tais como a idade, o sexo, as estações do ano, hora e temperatura do dia, exercício, alimentação, digestão e ingestão de água (DUKES & SWENSON, 1996). Nesse sentido, os animais homeotérmicos, quando expostos à temperatura ambiente acima da zona de termoneutralidade ou zona de conforto térmico, acionam os mecanismos termorregulatórios na tentativa de compensar o ganho de calor por um equivalente de perda e manter sua temperatura corporal (FUQUAY, 1981).

O conceito de zona de termoneutralidade é um meio conveniente para descrever a interrelação entre o animal e seu ambiente (SILANIKOVE, 2000). A zona de termoneutralidade corresponde aos limites de temperatura em que o animal não necessita mobilizar os recursos termorreguladores para se ajustar às condições ambientais, uma vez que o custo fisiológico é mínimo e o balanço térmico é nulo (PEREIRA, 2005), sendo específico para cada espécie, raça ou categoria de animais (NARDONE et al., 2006). De modo geral, a carga térmica presente no organismo de animais vertebrados, principalmente nos homeotérmicos, é oriunda dos processos de termogênese que incluem os processos metabólicos basal, o comportamento do indivíduo, “status” fisiológico e produtivo, acrescido da absorção da radiação de ondas curtas e longas provenientes do meio ambiente, bem como a energia que fica estocada (SILVA, 2000a). No que se refere o fluxo de calor dissipado para o ambiente (termólise), este ocorre através de dois mecanismos termorregulatórios, tais como o sensível (radiação, condução e convecção) e o insensível (mecanismos evaporativos).

A radiação é o processo de transferência de energia de um corpo a outro, através de ondas eletromagnéticas. Já a condução é a transferência de calor através da energia cinética das moléculas, ou seja, é a passagem de calor desde o núcleo central do organismo até a periferia do animal pelo contato entre as partículas dos tecidos, sendo necessário um contato direto entre as moléculas dos corpos envolvidos, enquanto que a convecção ocorre quando uma corrente de fluido líquido ou gasoso, absorve energia térmica em um dado local e que então se desloca para outro local, onde se mistura com o fluido e para elas transfere a energia térmica (FERREIRA, 2005; SILVA, 2000b).

A magnitude da perda de calor sensível via condução e convecção depende da área superficial por unidade de peso corporal, da condutância de calor do núcleo do corpo para a pele e da pele para o ar circundante, e principalmente da existência de gradiente de temperatura entre o animal e o ar (HANSEN, 2004; FERREIRA, 2005 - Figura 1). Portanto, em ambiente de clima tropical, onde a temperatura do ar tende a ser próxima ou superior à temperatura corporal dos ruminantes, a eficiência de dissipação de calor para o ambiente é reduzida, podendo até ocorrer ganho de calor, pois depende do gradiente térmico (SILVA, 2000a). Para temperaturas elevadas, Hofmeyer et al. (1969) citados por Starling et al. (2002), verificaram que o calor dissipado através dos mecanismos evaporativos é mais eficaz, uma vez que nestas condições ambientais, a evaporação respiratória era responsável por cerca de 70% da evaporação total, sendo assim, 30% ocorria por evaporação cutânea. Desta forma, a perda de calor por evaporação da água é uma importante estratégia fisiológica, disponível pelo animal no controle da manutenção da temperatura corporal, em detrimento das cargas térmicas variáveis, seja pelo trato respiratório ou pela ativação das glândulas sudoríparas (CENA & MONTEITH, 1975).

Nas regiões temperadas, a temperatura do ar é quase sempre bem mais baixa que a corporal e a temperatura média radiante raramente ultrapassa a temperatura do ar, além do fato da radiação solar de ondas curtas ser muito menor que àquela em latitudes mais baixas (SILVA, 2000a).



Fonte: FERREIRA (2005).

Figura 1. Eficiência dos processos de dissipação de calor

Em reprodutores com os testículos localizados fora da cavidade abdominal, mecanismos termorregulatórios são acionados quando ocorre elevação na temperatura ambiente, na tentativa de manter a temperatura intratesticular entre 2 e 6°C abaixo da temperatura corporal profunda, para que haja o funcionamento normal da espermatogênese e da esteroidogênese (KASTELIC et al., 1996). Diversos mecanismos termorregulatórios locais contribuem para a termorregulação escroto-testicular, que incluem o músculo cremáster externo, túnica muscular de dartos, cone vascular (plexo pampiniforme e artéria testicular) e glândulas sudoríparas (HAFEZ, 2004).

O calor produzido no testículo é perdido para o ambiente através da pele escrotal por meio dos mecanismos evaporativos, principalmente via glândulas sudoríparas (HAFEZ,

2004), Além disso, os testículos são resfriados principalmente por troca contracorrente (sangue arterial “quente” entra em direção ao testículo e o sangue “frio” é drenado dos testículos para cavidade abdominal) de calor entre o sangue venoso e arterial do cordão espermático (WAITES & MOULE, 1961; HANSEN, 2009), ou seja, à medida que a artéria testicular penetra no parênquima testicular ocorre perda de temperatura por diminuição da pressão sanguínea e por convecção, devido à diferença de temperatura entre os fluidos sanguíneos (KASTELIC et al., 1997). Isso ocorre porque as veias testiculares circundam as ramificações arteriais, as quais irão auxiliar na queda da temperatura (FERNANDES & SOUZA, 2009).

O grau de arrefecimento está sob controle de dois músculos: a túnica dartos no escroto, que regula a área superficial escrotal, e o músculo cremaster, que permite a movimentação dos testículos em relação ao corpo (HANSEN, 2009). Em ruminantes, o músculo cremáster está envolvido no movimento do escroto de acordo com a temperatura ambiente.

2.4. Estresse térmico e seu efeito sobre a reprodução de machos

Existem diversas definições na literatura sobre o termo estresse. Em geral, estresse é definido como a soma de respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos externos (estressores) e que permitem ao indivíduo superar determinadas exigências do meio-ambiente e o desgaste físico e mental causado por esse processo. (DOBSON & SMITH, 2000) quando o mesmo percebe uma ameaça à sua homeostase (MOBERG, 2000). Portanto, o estresse térmico é definido como o ambiente térmico que atua desencadeando o aumento na temperatura corporal profunda acima da temperatura de termoneutralidade (HANSEN, 2009). Desta forma, o estresse térmico é resultado de um

balanço negativo entre a quantidade de carga térmica produzida dentro do corpo do animal, proveniente do metabolismo e do ganho de calor através da radiação de ondas curtas (SILVA, 2000a) e da quantidade líquida de energia dissipada do animal para o seu ambiente (AENGWANICH et al., 2010), através dos mecanismos termorregulatórios.

Sob condição de estresse térmico, diversas alterações comportamentais e fisiológicas podem ser verificadas nos animais homeotérmicos, tais como, diminuição na ingestão de alimentos, aumento no consumo de água, distúrbios nos metabolismos de proteínas, de energia, da água e no balanço mineral, mudanças na secreção hormonal e metabólitos sanguíneos, bem como redução na capacidade de produção e reprodução (FUQUAY, 1981; MARAI et al., 2007). Inúmeros estudos demonstraram que, sob condição de estresse térmico existem alterações em parâmetros fisiológicos, tais como frequência respiratória e cardíaca, temperatura retal e superficial da pele e taxa de sudação, na tentativa de manter a temperatura corporal profunda constante (SRIKANDAKUMAR et al., 2003; MARAI et al., 2007; PEREIRA et al., 2008).

Contudo, o impacto da carga térmica sobre o desempenho produtivo, reprodutivo e bem-estar animal depende da combinação de elementos climáticos (temperatura, umidade do ar e radiação solar), características do animal (genética, cor e presença de pigmentação do pelame, tamanho, “status” fisiológico) e mecanismos termorreguladores (condução, convecção, radiação e evaporação). Além disso, o efeito do estresse térmico é agravado quando o ambiente apresenta uma elevada temperatura associada à alta umidade do ar, uma vez que a perda de calor insensível (dissipação evaporativa) é regulada pela umidade, tornando-se o mecanismo comprometido sob tais condições (PEREIRA, 2005; SURIYASOMBOON et al., 2006).

No tocante aos mecanismos regulatórios da percepção do aumento da temperatura, sabe-se que o sistema nervoso central é sensível a mudanças na temperatura ambiente, constituindo-se em uma estrutura importante na regulação dos ritmos circadianos e estacional de muitas funções fisiológicas, particularmente a função reprodutiva e produtiva (MARAI et al., 2007). Segundo Hansen (2009) e Setchell (2006), o estresse térmico pode levar a alterações nos processos reprodutivos através do efeito sistêmico e do efeito direto no testículo. No que refere ao efeito sistêmico, mudanças homeocinéticas para regular a temperatura corporal podem comprometer a função reprodutiva, como por exemplo, a redistribuição do fluxo sanguíneo do núcleo do corpo para a periferia, na tentativa de aumentar a perda de calor sensível, e a redução do consumo de alimento durante o estresse térmico, a fim de reduzir a produção de calor metabólico, conseqüentemente levando a mudanças no equilíbrio de energia e disponibilidade de nutrientes que podem ter grandes efeitos sobre a ciclicidade, gestação, desenvolvimento fetal e espermatogênese.

A exposição a elevadas temperaturas altera o mecanismo de termorregulação testicular, em conseqüência do aumento da temperatura da superfície do escroto (KASTELIC et al., 1999), causando danos nas células germinativas, o qual resulta em falhas na espermatogênese, degeneração do epitélio germinativo gonadal (SETCHELL et al., 1971; KASTELIC et al., 1997) e reduções na qualidade espermática (MOREIRA et al., 2001). Além disso, a condição de estresse térmico promove também um quadro de hipóxia testicular, uma vez que a hipóxia ocorre quando a tensão de oxigênio é reduzida abaixo da requerida para a função normal celular em um tecido específico. Esse efeito é possivelmente uma resposta ao fluxo sanguíneo inadequado no tecido ou redução na capacidade de transporte de oxigênio (HOCKEL & VAUPEL, 2001).

Neste contexto de resposta hormonal em consequência do estresse térmico, o hipotálamo estimula a liberação do fator liberador da corticotropina que age sobre a hipófise anterior para liberar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH estimula o córtex adrenal a produzir glicocorticóides, principalmente cortisol (SILANIKOVE, 2000). A secreção de cortisol estimula ajustes fisiológicos, incluindo de uma ação hiperglicêmica, que permitem a um animal maior tolerância ao estresse causado por um ambiente quente (CHRISTISON & JOHNSON, 1972). Além disso, na fase aguda do estresse térmico ocorre redução na concentração dos hormônios tireoidianos livres (triiodotironina-T3 e tiroxina - T4) na tentativa de redução da produção de calor metabólico (YOUSELF et al., 1967; SALEM et al., 1991). No que se refere ao perfil de testosterona em animais em condições de estresse térmico, os relatos na literatura são controversos, com estudos que referem efeitos negativos da elevada temperatura sobre a secreção de testosterona (GOMES et al., 1971; SIDIBE et al., 1992), enquanto outros estudos demonstraram que o nível plasmático de testosterona pode estar aumentado apenas na fase inicial do estresse agudo (RIVIER & RIVEST, 1991; WINGFIELD & SAPOLSKY, 2003). Segundo Rasooli et al. (2010), as diferenças verificadas na literatura sobre alterações no perfil de testosterona após a exposição ao calor podem estar relacionadas ao tipo de exposição ao calor podendo ser crônica ou aguda.

