



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

ADERSON MARTINS VIANA NETO

**PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL DE
CARNEIROS MORADA NOVA SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL
INTERMITENTE**

**FORTALEZA
2018**

ADERSON MARTINS VIANA NETO

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS
MORADA NOVA SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL INTERMITENTE

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia na Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V67p Vianna Neto, Aderson.
Parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente / Aderson Vianna Neto. – 2018.
92 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo Moura.
Coorientação: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo.
1. Reprodução animal. 2. Sêmen. 3. ovinos. I. Título.

CDD 636.08

ADERSON MARTINS VIANA NETO

PARÂMETROS SEMINAIS E PROTEOMA DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS
MORADA NOVA SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL INTERMITENTE

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia na Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Produção e Melhoramento Animal

Aprovado em: 02/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arlindo Alencar A. N. Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Gorete Flores Salles
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Jorge André Matias Martins
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Maurício Fraga van Tilburg
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Davide Rondina
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dr. Fábio Roger Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meu pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, principal responsável por eu ter chegado e onde chegarei pela sua infinita misericórdia, pela sua fidelidade e por sua presença em meu dia a dia (*“Eis que a Virgem conceberá e dará à luz um filho, que se chamará Emanuel (Is 7, 14), que significa: Deus conosco.” Mt 1, 23*); e a Nossa Senhora de Fátima, por me ter sempre sob seu precioso manto.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, ao seu corpo docente e funcionários – em especial a Francisca Beserra.

A toda minha família, principalmente meus pais pela dedicação e empenho que me possibilitaram chegar até aqui; à minha namorada, Maria Tereza e sua família, pelo carinho, paciência, companheirismo e oração, os quais sou muito grato.

Ao Prof. Arlindo Moura, pelas oportunidades durante minha formação acadêmica, bem como, a oportunidade de cursar o doutorado e fornecer as condições para a obtenção deste título.

Ao Prof. Airton Araújo pela amizade, confiança, ensinamentos, orientações acadêmicas e de vida, troca de ideias, por toda ajuda, estímulo e revisões.

Ao Prof. Jorge André por todo auxílio, especialmente na parte estatística, paciência, disponibilidade, conselhos, ensinamentos e, orientação, e pela sua sincera amizade; e por me ensinar o sentido da palavra “paciência!”, sobretudo quando foi preciso refazer o pdquest.

A Profa. Maria Gorete Salles, que me concedeu a primeira e essencial oportunidade acadêmica e profissional, me apoiando, incentivando e acreditando em meu potencial. Por me estimular a estudar e buscar conhecimento. Além da amizade e oportunidades que seguem até os dias presentes. À sra., minha contínua gratidão.

Aos membros da banca Prof. Davide Rondina e Prof. Maurício van Tilburg pela disponibilidade e contribuições.

Ao Dr. Fábio Roger, pelo auxílio na espectrometria e contribuições.

À profa. Elzânia Pereira pela concessão do local de experimento e encorajamento para tal, bem como a seus orientados, Thiago Araújo, Marília Pereira e Eduardo Heinze, pela ajuda e amizade.

Aos amigos zootecnistas, Carlos Alberto (Rações Dourado[®]) pela facilitação na aquisição dos insumos; Lucas Fonseca, pelo auxílio na formulação da ração; Prof. David Rocha, pela concessão dos protocolos de eletroforese bidimensional.

A Profa. Patrícia Pimentel, pela concessão de equipamentos utilizados durante o experimento; e aos integrantes do LERA-UFC, Profa. Ana Cláudia, Dayanne Lima, Karoline Farias pelo auxílio na realização de análises laboratoriais.

Aos amigos Ana Luiza e Fágner Patrocínio, pela acolhida no laboratório, e todas as trocas de ideias e ajuda quanto a cromatografia, imunocitoquímica e conversas de vida. E aos colegas de doutorado que tive o prazer de conviver e tornar-me amigo, Moemia Portela, Solange Damasceno, Kamila Otávio, Mayra Vettorazzi, Arabela Guedes, Deisy Diaz, Monica Ramirez; a querida amiga Révila Melo, por toda ajuda no experimento, dedicação e confiança que foram imprescindíveis para que conseguíssemos nossos objetivos. Foi muito bom trabalhar e conviver com você.