2.5. Proteínas do plasma seminal e sua relação com a função espermática

O plasma seminal (PS) dos ruminantes é uma complexa secreção composta pelos fluidos dos distintos componentes do trato reprodutor masculino, como testículos e epidídimos, bem como, as glândulas sexuais acessórias (ampolas, glândulas vesiculares, próstata e bulbo-uretrais) (EVANS & MAXWELL, 1990; MOURA et al., 2007). Este fluido

funciona como um meio nutritivo e tamponante para os espermatozóides (MANN, 1946; MAXWELL & JOHNSON, 1999). Além disso, o PS contém uma variedade de constituintes moleculares que incluem aminoácidos livres, açúcares, ácido cítrico, minerais, prostaglandinas, nucleotídeos e proteínas (SHIVAJI et al., 1990) alguns dos quais são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função espermática (STREZEZEK et al., 1992).

As proteínas do plasma seminal são provenientes majoritariamente do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias, as quais interagem com componentes da membrana espermática e participam de diversos mecanismos regulatórios associados à função espermática e outros aspectos da fertilidade do macho (OLLERO et al., 1997; MOURA et al., 2007). Tais mecanismos incluem proteção das células espermáticas, motilidade, capacitação espermática, reação acrossômica, interação entre gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário (MOURA et al., 2010a), além de prevenir e reverter danos na membrana espermática induzidas pelo choque térmico (BARRIOS et al., 2000; PÉREZ-PÉ et al., 2001).

A composição protéica do PS dos ruminantes varia entre espécies e estações do ano (PÉREZ-PÉ et al., 2001; CARDOZO et al., 2006; TEXEIRA et al., 2009). No que se refere a mudanças das proteínas do PS de ovinos da raça Rasa Aragonesa nas diferentes épocas do ano em clima temperado, CARDOZO et al. (2006) demonstraram que treze “spots” protéicos apresentaram variações significativas, decrescendo no verão (época não reprodutiva) em comparação ao final do ano (época reprodutiva). Os mesmos autores verificaram que a intensidade de 2 “spots” (15,9 kDa; pI 5,6 e 16,1 kDa; pI 6,5) foram

superiores no período de maio a dezembro, apresentando correlação negativa com a viabilidade espermática e concentração.

2.5.1. Proteínas envolvidas com a proteção espermática

No que se refere às proteínas do PS que estão associadas à proteção das células espermáticas, estas influenciam diretamente ou indiretamente os mecanismos envolvidos na prevenção contra os danos causados pelo estresse oxidativo e ataque imunológico aos espermatozoides (MOURA et al., 2007). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação através de sistemas antioxidantes (DE LAMIRANDE et al., 1997). Estudos demonstraram que diversas enzimas antioxidantes, tais como glutathione S-transferase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase são secretadas em regiões específicas no epidídimo, com o intuito de eliminar as ROS (FOUCHÉCOURT et al., 2000; DACHEUX et al., 2006). As proteínas lactoferrina, albumina e aSFP (*acidic seminal fluid protein*) também participam na proteção dos espermatozoides contra os danos oxidativos (SCHONECK et al., 1996).

A lactoferrina se liga ao ferro iônico (WAKABAYASHI et al., 1999), resultando em redução indireta nos níveis de ROS, uma vez que este íon está envolvido na geração de ROS através da decomposição de peróxidos em radicais peróxilas e alcoolxilas, os quais desencadeiam a peroxidação lipídica (BIEMOND et al., 1984; OCHSENDORF, 1999), onde também participa como agente antimicrobiano e na regulação da expressão gênica (FURMANSKI, 1995; NOZAKI et al., 2002; DACHEUX et al., 2005). A albumina também está envolvida na proteção à peroxidação lipídica através a absorção de peróxido de lipídeos, além de contribuir com efeito protetor, tanto na membrana, quanto na motilidade espermática (ALVAREZ & STOREY, 1995). Outra proteína com funções

protetoras aos espermatozóides é a aSFP, por meio da capacidade de preservar a integridade de membrana, agindo como um redutor de peroxidação lipídica (SCHÖNECK et al., 1996). A clusterina é uma glicoproteína com múltiplas funções. No tocante à função protetora, a clusterina pode agir como uma chaperona, associando e solubilizando proteínas parcialmente desestruturadas, reduzindo a citotoxicidade da precipitação protéica induzida por estresses celulares (HUMPHREYS et al., 1999).

As proteínas do plasma seminal são adsorvidas na superfície do espermatozóide de carneiro, e esta adsorção é capaz de prevenir e a reverter as alterações das membranas espermáticas que foram induzidas pelo choque térmico e melhorar a viabilidade e fertilidade de espermatozóides após a descongelação (PÉREZ-PÉ et al., 2001). Estudos conduzidos por Barrios et al. (2005) demonstraram que duas proteínas do PS de aproximadamente 14 kDa (P14) e 20 kDa (P20) foram as responsáveis por esse efeito protetor.

2.5.2. Proteínas associadas com a motilidade espermática

O plasma seminal possui diversos componentes capazes de afetar a motilidade espermática (BAAS et al., 1983). Em bovinos e ovinos o sistema enzimático conhecido como Calicreína-Cininas estimula a motilidade espermática (BRATANOV et al., 1978) por meio da ação das cininas, produto final da interação da enzima calicreína com cininogênio presente no PS (FINK et al., 1990). Essa carboxipeptidase promove a formação da angiotensina II, que se liga aos receptores presentes na peça intermediária e principal dos espermatozóides, intensificando assim a motilidade espermática (VINSON et al., 1996). A aSFP possui também efeito reversível inibitório sobre a motilidade, quando em altas concentrações. Entretanto, quando em baixas concentrações, possui efeito estimulante.

Assim, os espermatozoides armazenados na ampola apresentam demanda energética reduzida aumentando sua viabilidade e, quando o sêmen é diluído nas secreções do trato reprodutor da fêmea, ocorre o restabelecimento da cinética espermática (SCHONECK et al., 1996).

2.5.3. Proteínas que participam da capacitação espermática

A capacitação espermática é um processo complexo, onde os espermatozoides adquirem o potencial fertilizante após o contato com os fluidos das glândulas sexuais acessórias (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002), envolvendo alterações bioquímicas e estruturais da membrana, que incluem a perda de componentes adsorvidos, alterações em sua composição lipídica e maior permeabilidade a íons (VISCONTI & KOPF, 1998). Inicialmente, este processo consiste na desestabilização da membrana plasmática, em consequência da remoção de fosfolipídios e colesterol, resultando em redução na proporção colesterol:fosfolipídios (THÉRIEN et al., 1998; THÉRIEN et al., 1999), bem como o aumento da permeabilidade e fluidez, desencadeando o influxo de cálcio (CROSS, 1998). Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a família das proteínas ligadoras de fosfolipídios secretadas pelas glândulas vesiculares e ampolas seminais desencadeiam o início da capacitação espermática, através da interação com fosfolipídios contendo colina, denominadas de BSPs (Binder of Sperm Proteins) (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002; MANJUNATH et al., 2009). Além disso, essas proteínas formam sítios de ligação à heparina e HDL (lipoproteína de alta densidade) na membrana espermática os quais, de forma independente, completariam o processo de capacitação espermática (THÉRIEN et al., 1995; THÉRIEN et al., 1997). Posteriormente, ao atingirem o oviduto, essas proteínas auxiliam na interação entre os espermatozoides e o epitélio do oviduto (GWATHMEY et

al., 2003, 2006), bem como formam sítios de ligação para a heparina e HDL na membrana espermática (THÉRIEN et al., 1995, 1997), os quais, de forma independente, completariam o processo de capacitação espermática.

2.5.4. Proteínas que participam da reação acrossômica e interação entre gametas

Algumas enzimas do plasma seminal estão envolvidas na reação acrossômica, dentre elas destaca-se as fosfolipases A2 (PLA2), enzimas que variam de 14 a 20 kDa, encontradas em fluidos corporais (DENNIS, 1994). No trato reprodutivo, a PLA2 regula a maturação espermática e a reação acrossômica, convertendo fosfolipídios em lisolipídios, como a lisolecitina (UPRETI et al., 1999), levando à vesiculação (fusão múltipla da membrana acrossomal externa com a membrana espermática adjacente) e liberação de uma variedade de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, principalmente a acrosina e a hialuronidase, que potencializa penetração do espermatozóide na zona pelúcida do oócito, etapa esta caracterizada como reação acrossômica (MANJUNATH et al., 1989; YANAGIMACHI, 1994).

A capacidade de ligação dos espermatozoides à zona pelúcida e fertilização (AMANN & HAMMERSTEDT, 1993). Esta propriedade desenvolve-se como produto de aquisição de novas proteínas do fluido epididimal (COOPER et al., 1986) ou modificação de proteínas já existentes (BAKER et al., 2005; DACHEUX et al., 2006), criando sítios de ligação para estruturas oocitárias ou expondo sítios já existentes (SULLIVAN et al., 2005). Algumas proteínas do plasma seminal estão envolvidas na interação entre gametas, dentre elas destaca-se a osteopontina (OPN) que se liga à membrana espermática por meio das integrinas presentes nessa estrutura, e esse complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D'CRUZ, 1996; REDDY et al., 2003;; SOUZA et al.,

2008). Além disso, a OPN também se liga ao receptor CD44, que está presente tanto na membrana espermática (BAINS et al., 2002) quanto na oocitária (SCHOENFELDER & EINSPANIER, 2003), estando envolvido na adesão celular (CICHY & PURÉ, 2003).

2.6. Estresse oxidativo

Em condições de normalidade do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos como: os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^*) e hidroxila (OH^*), e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2); (NORDBERG & ARNÉR, 2001). No entanto, quando o nível de ROS sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante do corpo, ocorre o estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2005). Portanto, o estresse oxidativo é definido com um desequilíbrio entre sistemas de defesa antioxidante e a produção de ROS (DE LAMIRANDE et al., 1997), neste caso, a função normal espermática pode estar comprometida (AITKEN, 1995; BAUMBER et al., 2002). Entretanto, níveis basais de ROS, incluindo o anion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, podem induzir mudanças positivas na função espermática, incluindo hiperativação, capacitação e reação acrossômica que são necessários para o sucesso da fertilização (GRIVEAU et al., 1994; DE LAMIRANDE et al., 1998; O'FLAHERTY et al., 2005).

Devido à alta percentagem de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática, o espermatozóide é susceptível aos danos induzidos pelas ROS (AITKEN et al., 1996). Além disso, os espermatozoides descartam grande parte do citoplasma nos estágios finais da espermatogênese, e, em consequência, ocorre uma diminuição das enzimas antioxidantes, aumentando assim, a susceptibilidade da célula espermática ao

ataque das ROS (GUERRA et al., 2004). As ROS desencadeiam reações químicas denominadas de peroxidação lipídica (AGARWAL et al., 2005). A peroxidação das cadeias laterais desses ácidos graxos poliinsaturados pode causar redução na fluidez da membrana espermática e, portanto, comprometer a habilidade fertilizante dos espermatozóides (JONES & MANN, 1977; BECONI et al., 1991). Contudo, a peroxidação lipídica moderada é necessária para maximizar o potencial fertilizante dos espermatozóides pela hiperativação, motilidade, capacitação e sua ligação com a zona pelúcida (GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996). Além disso, devido à alta reatividade das ROS, diversos danos sobre as células espermáticas e moléculas são relatados, tais como oxidação de proteínas (SHARMA & AGARWAL, 1996), além de comprometer a motilidade espermática e espermatozóides morfologicamente normais (CHRISTOVA et al., 2004).

O espermatozóide e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular que reduzem as ROS a níveis fisiológicos, a fim de evitar danos à função espermática (ALKAN et al., 1997; GRIVEAU et al., 1997). As principais enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal que estão relacionadas à eliminação de ROS são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR). Estudo recente verificou que a atividade das principais enzimas antioxidantes foi maior na estação não reprodutiva, sendo que nesta estação os valores apresentaram valores menores de viabilidade e motilidade espermática (MARTI et al., 2007).

A SOD e a CAT são as principais enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal dos mamíferos, e protegem o espermatozóide contra os danos causados pelo ROS (ROSSI et al., 2001). Essas enzimas participam da primeira linha de defesa contra o ROS, uma vez

que a SOD catalisa a dismutação do anion superóxido (O_2^-) à H_2O_2 e oxigênio, enquanto a CAT catalisa a degradação do H_2O_2 a oxigênio e água (NORDBERG & ARNÉR, 2001). As SODs (SOD; EC 1.15.1.1) são metaloenzimas ubíquas de 16 kDa (LIU et al., 2002). Em mamíferos, três isoformas da SOD, no citoplasma (Cu/Zn-SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD), têm sido descritas com base na sua localização celular, composição metal no sítio de ação e sensibilidade a inibidores (PEEKER et al., 1997; MRUK et al., 2002). No entanto, dois subtipos de SOD contendo zinco e cobre (Cu/Zn-SOD) tem sido distinguidas: Cu/Zn-SOD dímera citosólica e Cu/Zn-SOD secretada extracelularmente que está presente no plasma seminal (MATÉS, 2000). A catalase, outra enzima antioxidante, apresenta um único transcrito de mRNA no testículo, epidídimo, vaso deferente e próstata (ZINI & SCHLEGEL, 1996). Essa enzima de 240 kDa, tem sido identificada em muito tecidos de mamíferos e geralmente são localizadas em organelas subcelulares chamadas de peroxissomos (DE DUVE & BAUDHUIN, 1996) e fluidos extracelulares, como o plasma seminal (MARTI et al., 2007).

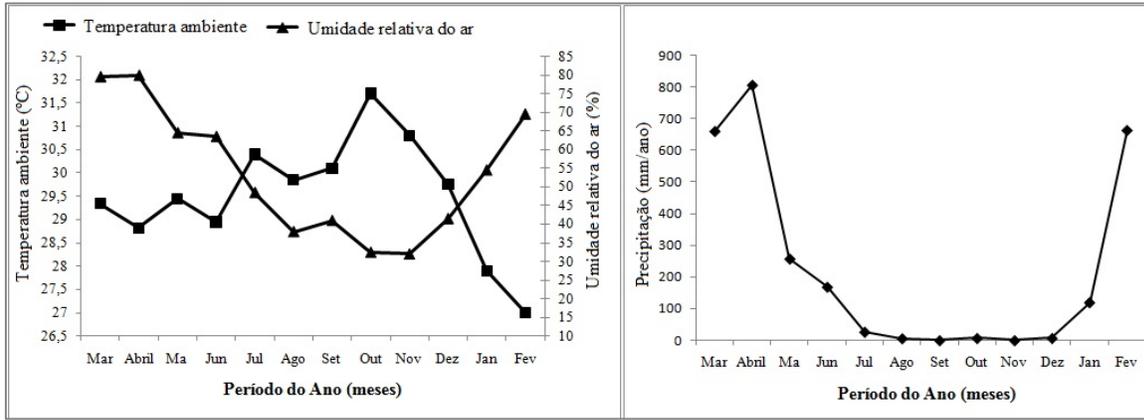
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estratégia experimental

Amostras de sêmen foram coletadas de oito bodes da raça Saanen sexualmente maduros, puros por cruza, com peso médio de $67,1 \pm 14,2$ kg e idade média de $3,4 \pm 1,9$ anos, a intervalos semanais, durante o ano de 2008, utilizando vagina artificial. Os reprodutores foram criados sob condições de confinamento e alimentados uniformemente ao longo do período experimental, segundo NRC (1981) para caprinos, o que permitiu apresentarem adequada condição corporal e fertilidade comprovada por monta natural. A ração experimental continha 22% de proteína bruta no concentrado, acrescido de 3% de bicarbonato de sódio e volumoso composto de forragem verde de capim elefante (*Penisetum purpureum Schum*) e 30% de leucena (*Leucaena leucocephala*). O experimento foi conduzido a latitude de $3^{\circ}53'49,9''$ Sul, longitude de $38^{\circ}34'32,5''$ Oeste e altitude de 69 m acima do nível do mar. O clima foi caracterizado como seco e úmido de acordo com Koeppen.

Para determinação do período do ano, tomou-se como base os dados meteorológicos médios de precipitação (mm/ano), umidade relativa do ar (%) e temperaturas mensais (°C) do ano, aferidos por Salles (2010; Figura 2). Os meses do ano foram divididos em: época de transição seca-chuvosa (TS/C) – dezembro e janeiro; época chuvosa – fevereiro, março, abril, maio; época de transição chuvosa-seca (TC/S) – junho, julho; e época seca – agosto, setembro, outubro, novembro (Figura 2).

Figura 2. Valores climatológicos médios de precipitação (mm/ano), umidade relativa do ar (%) e temperaturas do ar (°C) ao longo do ano experimental.



Após a coleta, uma alíquota de 50 μ L de sêmen foi diluída (1:100) em solução formol-salina para determinação da concentração espermática (CONC) através da contagem em câmara *de Neubauer* (EVANS & MAXWELL, 1987). O sêmen foi levado ao banho-maria (37°C) e avaliado quanto à motilidade individual progressiva (MIP), segundo Colas (1980), onde adotou-se uma pontuação de 0–5, onde zero correspondente à ausência de espermatozóides móveis e cinco à máxima movimentação progressiva. A percentagem de espermatozóides móveis (PEM) foi avaliada segundo método descrito anteriormente (SOUZA et al., 2010). A percentagem de alterações morfológicas totais (AMT) no ejaculado foi determinada após esfregaço corado com a azul de bromofenol (MEDEIROS et al., 2006), de acordo com a classificação de Colas (1980) e constituíram o somatório de todas as alterações da morfologia encontradas nos espermatozóides.

3.2. Eletroforese bidimensional do plasma seminal

Para obtenção do plasma seminal, amostras de sêmen foram centrifugadas a 500 x g / 15 min (4°C), e o sobrenadante, centrifugado novamente (10000 x g / 30 min/4°C), aliquoteado em microtubos e conservado a – 20°C para posterior análise. O plasma obtido de animais nos meses selecionados para eletroforese bidimensional (Janeiro - TS/C; março e abril - Chuvosa; junho - TC/S; setembro e outubro - Seco) foi descongelado à temperatura ambiente e a concentração total de proteínas solúveis foi determinada por meio de kit comercial, utilizando-se albumina bovina como padrão (Bio-Rad, Rockville), de acordo com o método de Bradford. (1976). Para eletroforese, seguiu-se o protocolo já descrito anteriormente (SOUZA et al., 2010; REGO et al., 2011), com modificações. Em resumo, um volume contendo 400 µg de proteínas solúveis de cada amostra de plasma seminal foi ressuspenso em tampão de reidratação (7 M Uréia; 2 M Tiouréia; 1% CHAPS; 1% IPG buffer 4-7; 65 mM DTT; traços de azul de bromofenol) em quantidade suficiente para completar 250 µL, conforme recomendações do fabricante (GE Healthcare, USA), e incubado com tiras de pH imobilizado (IPG de 13 cm, com faixa de pH linear de 4 a 7, GE Healthcare, USA), nas ranhuras da bandeja de hidratação (“Immobile DryStrip Reswelling Tray”) por um período de 14 a 20 h, em temperatura ambiente. A focalização isoeletrica foi conduzida em equipamento ETTANTM IPGphor III (GE Lifesciences, USA) de acordo com a seguinte programação: step 100 V (1:00 h), step 500V (2:00 h), grad 1000 V (1:00 h), step 5000V (2:00 h), grad 10000 V (0:30 h) e step 10000 V (40000 Vh). Após a focalização as tiras foram equilibradas por 15 min em solução de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 M; 87% glicerol; 6 M Uréia; 2% SDS; traço de azul de bromofenol) + DTT 1%, sob leve agitação. Em seguida, foram incubadas na mesma solução de equilíbrio, contendo 2,5% IAA, ao invés de DTT, por mais 15 minutos, sob leve agitação. Após a

etapa de equilíbrio, as tiras foram imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (15%), seguindo a seguinte programação: 20 mA (15 min) e 30 mA (4 h 30 min/ para cada gel).

Após a separação com base na massa molecular aparente, os géis foram corados com Coomassie coloidal (CANDIANO et al., 2004), com modificações (REGO et al., 2011). Desta forma, os géis foram fixados em solução contendo ácido fosfórico (2%) e álcool etílico (30%) por um período de 12 a 20 h (“overnight”); seguido de lavagens em três tempos de 20 min em ácido fosfórico (2%), e em seguida colocados em uma solução com ácido fosfórico (2 %), álcool etílico (18%) e sulfato de amônia (15%) por um período de 30 min. Após este período, foi adicionada a esta solução, uma proporção de 2% de solução contendo Coomassie Coloidal. O corante permaneceu em contato com os géis cerca de 72 h. Após este período, a solução contendo o corante foi desprezada, e os géis lavados com água destilada até retirar o excesso de corante. Em seguida, os géis foram digitalizados em uma resolução de 300 dpi e as imagens salvas no formato *.tiff*, em equipamento do tipo ImageScanner II (GE Healthcare, USA), para posterior análise computacional.

3.3. Análise dos mapas eletroforéticos bidimensionais

As imagens digitalizadas dos géis foram analisadas utilizando-se o programa PDQuest versão 8.0 (Bio Rad, USA). As análises dos géis consistiram de duas etapas: a edição de imagens e a detecção de “spots”. Inicialmente, o processo de edição de imagens consistiu na padronização e filtração das imagens dos géis. Cada imagem representativa do gel foi delimitada para 170,6 mm de largura e 165,4 mm de altura através da ferramenta de corte. Em seguida, realizou-se a filtragem das imagens para eliminar os possíveis artefatos, segundo recomendações de Silva (2011), cujas opções de filtros utilizados foram referentes

às opções “Salt”, utilizado para retirar manchas mais claras que o *background*, “Pepper” para retirada de manchas mais escuras que o gel e o filtro de 9x9 pixels.