A todos os colegas que me ajudaram durante os manejos e coletas de sêmen: Érica Araújo, Walfran Lopes, Inti Rodrigues, Jander Fabrício, Taciane Alves, Yago Acioly, Thaís, Ronaldo Queiroz, Thiago Teixeira, David Lopes, Tatiana Prata; o auxílio de vocês foi fundamental.

Às amigas e companheiras Franciely Costa e Adália Oliveira.

À amiga Leonília Maria (*in memoriam*).

A toda turma do Laboratório de Fisiologia Animal.

“A ciência infla, mas o amor edifica”

(I Cor 8,1)

“Não se preocupe com o que pode acontecer amanhã; o mesmo Pai eterno que cuida de você hoje se encarregará amanhã e todos os dias. Ou Ele protegerá você do sofrimento, ou lhe dará a força infalível para suportá-lo.”

São Francisco de Sales

RESUMO

O estudo avaliou as alterações na biometria testicular, parâmetros seminais, integridade do DNA e ligação da *ram seminal vesicle protein* (RSVP) às células espermáticas e o proteoma do plasma seminal de carneiros submetidos à insulação escrotal intermitente. Seis carneiros Morada Nova tiveram seus testículos insulados intermitentemente por quatro noites consecutivas (18:00 às 6:00), totalizando 48 horas. O sêmen foi coletado por eletroejaculação de 14 dias antes a 120 dias após o início da insulação escrotal. A circunferência escrotal reduziu de $30,5 \pm 0,34$ cm (dia 0) para $27,9 \pm 0,58$ cm (dia 28) e sendo recuperada ao dia 57 ($30,6 \pm 0,62$ cm). A motilidade espermática total reduziu de 75% (dia 0) para 33% (dia 4), estando ausente ao dia 23 e 28 após o início da insulação escrotal, retornando ao normal ao dia 77 (67%). O percentual de espermatozoides morfológicamente normais foi reduzido de 96% (dia 0) para 6% (dia 7) sendo reestabelecido ao dia 91 (87%). A integridade do DNA espermático alcançou menores valores entre os dias 11 e 63 (10,7%) retornando ao normal 120 dias após o início da insulação (80,4%). O percentual de espermatozoides imunomarcados com RSVP reduziu 20% após a insulação escrotal intermitente (pré: 54,9%; pós: 34,6%). Foram detectados 342 *spots* no gel *máster*, de modo que, 13 *spots* mostraram-se diferenciais e corresponderam a 14 proteínas, destes, nove tiveram sua expressão reduzida (*Carboxypeptidase Q precursor*, *Beta-actin-like protein 2*, *Superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *Mammaglobin A*, *Spermadhezín z-13*, *Epididymal secretory protein E1*, *Binder of sperm 5 precursor*, *Aldose reductase*, *C-reactive protein*) enquanto outros 5 *spots* tiveram sua expressão aumentada (*Serum albumin precursor*, *Inhibitor of carbonic anhydrase-like*, *Inactive ribonuclease-like protein 9*, *EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3* e *Polymeric immunoglobulin receptor*) devido a insulação escrotal. Portanto, a hipertermia escrotal resulta em alterações microscópicas e moleculares que reduzem a qualidade seminal em carneiros criados em clima tropical.