Para os grupos de mapas protéicos referentes às amostras dos meses considerados no ano, um único gel que melhor representa o perfil protéico entre todos os géis foi escolhido, e denominado de gel de referência (Figura 4A). Com base neste gel, utilizou-se o aplicativo do PDQuest de criação automática de um único gel padrão sintético, denominando de *master gel* (Figura 4B). O *master gel* foi utilizado como molde para realização do *Match* automático e, em seguida, foram adicionados “spots” consistentemente presentes nas imagens dos géis ao gel sintético, de modo que pudessem ser comparados em todos os géis. “Spots” presentes nas principais regiões do gel foram usados como marco e o ajuste final dos “spots” foi obtido após extensivas comparações entre os mesmos em cada gel individual (MOURA et al., 2006). A quantificação dos “spots” nos géis foi realizada através total da densidade óptica integrada dos “spots” em todos os géis e expressa em partes por milhão (ppm), fornecida pelo aplicativo do PDQuest.

3.4. Determinação da atividade enzimática da catalase e superóxido dismutase

A atividade da catalase foi mensurada pelo método proposto por Havir & McHale (1987) e modificado por Peixoto et al. (1999). A atividade enzimática da CAT foi determinada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm, durante 3 min, devido à redução do H₂O₂ em H₂O e O₂ em presença da catalase; $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. A solução de reação consistiu de 75 mM de tampão de fosfato (pH 7,0), 112,5 mM de H₂O₂ e 10 µL de plasma seminal. A atividade foi estimada pelo coeficiente de absorptividade molar de 36 M⁻¹ (ANDERSON et al., 1995) e expressa em µmol de H₂O₂ consumido por mg proteína total solúveis da amostra (BRADFORD, 1976).

A atividade da SOD foi determinada pelo método proposto por Van Rossum et al. (1997), adaptado para ser realizado em microplacas, contendo 96 poços. Para cada poço da microplaca foi incubada inicialmente em uma mistura reacional que consistiu de tampão fosfato de potássio 1 M (pH 7,8), EDTA 1 mM, Triton X-100 0,25%, L-Metionina 130 mM e 40 μ L de plasma seminal, todos devidamente protegidos da luminosidade e, em seguida, foram adicionados os reagentes, Nitro Azul de Tetrazólio (NBT) 0,75 mM e riboflavina 1 mM. Após a adição, a atividade da SOD foi determinada pelo decréscimo da absorvância a 630 nm, em leitora de ELISA (Bio-Tek, USA), após 5 min de repouso. Após a etapa no escuro, a microplaca foi transferida para uma câmara com luz fluorescente de 40 W, a intervalos de 1 min de exposição, onde, em cada intervalo realizou-se leitura da absorvância. A atividade da SOD foi determinada de acordo com a capacidade da enzima em inibir a produção da formazana azul. Uma unidade de atividade (1 UA) foi definida como a quantidade da amostra necessária para inibir 50% da fotorredução (em relação ao controle positivo) do NBT à formazana azul. Sendo expresso em unidade de atividade por mg de proteína total solúveis da amostra (BRADFORD, 1976).

3.5. Análise estatística

A intensidade de todos os “spots” foi submetida aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, de Assimetria e de Curtose por meio do procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do pacote estatístico SAS (2002). Os valores de intensidade dos “spots” que apresentaram distribuição normal foram considerados variáveis paramétricas e os valores que não apresentaram tal distribuição foram submetidos à transformação logarítmica ($\log(x + 1)$). Destas variáveis transformadas, as que apresentaram uma aproximação da distribuição normal também foram consideradas

paramétricas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal, mesmo após a transformação, foram consideradas não paramétricas. A influência do período do ano sobre as proteínas do plasma seminal foi avaliada em um delineamento em blocos casualizados. As variáveis paramétricas foram avaliadas pela análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS e tiveram as médias comparadas pelos testes t de Student e SNK, segundo seu coeficiente de variação (SAMPAIO, 2002). As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 2002), por meio do procedimento NPAR1WAY do SAS.

Avaliou-se a influência dos períodos do ano sobre a atividade enzimática antioxidante do plasma seminal através de um delineamento em blocos casualizados, através do modelo GLM do Programa estatístico SAS (2002). Os dados foram comparados pelo teste de Tukey, utilizando uma matriz de probabilidade de comparação dois a dois, com probabilidade de 5% de erro.

4. Resultados

4.1. Parâmetros seminais

Diferenças significativas entre os períodos do ano ($p < 0,05$) foram observadas para os parâmetros de porcentagem de espermatozóides móveis, concentração espermática e alterações morfológicas totais. Enquanto que o turbilhonamento e a motilidade individual progressivo não diferiu entre os períodos do ano (Tabela 1). A porcentagem de espermatozóides móveis foi superior nos período chuvoso e de transição chuvoso-seco ($54,0 \pm 4,2$; $50,0 \pm 5,8$; respectivamente) em comparação aos períodos seco e de transição seco-chuvoso ($30,0 \pm 4,5$; $33,0 \pm 3,3$; respectivamente).

O volume do ejaculado no período seco ($1,5 \pm 0,1$ mL) diferiu significativamente dos períodos de transição, sendo superior ao volume do período de transição chuvoso-seco ($1,3 \pm 0,1$ mL) e inferior ao do período de transição seco-chuvoso ($1,9 \pm 0,1$ mL). Entre os períodos de transição constatou-se diferença entre si, sendo maior transição seco-chuvoso ($1,9 \pm 0,1$) em comparação ao chuvoso-seco ($1,3 \pm 0,1$ mL). Contudo, o volume do ejaculo no período chuvoso não diferiu dos demais períodos do ano. No período chuvoso ($2,3 \pm 0,1 \times 10^9$ /mL) observaram-se maior concentração espermática em comparação aos demais períodos do ano ($p < 0,05$). Contudo, verificou-se menor incidência de alterações morfológicas nos períodos, chuvoso e de transições (seco-chuvoso e chuvoso-seco) quando comparado ao período seco.

Tabela 1. Parâmetros seminais em caprinos da raça Saanen criados na região do Nordeste do Brasil, em diferentes períodos do ano.

Parâmetros	Transição Seco-Chuvoso	Chuvoso	Transição Chuvoso-Seco	Seco
VE (mL)	1,9 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^{ab}	1,3 ± 0,1 ^{bc}	1,5 ± 0,1 ^{bd}
TURB (0-5)	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,4	3,1 ± 1,1
MIP (0-5)	3,7 ± 0,9	3,7 ± 0,9	3,9 ± 1,0	3,31 ± 1,1
PEM (%)	33,0 ± 3,3 ^a	54,0 ± 4,2 ^b	50,0 ± 5,8 ^b	30,0 ± 4,5 ^a
CONC (10 ⁶)	1,6 ± 0,1 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,2 ^b	1,9 ± 0,1 ^b
AMT (%)	33,0 ± 2,2 ^a	31,0 ± 3,8 ^a	36,0 ± 4,2 ^a	45,0 ± 3,6 ^b

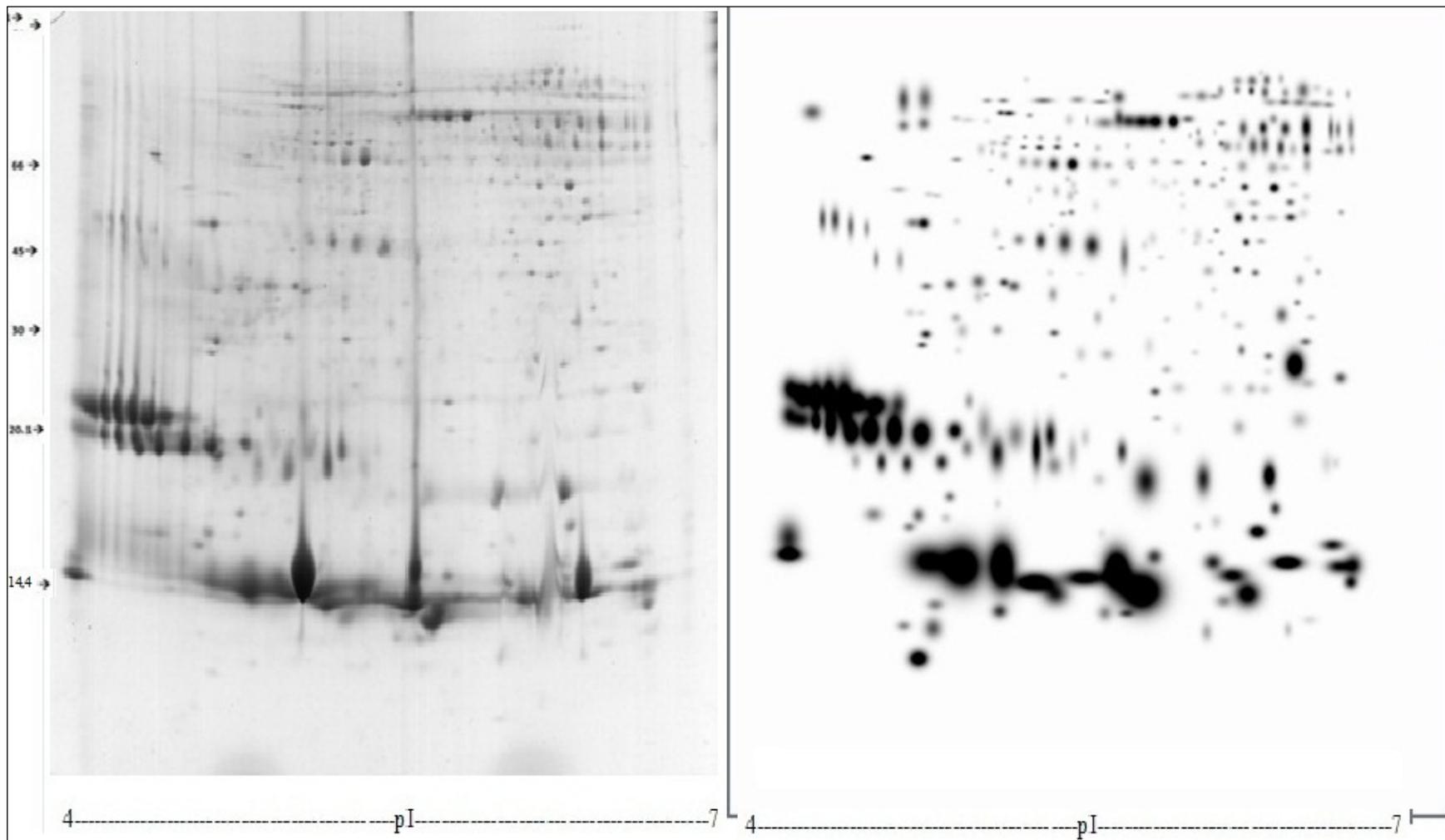
Letras diferentes mostram diferenças significativas entre os períodos do ano ($p < 0,05$). VE: volume do ejaculado; TURB: turbilhonamento; MIP: motilidade individual progressiva; PEM: porcentagem de espermatozoides móveis; CONC: concentração espermática; AMT: alterações morfológicas totais.

4.2. Proteínas do plasma seminal

O perfil protéico representativo das proteínas seminais do plasma seminal de caprinos Saanen é demonstrado na figura 3. Verificou-se que a maior frequência relativa do número de spots estão presente na faixa de pI entre 5 a 6 (45%) e Mr entre 50 a 80 kDa (49,8%), seguido da faixa de pI 6 a 7 (28,6%) e Mr 10 a 30 kDa (27,0%), e da faixa de pI 4 a 5 (26,4%) e Mr 30 a 50 kDa (23,2%). Foram detectados, em média, $184,7 \pm 8,2$, $161,5 \pm 9,4$, $180,3 \pm 6,6$ e $180,9 \pm 13,0$ “spots” por gel no período de transição seca-chuvosa (TS/C), período chuvoso, período de transição chuvoso-seco (TC/S) e período seco, respectivamente. No entanto, tais diferenças no número total de “spots” por gel não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) e também não se verificou a presença de nenhum spot específico a qualquer período do ano. O número de “spots” máximo e mínimos detectados por períodos foram 206 e 161 “spots” no período de transição seco/chuvoso, 227 e 113 “spots” no período chuvoso, 196 e 156 “spots” no período de transição chuvoso/seco e 278 e 113 “spots” no período seco. Um total de 56, 37, 68, 38 “spots” foi detectado de forma consistente em todos os géis por período do ano pareados pelo aplicativo PDQuest®, no período de transição seca-chuvosa (TS/C), período chuvoso, período de transição chuvoso-seco (TC/S) e período seco, respectivamente.

No entanto, alterações significativas ($p < 0,05$) foram observadas com relação às intensidades de trinta e quatro “spots” dos mapas protéicos (Figura 4A). Dentre esses “spots”, verificou-se maior número de “spots” que diferiram entre os períodos seco e chuvoso, e a intensidade de 14 desses “spots” foi duas vezes maior no período seco em comparação ao chuvoso (Figura 5). Ao se comparar a estação seca com os demais períodos do ano, constatou-se que dezessete “spots” diferiram entre o período de transição seco-chuvoso (S303, S3203, S3405, S3604, S3703, S4601, S4603, S4605, S4606, S4608, S4704, S5002, S5105, S7202, S7501, S8401, S9001), enquanto doze “spots” diferiram entre o período de transição chuvoso-seco (S303, S2004, S4601, S4603, S4605, S4608, S4704, S5002, S5105, S5805, S7501, S9702). Já no período chuvoso, verificou-se que dez e onze “spots” diferiram ($p < 0,05$) entre o período de transição chuvoso-seco (S507, S2004, S3202, S3604, S4004, S4605, S5105, S7202, S7502, S7201) e o período de transição seco-chuvoso (S507, S1213, S1214, S1215, S2411, S3403, S4004, S4605, S5105, S5705, S5805), respectivamente. Entre os períodos de transição constatou-se que dez “spots” diferiram entre si (S1006, S1215, S2004, S3202, S3203, S3604, S3605, S5805, S7202, S8401, S9001).

Figura 3. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Saanen. A figura a esquerda representa o mapa de referência, do qual o gel sintético foi primeiramente gerado, e a figura a direita representa o gel sintético gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado na combinação dos *spots* de todos os membros utilizados no estudo.



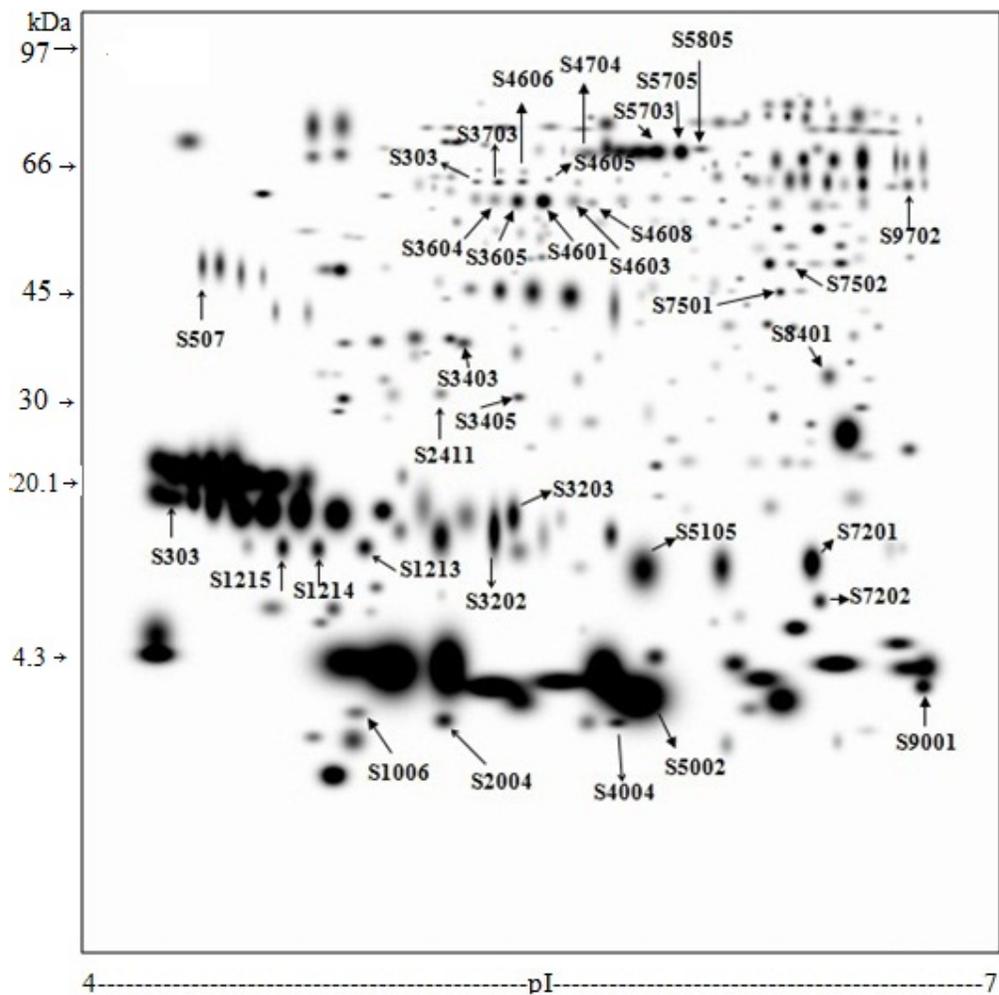


Figura 4. Mapa bidimensional das proteínas do plasma seminal de bodes Saanen. A figura 4 representa o gel master gerado pelo aplicativo PDQuest (Bio Rad, USA), baseado no pareamento de todos os géis utilizado no estudo. As proteínas foram coradas com Comassie blue coloidal. “Spots” marcados com as setas referem-se aqueles cujas intensidades diferiram ($p < 0,05$) entre os períodos do ano.

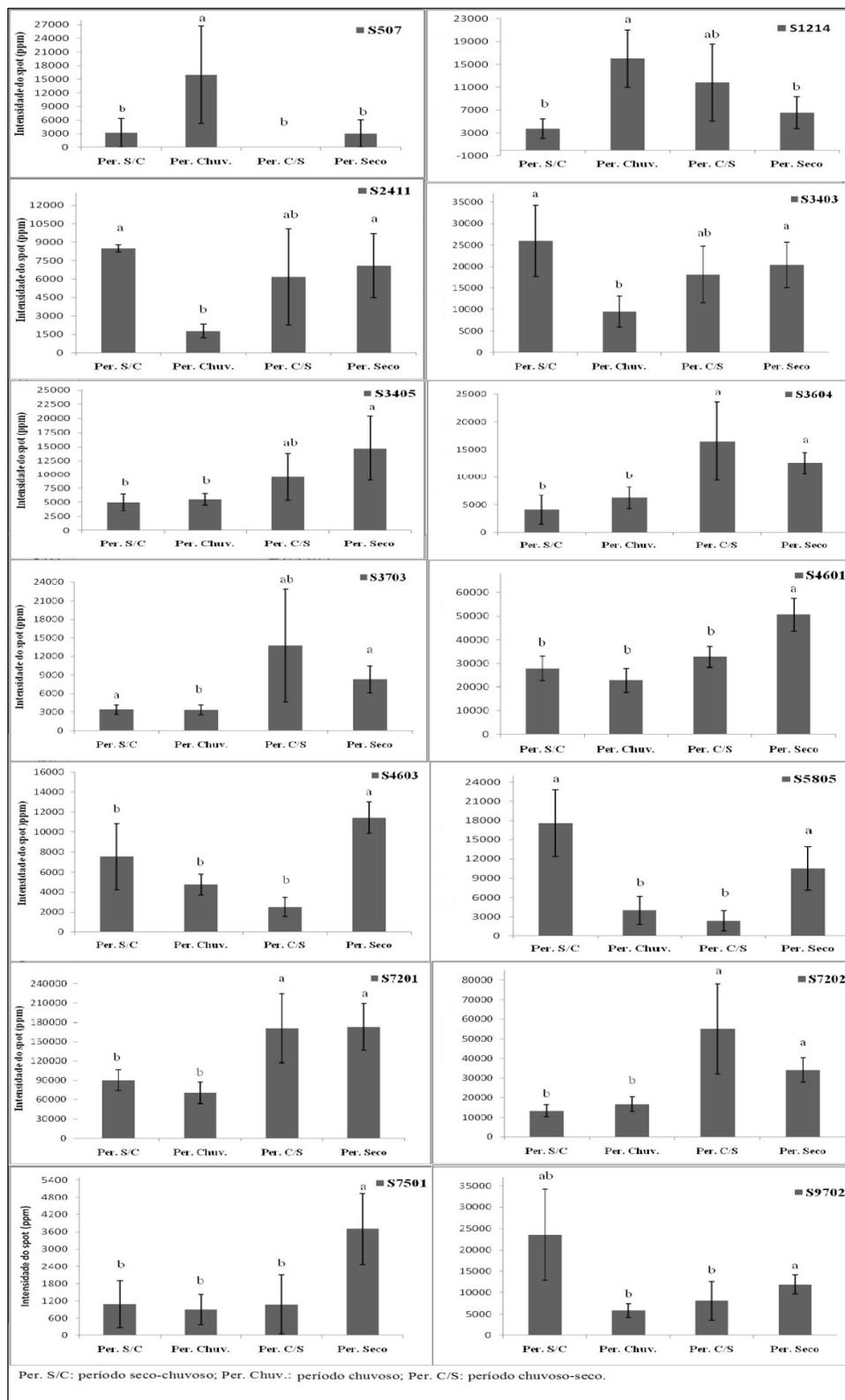


Figura 5. Intensidades dos “spots” protéicos (Média ± EP) que diferiram ($p < 0,05$) entre os períodos do ano. Os números dos “spots” referem-se àqueles identificados no máster gel do plasma seminal, como demonstrado na Figura 4.