Palavras-chave: Plasma seminal. Biometria testicular. Proteômica, rsvp 22

ABSTRACT

The study evaluated the changes in testicular biometry, seminal parameters, DNA integrity, localization of RSVP-sperm interaction and seminal plasma proteome (2D-SDS-PAGE) of rams submitted to intermittent scrotal insulation. Six adult Morada Nova rams have had their testis insulated by four nights (6:00 p.m. a 6:00 a.m.), a total of 48 hours. Semen was collect by eletroejaculation from 14 days before until 120 days after begin of scrotal insulation. Scrotal circumference decreased from $30.5 \pm 0,34$ cm (day 0) to $27.9 \pm 0,58$ cm (day 28) and it was recovered to normal at day 57 ($30.6 \pm 0,62$ cm). Total motility declined from 75% (day 0) to 33% (day 4) being absent at day 23 and 28, and it was reestablished at day 77 (67%). The percentage of normal sperm was reduced from 96% (day 0) to 6% (day 7) being recovered at day 91 (87%). Sperm DNA integrity was smallest values during day 11 to 63, returning to normal 120 days after begin of scrotal insulation (80,4%). The percentage of immunolocalized-RSVP sperm decreased 20% after intermittent scrotal insulation (pre-insulation: 54.9%; post-insulation: 34,6%). It were detected 342 *spots* in master gel, so that 13 *spots* differentially expressed corresponded to 14 proteins, of which, nine was underexpressed (*Carboxypeptidase Q precursor*, *Beta-actin-like protein 2*, *Superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *Mammaglobin A*, *Spermadhezín z-13*, *Epididymal secretory protein E1*, *Binder of sperm 5 precursor*, *Aldose reductase*, *C-reactive protein*), while others five was overexpressed (*Serum albumin precursor*, *Inhibitor of carbonic anhydrase-like*, *Inactive ribonuclease-like protein 9*, *EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3* e *Polymeric immunoglobulin receptor*) after intermittent scrotal insulation. Therefore, scrotal hyperthermia results in microscopy and molecular changes that reduces seminal quality in rams raised at tropical climate.

Keywords: Seminal plasma. Testicular biometry. Proteomics. RSVP 22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Temperatura retal de ovinos morada nova submetidos a insulação escrotal intermitente.....	32
Figura 2 - Valores de circunferência escrotal (A) e volume testicular (B) de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.....	33
Figura 3 - Valores de motilidade massal (A), motilidade individual progressiva (B), percentual de espermatozoides móveis (C) e concentração espermática (D) de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.	34
Figura 4 - Percentual de espermatozoides normais de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.	34
Figura 5 - Integridade do DNA de células espermáticas de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente (A). Espermatozoide com halo (DNA íntegro; B), sem halo (DNA fragmentado), sem halo e degradado (DNA fragmentado; C).....	35
Figura 6 - Percentual de células espermáticas marcadas para RSVP antes (dia 0) e após (dia 4) insulação escrotal intermitente.	36
Figura 7 - Padrão de ligação da RSVP ao espermatozoide ejaculado antes (dia 0) e após (dia 4) a insulação escrotal intermitente.	37
Figura 8 - Mapa bidimensional do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente (Master Gel). Os spots indicados representam os que foram expressos diferencialmente em função da insulação escrotal, e referem-se aos mostrados no anexo como Tabela 2. As proteínas foram coradas com azul de coomassie coloidal G-250 e identificadas por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF).....	38
Figura 9 - Proteomas do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente referentes aos períodos pré (-14 e 0) e pós insulação (7, 18, 28, 48, 77 e 120). Os géis foram corados com azul de coomassie coloidal G-250 e analisados usando o software PDQuest (Bio-Rad, USA).....	39

Figura 10 - Intensidade dos spots proteicos do plasma seminal de carneiros Morada Nova, que tiveram sua expressão reduzida após a insulação escrotal intermitente (média ± erro-padrão). Carboxypeptidase Q precursor (A), Beta-actin-like protein 2 (B), Superoxide dismutase [Cu-Zn] (C), Epididymal secretory protein E1 (NPC2) (D), Spermadhesin z-13 precursor e Mammaglobin-A (E), Aldose reductase (F), Binder of sperm 5 (G), C-reactive protein (H).. 41

Figura 11 - Intensidade dos spots proteicos do plasma seminal de carneiros Morada Nova, que tiveram sua expressão aumentada após a insulação escrotal intermitente (média ± erro-padrão). Serum albumin precursor (A), Inhibitor of carbonic anhydrase-like (B), EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 (C), Inactive ribonuclease-like protein 9 (D) and Polymeric immunoglobulin receptor (E).....42

Figura 12 - Ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos à insulação escrotal intermitente diferencialmente expressas, com base nos seus processos biológicos (A), componentes celulares (B) e funções moleculares (C).....43