Os “spots” S507 (52,3 kDa; pI 4,3), S3703 (65,8 kDa; pI 5,3), S4601 (62,5 kDa; pI 5,4), S5805 (72,3 kDa; pI 5,9), foram semelhantes à clusterina, arilsulfatase A, glutamato carboxipeptidase, *heat shock protein 1* (HSP70), respectivamente (Figura 6).

4.2. Atividade antioxidante da superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade enzimática da SOD foi significativamente ($p < 0,05$) maior no plasma seminal no período de transição chuvoso-seco ($0,04 \pm 0,01$ UA/mgP/min), apenas em comparação com o período chuvoso ($0,03 \pm 0,01$ UA/mgP/min). Verificou-se também menor atividade da CAT no período chuvoso ($110,9 \pm 46,1$ μ M/mgP/min) quando comparado ao período seco ($373,1 \pm 127,99$ μ M/mgP/min) (Figura 9).

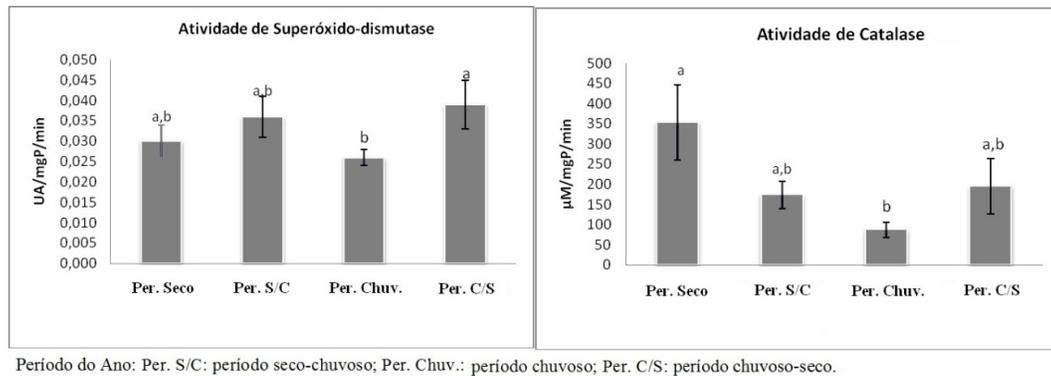


Figura 8. Atividade enzimática da superóxido-dismutase (SOD; 1.15.1.1) e Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) no plasma seminal de bodes da raça Saanen criados no Nordeste do Brasil ao longo do ano.

5. Discussão

Já é bem conhecido que a estacionalidade reprodutiva de caprinos em regiões temperadas (latitudes superiores a 35°) é condicionada ao fotoperíodo (CHEMINEAU et al., 1991). Entretanto, em regiões tropicais, mudanças na duração do dia são menos acentuadas e os caprinos se reproduzem ao longo do ano (NUNES, 1998). Todavia, outros fatores ambientais, como a temperatura ambiente, potencialmente exercem uma forte influência sobre a fisiologia e desempenho reprodutivo daqueles animais (FATET et al., 2011). Recentemente, diversas pesquisas demonstraram que proteínas seminais participam de diversos processos associados à fertilidade do macho (MOURA et al., 2006; 2007). Neste estudo, a variação no perfil protéico e atividade antioxidante (SOD e CAT) do plasma seminal de caprinos Saanen em condições de potencial estresse térmico foram investigados.

Os caprinos da raça Saanen investigados no presente experimento apresentaram alterações nos parâmetros espermáticos entre os períodos do ano, sendo no período seco em comparação ao chuvoso, as maiores reduções na percentagem de espermatozoides móveis, concentração espermática e elevação no número de células morfologicamente anormais. Comportamento semelhante foi observado no período de transição seco-chuvoso, porém, com menor alteração das características seminais. Verificou-se, neste caso também, um aumento nos valores dos parâmetros fisiológicos (frequência respiratória e cardíaca). Coincidente com estes eventos houve também variações significativas no perfil protéico e atividade de enzimas antioxidantes no plasma seminal. Portanto, avalia-se neste caso que as condições ambientais em determinados períodos

do ano do Nordeste do Brasil, onde os animais foram criados, está potencialmente associado a mudanças em vários aspectos da reprodução dos caprinos.

Após a análise dos mapas protéicos, demonstrou-se que a intensidade de trinta e quatro “spots” apresentou variações estacionais significativas. Destes, 19 apresentaram variações entre os períodos seco e chuvoso. Portanto, estes resultados indicam claramente que as alterações na expressão de determinadas proteínas do plasma seminal acompanham mudanças também verificadas nos parâmetros espermáticos em função de período do ano, característicos por valores contrastantes de precipitação pluviométrica, umidade e temperatura ambiente.

As proteínas seminais são provenientes principalmente do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias, as quais interagem com componentes da membrana espermática e participam de diversos processos associados à fertilidade do macho. Tais processos incluem motilidade (ELZANATY et al., 2002), proteção das células contra choque térmico, reações oxidativas, imunológicas e danos a integridade do DNA (CHEN et al., 2002; MOURA et al., 2007; MUIÑO-BLANCO et al., 2008), capacitação espermática e reação acrossômica (MANJUNATH & THÉRIEN, 2002), e interação com o oviduto e fecundação do oócito (RIFFO & PÁRRAGA, 1997; YUAN et al., 2003; GWATHMEY et al., 2003).

A provável similaridade dos “spots” protéicos nos mapas eletroforéticos do plasma seminal dos caprinos Saanen foi avaliada em função dos valores de pI, Mr e localização nos próprios géis e comparação destas informações com aquelas previamente publicados sobre o proteoma do plasma seminal de carneiros Santa Inês adultos (RÊGO et al., 2011; SOUZA et al., 2011a) e Morada Nova (SOUZA et al.,

2011b). Neste sentido, o spot S507 apresentou massa molecular aparente e ponto isoelétrico (52,3 kDa; pI 4,3) semelhantes aos da clusterina, tendo maior intensidade no período chuvoso em comparação aos demais períodos do ano.

A clusterina é uma glicoproteína heterodimérica secretada em uma grande variedade de tecidos e presente na maioria dos fluidos biológicos de muitas espécies (ROSENBORG & SILKENSEN, 1995), e sua expressão é aumentada em vários tipos de células em resposta a uma ampla variedade de condições de estresse (HUMPHREYS et al., 1999). Essa proteína já foi identificada nos fluidos do epididimo (MOURA et al., 2010b), e das glândulas sexuais acessórias de bovinos (MOURA et al., 2007) e no plasma seminal de ovinos (SOUZA et al., 2011), bem como nas células de Sertoli, no espermatozóide luminal e no complexo de Golgi proacrosomal (O'BRYAN et al., 1994). Devido à ampla distribuição da clusterina em vários tecidos, esta proteína tem sido considerada como proteína multifuncional, embora seu papel funcional ainda seja considerado um enigma (JONES & JOMARY, 2002). Estudos tem demonstrado que a expressão do mRNA da clusterina e a biosíntese dessa proteína aumenta em resposta à temperaturas elevadas (MICHEL et al., 1997). Essas observações podem sustentar a hipótese de uma provável estratégia de proteção sobre as células espermáticas, conferida pelo aumento da intensidade da clusterina (spot S507) durante o período chuvoso em comparação aos demais períodos do ano. Esta função protetora deve-se, provavelmente, à propriedade da clusterina em agir como uma chaperona molecular, sendo capaz de proteger as proteínas parcialmente desestruturadas da precipitação induzida por estresse térmico, reduzindo a citotoxicidade da precipitação protéica (HUMPHREYS et al., 1999). Além disso, a clusterina parece retardar apoptose inicial em condições de hipertermia dos testículos (BAILEY et al., 2002).

As células e organismos multicelulares respondem ao calor induzindo a síntese de uma classe de proteínas específicas denominadas de proteínas de choque térmico (HSPs; LINDQUIST & CRAIG, 1988). No presente estudo, a provável similaridade do spot S5805 (72,3 kDa, pI 5,9) foi equivalente ao pI e Mr da “Heat shock protein” (70 kDa), sendo a intensidade do “spot” duas vezes maior nos períodos de maior temperatura (seco e transição seco-chuvoso) em comparação aos períodos de menor temperatura ambiente (chuvoso e transição chuvoso-seco). A família das HSPs é dividida em função da massa molecular, estando presente no citoplasma, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo (KREGEL, 2002). Estudos têm demonstrado que as HSPs desempenham um importante papel na termotolerância adquirida nas células (SANCHEZ & LINDQUIST, 1990; KREGEL, 2002). A HSP70 também pode agir como uma chaperona molecular durante o estresse celular, protegendo as células através de processos como translocação de proteínas em organela, montagem de novas proteínas sintetizadas, e dobramento de peptídeos degradados (WELCH & SUHAN, 1986; GEORGOPOULOS & WELCH, 1993), além de participar do bloqueio da apoptose (MOSSER et al., 1997; SAMALI & ORRENIUS, 1998). A HSP70 está presente também nas espermatogônias, espermatídes e espermatozóides de bovinos e sua localização intracelular é alterada durante a espermatogênese, após a ejaculação e como um resultado da capacitação e reação acrossômica (KAMARUDDIN et al., 2004). A HSP70 também foi recentemente descrita no plasma seminal de animais Santa Inês, criados no Nordeste do Brasil (SOUZA et al., 2011). Portanto, esses resultados indicam que o aumento da HSP 70kDa, no período de maior temperatura, tenha sido uma provável resposta celular espermática sob condições de estresse térmico. No entanto,

mais estudos são necessários para verificar se as variações nos “spots” foram ou não resultado da indução da síntese de transcrição do respectivo gene.

As análises realizadas no presente estudo, mostraram também que o “spot” S3703 (Mr 65,8 kDa, pI 5,3) foi equivalente à enzima acrossomal, Arilsulfatase A, cuja intensidade foi superior no período seco. A arilsulfatase A (ASA, EC 3.1.6.8) é conhecida com uma enzima sulfatase acrossomal que se liga à membrana espermática durante o trânsito epididimário (WEERACHATYANUKUL et al., 2003). Esta sulfatase espermática foi identificada na superfície do espermatozóides da cauda do epididimo, no ducto deferente (TANTIBHEDHYANGKUL et al., 2002), na superfície e no acrossoma do espermatozóide do ejaculado, além de estar presente nos fluidos da cauda do epididimo e do plasma seminal (CARMONA et al., 2002; MOURA et al., 2010b; SOUZA et al., 2011). Estudos sugerem que a ASA participa no processo de ligação à zona pelúcida e espermatozoides (TANTIBHEDHYANGKUL et al., 2002), através de uma provável ligação com os resíduos sulfatados dos glicanos da zona pelúcida (CARMONA et al., 2002).

No presente estudo, a atividade da CAT foi maior nas amostras de plasma seminal coletadas no período seco em comparação ao período chuvoso do ano. Período onde foi verificado queda da qualidade espermática em consequência de uma provável condição de estresse térmico (SALES, 2010). Os espermatozóides, especialmente dos mamíferos, são particularmente susceptíveis aos danos induzidos pelas ROS, devido à alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados na sua membrana plasmática, através da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA (ALVAREZ et al., 1987; KASIMANICKAM et al., 2006). Um aumento na concentração de ROS no plasma

seminal tem sido relacionado à causa da má qualidade espermática (AITKEN et al., 1989; TSELKAS et al., 2000).

A habilidade da CAT de eliminar o H_2O_2 para evitar o declínio da motilidade espermática foi demonstrado por Baumber et al. (2002) com eqüinos, sendo considerado como o principal metabólito intermediário do oxigênio citotóxico, uma vez que a CAT foi mais eficaz do que a SOD, que não evitou a queda dos parâmetros de motilidade, portanto, os mesmos autores sugeriram que o O_2^- não era o ROS citotóxico responsável pela perda da motilidade. Deste modo, esses resultados indicam que no período seco houve um provável aumento da produção de H_2O_2 , e em consequência uma maior atividade da CAT na tentativa de promover uma maior proteção antioxidante, quando menor qualidade seminal foi observada. Além disso, os espermatozóides imóveis e morfologicamente anormais geram maiores quantidades de ROS que os normais (AITKEN, 1995). Esta observação realizada por Aitken (1995) pode ter contribuído pela maior atividade da CAT no período seco do presente estudo, uma vez que neste período foi observada maior incidência de alterações morfológicas e menor motilidade espermática. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Marti et al. (2007) em ovinos da raça Rasa Aragonesa criados em clima temperado, onde verificaram que a maior atividade das principais enzimas antioxidantes na estação não reprodutiva, apresentaram também menores valores de viabilidade e motilidade espermática.

A atividade da SOD foi maior no plasma seminal no período de transição chuvoso-seco, apenas em comparação com o período chuvoso ($p < 0,05$). Nestes períodos, as características seminais foram superiores, em comparação aos demais

períodos do ano, indicando, portanto, que provavelmente o aumento de atividade da SOD pode não estar relacionado com o comprometimento da qualidade espermática.

6. Conclusão

A intensidade dos “spots” protéicos e atividade antioxidante no plasma seminal de caprinos Saanen criados em clima tropical variaram ao longo do ano. A maior intensidade das proteínas do plasma seminal e atividade da catalase foram registradas no período de maior temperatura ambiente (transição seco-chuvoso e seco), coincidente com reduções na qualidade seminal.

A condição climática do Nordeste do Brasil está potencialmente associada a essas mudanças em vários aspectos da reprodução dessa raça de caprinos, desencadeando alterações no perfil protéico e atividade antioxidante no plasma seminal.

Referências Bibliográficas

AENGWANICH, W.; KONGBUNTAD, W.; BOONSORN, T. Effects of shade on physiological changes, oxidative stress, and total antioxidant power in Thai Brahman cattle. **International Journal of Biometeorology**, p.1-8, 2010.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 654-660, 2005.

AGUIAR, G.V. **Efeito individual e da época do ano sobre a composição do plasma seminal e a qualidade do sêmen caprino resfriado a 4°C por 48 horas do estado do Ceará**. 2008. 114f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

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

AITKEN, R.J.; CLARKSON JS, FISHEL S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 183-197, 1989.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D.S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, p. 495-504, 1996.

AIURA, A.L.O.; AIURA, F.S.; SILVA, R.G. Respostas termorreguladoras de cabras Saanen e Pardo Alpina em ambiente tropical. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 605-608, 2010.

ALKAN, I.; SIMSEK, F.; HAKLAR, G.; KERVANCIOGLU, E.; OZVERI, H.; YALCIN, S.; AKDAS, A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. **Journal of Urology**, v. 157, p. 140–143, 1997.

ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. 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.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 334-346, 1995.

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

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in Mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.

AZEVEDO, P.V.; SILVA, B.B.; RODRIGUES, M.F.G. Previsão Estatística das Chuvas de Outono no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 13, n. 1, p. 19-30, 1998.

BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, n. 2, p. 275-280, 1983.

BAILEY, R.W.; ARONOW, B.; HARMONY, J.A.; GRISWOLD, M.D. Heat shockinitiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1042–1053, 2002.

BAINS, R.; ADEGHE, J.; CARSON, J. Human sperm cells express CD44. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 307-312, 2002.

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

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1531-1537, 2000.

BARRIOS, B.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; MUIÑO-BLANCO, T. CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 539-549, 2005.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1025-1033, 2002.

BECONI, M.T.; AFFRANCHINO, M.A.; SCHAND, L.M.; BEORLEGUI, N.B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BEZERRA, F.Q.G.; FREITAS NETO, L.M.; AGUIAR FILHO, C.R.; SANTOS, M.H.B.; NEVES, J.P.; OLIVEIRA, M.A.L. Avaliação dos parâmetros seminais e espermáticos de caprinos jovens da raça boer nascidos nas estações chuvosa e seca. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1256-1262, 2009.

BIEMOND, P.; VAN EIJK, H.G.; SWAAK, A.J.; KOSTER, J.F. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 3, p. 1576-1579, 1984.

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

BRATANOV, K.; SOMLEV, B.; DOYCHEVA, M.; TORNYOV, A.; EFREMOVA, V. Effect of kallikrein on the motility of bull and ram spermatozoa after deep freezing. **Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences**, v. 31, p. 1337-1338, 1978.

CAMPOS, A.C.N.; NUNES, J.F.; SILVA FILHO, A.H.S.; MONTEIRO, A.W.U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semiárido nordestino durante o período seco e chuvoso. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 185-189. 2003.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p.1327–1333, 2004.

CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 841-850, 2006.

CARMONA, E.; WEERACHATYANUKUL, W.; SOBOLOFF, T.; FLUHARTY, A.L.; WHITE, D.; PROMDEE, L.; EKKER, M., BERGER, T.; BUHR, M.; TANPHAICHITR, N. Arylsulfatase a is present on the pig sperm surface and is involved in sperm-zona pellucida binding. **Developmental Biology**, v. 247, p. 182–196, 2002.

CENA, K.; MONTEITH, J.L. Transfer processes in animal coats. III. water vapour diffusion. **Proceedings of the Royal of Society London B Biological Sciences**, v. 188, n. 1, p. 413-423, 1975.

CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y.; GUÉRIN, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome: Italy, 1991. 222p.

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

CHRISTISON, G.I.; JOHNSON, H.D. Cortisol turnover in heat-stressed cows. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 5, p. 1005-1010, 1972.

CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 365-372, 2004.

CICHY, J.; PURÉ, E. The liberation of CD44. **Journal of Cell Biology**, v. 161, p. 839-843, 2003.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France II-étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, v. 20, p. 1789-1799, 1980.

COOPER, T.G.; WAITES, G.M.; NIESCHLAG, E. The epididymis and male fertility: a symposium report. **International Journal of Andrology**, v. 9, p. 81-90, 1986.

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

D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.161-176, 1996.

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

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

DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). **Physiological Reviews**, v. 46, p. 323-357, 1996.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive Oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DE LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcsome reaction induced by A23187,

lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 585–594, 1998.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.

DUKES, H.H.; SWENSON, H.J. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara 1996, 856p.

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2904–2911, 2002.

EMBRAPA CNPC. **Raças de caprinos**. Acesso em 07/02/2011. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/racas2.htm>.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.A. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep of Goats**. Butterworths, Sydney, pp. 194–206, 1987.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 4. Semen y sus características. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.25. 1990.

FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M.T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 211-219, 2011.

FERNANDES, C.E.; SOUZA, M.I.L. Aspectos gerais do aparelho reprodutivo no touro. In: AMRAL, T.B.; SERENO, J.R.B.; PELLEGRIN, A.O. **Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos**. Corumbá: EMBRAPA/CNPGADO DE CORTE, CNPCERRADOS, CNPPANTANAL, 2009, 216p.

FERREIRA, R.A. **Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2005. 371p.

- FINK, E.; SCHILL, W.B.; MISKA, W. Kinin-containing kininogen activity in blood plasma, urine and saliva. **Advances in Experimental Medical Biology**, v. 247, p. 311-316, 1990.
- FOUCHÉCOURT, S.; MÉTAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization, secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1790-1803, 2000.
- FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 16, p. 95-104, 1992.
- FUQUAY, J.W. Heat stress as it affects animal production. **Journal of Animal Science**, v. 52, p. 164-182, 1981.
- FURMANSKI, P.H.J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. **Nature**, v. 23, p. 721-724, 1995.
- GEORGOPOULOS, C.; WELCH, W.J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual Review of Cell Biology**, v. 9, p. 601-34, 1993.
- GOMES, W.R.; BUTLER, W.R. JOHNSON, A.D. Effect of elevated ambient temperature on testis a blood levels and in vitro biosynthesis of testosterone in the rams. **Journal of Animal Science**, v. 33, n. 4, p. 804-807, 1971.
- GRIVEAU, J.F.; RENARD, P.; LE LANNOU, D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 300-307, 1994.
- GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 61-69, 1997
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

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. 809-15, 2003.

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

HAFEZ, E.S.E. **Fisiologia da Reprodução**. Ed. Manole, 7^a ed. São Paulo, 2004.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 349–360, 2004.

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 3341–3350, 2009.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOCKEL, M, VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 266–276, 2001.

HUMPHREYS, D.T.; CARVER, J.A.; EASTERBROOK-SMITH, S.B.; WILSON, M.R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. **Biochemical Journal**, v. 274, p. 6875-6881, 1999.

IKEDA, M.; KODAMA, H.; FUKUDA, J.; SHIMIZU, Y.; MURATA, M.; KUMAGAI, J.; TANAKA, T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 393–399, 1999.

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, S.E.; JOMARY, C. Clusterin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 427-431, 2002.

KAMARUDDIN, M.; KROETSCH, T.; BASRUR, P.K.; HANSEN, P.J.; KING, W.A. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 36, p. 327–334, 2004.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v. 65, p. 1407-1421, 2006.

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

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-261, 1997.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Effects of ambient temperature and scrotal fleece cover on scrotal and testicular temperatures in rams. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 157-60, 1999.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effects of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 151-157, 1996.

KREGEL, K.C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 2177–2186, 2002.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 63–77, 1988.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 780–787, 2002.

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, p. 109–119, 2002.

MANJUNATH, P.; MARCEL, Y.L.; UMA, J.; SEIDAH, N.G.; CHRETIEN, M.; CHAPDELAINE, A. Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 16853-6857, 1989.

MANJUNATH, P; LEFEBVRE, J; JOIS, P.S; FAN, J; WRIGHT, M.W. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 394–397, 2009.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 3. fructose as a normal constituent of seminal plasma site of formation and function of fructose in semen. **Biochemistry Journal**, v. 40, n. 4, p. 481–491, 1946.

MARAI, I.F.M.; EL-DARAWANY, A.A.; FADIEL, A.; ABDEL-HAFEZ, M.A.M. Physiological traits as affected by heat stress in sheep-A review. **Small Ruminant Research**, v. 71, n. 1, p. 1-12, 2007.

MARTÍ, E.; MARA, L.; MARTÍ, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PERÉZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 67, p. 1446-1454, 2007.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MAXWELL, W. M. C., JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J.M.M.; FIGUEIRÊDO, E.L.; RODRIGUES, L.F.S. Utilização do Azul de Bromofenol conservado a 4°C e 29°C, como método coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 1, p. 287-297, 2006.

MICHEL, D.; CHATELAIN, G.; NORTH, S.; BRUN, G. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. **Biochemical Journal**, v. 328, p. 45-50, 1997.

MOBERG, G.P. **Biological response to stress: implications for animal welfare**. In: CABI publishing, 1-22, 2000.

MOREIRA, E.P.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, 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. 6, p. 1704-1711, 2001.

MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; DENSI-LAROSE, C.; MASSIE, B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 5317-5327, 1997.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 201–211, 2006.

MOURA, A.A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H.; 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, p. 214-222, 2007.

MOURA, A.A.; OLIVEIRA, R.V.; MENEZES, E.B.; REGO, J.P.A.; SOUZA, C.E.A. **Proteínas do plasma seminal e função espermática**. In: Jose Ferreira Nunes. (Org.). Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes. Fortaleza: Tecnograf, 2010 a, p. 91-117.

MOURA, A.A.; SOUZA, C.E.; STANLEY, B.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomic**, v. 73, p.2006-2020, 2010b.

MRUK, D.D.; SILVESTRINI, B.; MO, M-Y.; CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, v. 65, p. 305–311. 2002.

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

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 245-262, 2000.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U. Climatic effects on productive traits in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 75–81, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of goats: Angora, dairy, and meat goats in Temperate and Tropical countries**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1981.

NOGUEIRA FILHO, A.; FIGUEIREDO JR, C.A.; YAMAMOTO, A. **Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos na área de atuação do BNB**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2010, 123f. (Banco do Nordeste – Documentos do ETENE, 26).

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

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

NUNES, J.F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen de caprinos no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 12, p. 77-83, 1988.

O'BRYAN, M.K.; MALLIDIS, C.; MURPHY, B.F.; BAKER, H.W. Immunohistological localization of clusterin in the male genital tract in humans and marmosets. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 502–509, 1994.

O'FLAHERTY, C.; BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T. Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 96–101, 2005.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 399-420, 1999.

OLIVEIRA, A. L. **Mecanismos termorreguladores de cabras da raça Saanen**. 2007. 96f. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.

OLLERO, M.; GARCÍA-LOPÉZ, N.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phases system. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 81-390, 1997.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P.T.K. A Single, Mild, Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death. **Biology of reproduction**, v. 80, p. 913–919, 2009.

PEEKER, R.; ABRAMSSON, L.; MARKLUND, S.L. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 1061–1066, 1997.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIN, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PEREIRA, A.M.F.; BACCARI JR, F.; TITTO, E.A.L.; ALMEIDA, J.A.A. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. **International Journal of Biometeorology**, v. 52, p. 199–208, 2008.

PEREIRA, J.C.C. **Fundamentos de bioclimatologia aplicada à produção animal** – Belo Horizonte: 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.

QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R.G.; BISCONTINI, T.M.B **A Caprinocultura Leiteira no Contexto da Segurança Alimentar e Nutricional**. Acesso em 08/02/2011.

Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23300>., 2006.

RASOOLI, A.; JALALI, M.T.; NOURIA, M.; MOHAMMADIANC, B.; BARATI, F. Effects of chronic heat stress on testicular structures, serum testosterone and cortisol concentrations in developing lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 55-59, 2010.

REDDY, V.R.K.; RAJEEV, S.; GUPTA, V. $\alpha 6 \beta 1$ integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 1590-1596, 2003.

REGO, J.P.A.; SOUZA, C.E.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.B.; GOZZO, F.C.; Moura, A.A. Major proteins from the seminal plasma of adult Santa Ines rams. **Animal Reproduction Science**, v. x, p. x-x, 2011.

RIFFO, M.; PÁRRAGA, M. Role of phospholipaseA2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. **Journal of Experimental Zoology**, v. 79, p. 81–88, 1997.

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.

ROBERTSHAW, D. Mechanisms for the control of respiratory evaporative heat loss in panting animals. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, p. 664-668, 2006.

ROSENBERG, M.E.; SILKENSEN, J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, p. 633–645, 1995.

ROSSI, T.; MAZZILLI, F.; DELFINO, M.; DONDERO, F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. **Cell and Tissue Banking**, v. 2, p. 9–13, 2001.

SALEM, M.H.; EL-SHERBINY, A.A.; KHALIL, M.H.; YOUSEF, M.K. Diurnal and seasonal rhythm in plasma cortisol, triiodothyronine and thyronine as effected by the

wool coat in Barki sheep. **Indian Journal Animal Science**, v. 61, n. 9, p. 946-951, 1991.

SALES, M.G.F. **Parâmetros fisiológicos e reprodutivos de machos caprinos Saanen criados em clima tropical**. 2010. 159f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperones**, v. 3, p. 228–236, 1998.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2ª ed. Belo Horizonte/MG, Minas Gerais: FEP MVZ Editora, 2002.

SANCHEZ, Y.; LINDQUIST, S.L. HSP104 is required for induced thermotolerance. **Science**, v. 248, p. 1112–1115, 1990.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 269-277, 2003.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, p. 633-642, 1996.

SETCHELL, B.P. The effects of heat on the testis of mammals. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 81- 91, 2006.

SETCHELL, B.P.; VOLGMAYR, J.K.; HINKS, N.T. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 24, p. 81-89, 1971.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

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

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

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v. 67, p.1-18, 2000.

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F. **Comportamento sexual do macho caprino da raça Moxotó às variações estacionais no Nordeste do Brasil**. Sobral: EMBRAPA/CNPCAPRINOS, 1988, 17p. (Embrapa - CNPC. Boletim Técnico, 6).

SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P.; AZEVEDO, S.A.; AZEVEDO NETO, J.; SILVA, E.M.N.; SILVA, A.K.B. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 1, p. 07-14. 2005.

SILVA, M.M. **Proteínas do plasma seminal de touros *bos indicus* e associações com parâmetros seminais**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SILVA, R.G. **Introdução à Bioclimatologia Animal**. São Paulo: Ed. Nobel, 2000a, 286p.

SILVA, R.G. Um Modelo para a Determinação do Equilíbrio Térmico de Bovinos em Ambientes Tropicais. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1244-1252, 2000b.

SOUZA, A.F.; LEITÃO, M.C.G.; BATISTA, A.M.; PORTO, A.L.F.; LIMA FILHO, J.L.; GUERRA, M.M.P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, 2009.

SOUZA, C.E.A.; ARAÚJO, A.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; LIMA SOUZA, A.C.; NEIVA J.N.M.; MOURA, A.A. 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.; MONACO, E.; KILLIAN, G. J. 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.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; NOGUEIRA, F.S.; DOMONT, G. B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F.C.; Moura, A.A. Proteome of the seminal plasma from adult Santa Ines rams. **Reproduction, Fertility and Development**, v. x, p. x-x, 2011.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E.H.; MAHGOUB, O. Effect of heat stress on respiratory rate, rectal temperature and blood chemistry in Omani and Australian Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 193–198, 2003.

STARLING, J.M.C.; SILVA, R.G.; MUÑOZ, M.C.; BARBOSA, G.S.S.C.; COSTA, M.J.R.P. Análise de algumas variáveis fisiológicas para avaliação do grau de adaptação de ovinos submetidos ao estresse por calor. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 2070-2077, 2002.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System - Getting Started with the SAS® Learning Edition**. SAS Institute Inc., Cary, USA, 86pp, 2002.

STREZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIAK, A. Purification and partial characterization of a 5,700 Da sperm motility innibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, v. 29, p. 5-52, 1992.

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

SURIYASOMBOON, A.; LUNDEHEIM, N.; KUNAVONGKRIT, A.; EINARSSON, S. Effect of temperature and humidity on reproductive performance of crossbred sows in Thailand. **Theriogenology**, v. 65, p. 606–628, 2006.

TANTIBHEDHYANGKUL, J.; WEERACHATYANUKUL, W.; CARMONA, E.; XU, H.; ANUPRIWAN, A.; MICHAUD, D.; TANPHAICHITR, N. Role of sperm surface

arylsulfatase A in mouse sperm–zona pellucida binding. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 212–219, 2002.

TEIXEIRA, A.V.C. ; ELOY, A.M.X.; FURTADO, J.R.; PINHEIRO, R.R.; PONTES, M.S. 1D mapping of seminal plasma proteins in Anglo-Nubian goats. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 4, p. 516-525, 2009.

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.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid binding Proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 590-598, 1999.

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.

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.

TSELKAS, K.; SARATSI, P.; KARAGIANIDIS, A.; SAMOUILIDIS, S. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 107, n. 2, p. 69-82, 2000.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 53, p. 865-871, 2002.

UPRETI, G.C.; HALL, E.L.; KOPPENS, D.; OLIVER, J.E.; VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 107-121, 1999.

VAN ROSSUM, M.W.P.C.; ALBERDA, M.; VAN DER PLAS, L.H.W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, v. 130, p. 207-216, 1997.

VIEIRA, R.J.; CARDOSO, F.T.S.; AZEVEDO, L.M.; CUNHA, L.A.L.; SALVIANO, M.B. Influência da morfologia escrotal e da época do ano na qualidade do sêmen de caprinos criados no Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 376-380, 2008.

VINSON, G.P.; MEHTA, J.; EVANS, S.; MATTHEWS, S.; PUDDEFOOT, J.R.; SARIDOGAN, E.; HOLT, W.V.; DJAHANBAKHCH, O. Angiotensin II stimulates sperm motility. **Regulatory Peptides**, v. 67, n. 2, 1996.

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

WAITES, G.M.H.; MOULE, G.R. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 2, p. 213-224, 1961.

WAKABAYASHI, H.; MATSUMOTO, H.; HASHIMOTO, K.; TERAGUCHI, S.; TAKASE, M.; HAYASAWA, H. Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 955-957, 1999.

WEERACHATYANUKUL, W.; XU, H.; ANUPRIWAN, A.; CARMONA, E.; WADE, M.; HERMO, L.; DA SILVA, S.M.; RIPPSTEIN, P.; SOBHON, P.; SRETARUGSA, P. Acquisition of arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1183-1192, 2003.

WELCH, W.J.; SUHAN, J.P. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 2035-2052, 1986.

WINGFIELD J.C.; SAPOLSKY, R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, p. 711-724, 2003.

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**, Chapter 5. In: The physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J. D. (eds). Raven Press, Ltd, NewYork, p. 189–317, 1994.

YOUSEF, M. K., KIBLER, H. H., JOHNSON, H. D. Thyroid activity and heat production in cattle following sudden ambient temperature changes. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 142-148, 1967.

YUAN, Y.Y., CHEN, W.C., SHI, Q.X., MAO, L.M., YU, Q., FANG, X., ROLDAN, E.R.S. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 904–913, 2003.

ZINI, A.; SCHLEGEL, P.N. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 473-480, 1996.