Figura 13 - Redes de interação interprotéica das proteínas Carboxypeptidase Q (A; CPQ), Beta-actin-like protein 2 (B; ACTG1), Superoxide Dismutase [Cu-Zn] (C; SOD1), Epididymal secretory protein E1 (D; NPC2), Spermadhesin – Z13 (E; SPADH2), Mammaglobin-A (F; SCGB2A2), Aldose reductase (G; AKR1B1), BSP5 precursor (H: BSP5) e C-Reactive protein (I; CRP) obtidas com base no banco de dados STRING (v. 10.5).44

Figura 14 - Redes de interação interproteica das proteínas Serum Albumin precursor (A; ALB), Inhibitor of carbonic anhydrase (B; ICA), EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 (C; EDIL3), Inactive ribonuclease-like protein 9 (D; RNASE9), Polymeric immunoglobulin receptor (E; PIGR) obtidas com base no banco de dados STRING (v. 10.5).45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados climáticos obtidos durante o período experimental, pré e pós insulação, e nas noites de insulação escrotal.....	36
Tabela 2- Proteínas expressas diferencialmente no plasma seminal de carneiros Morada Nova como resultado da insulação escrotal intermitente. As proteínas mostradas na figura 9, foram separadas por eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e identificadas por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).....	71
Tabela 3- Descrição da ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova variedade branca, expressadas diferencialmente em função da insulação escrotal, de acordo com o banco de dados EBIGOA.....	83

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2. INTRODUÇÃO	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Procedimentos Gerais	21
3.2 Parâmetros ambientais, temperatura retal e escrotal de ovinos	22
3.3 Avaliação da biometria testicular de ovinos	22
3.4 Coletas, avaliação e processamento do sêmen	23
3.5 Avaliação da integridade da cromatina espermática	23
3.6 Imunocitoquímica das proteínas RSVP nos espermatozoides de ovinos pré e pós insulação	24
3.7 Eletroforese bidimensional	25
3.8 Análises dos mapas proteicos	27
3.9 Digestão dos <i>spots</i> proteicos	27
3.10 Identificação das proteínas usando espectrometria de massa (ESI-Q-ToF)	28
3.11 Análises de Ontologia Gênica e Interação entre Proteínas	29
3.12 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A eficiência reprodutiva dos animais é um dos principais componentes para o sucesso econômico nos sistemas de produção. Assim, a qualidade seminal impacta diretamente a taxa de fertilização e a qualidade embrionária, e conseqüentemente no processo produtivo. O aumento da temperatura ambiente e as mudanças climáticas sazonais reduzem a qualidade e a produção espermática de bovinos (THUNDATHIL *et al.*, 2012), suínos (HORKY *et al.*, 2015), caprinos (SALLES *et al.*, 2009) e ovinos (MARAI *et al.*, 2007).

A espermatogênese é um processo altamente coordenado envolvendo divisão e diferenciação celular para a produção de células haploides. Nos mamíferos pode ser dividida em fase pré-meiótica, na qual ocorre proliferação das espermatogônias por mitose e diferenciam-se em espermatócitos; meiótica, a qual um espermatócito primário produz quatro espermátides arredondadas por meio de duas divisões meióticas; e, pós-meiótica, em que as espermátides arredondadas sofrem alterações morfológicas resultando em espermátides alongadas e espermatozoides. Em ovinos, a espermatogênese tem duração de 45 dias, e este espermatozoides seguem para o epidídimo, permanecendo em transito epididimário por 15 dias, de modo que a espermatogênese, nesta espécie, tem duração média de 60 dias (EVANS; MAXWELL, 1990).

Em mamíferos com bolsa escrotal, para garantir o processo normal de espermatogênese, os testículos são mantidos de 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal (KASTELIC; COOK; COULTER, 1997). Isto é alcançado pela combinação do escroto, testículos e vascularização testicular (COOK; COULTER; KASTELIC, 1994). A artéria testicular altamente espiralada e associada a uma complexa rede venosa (plexo pampiniforme), que são coletivamente chamadas de cone vascular testicular, permite a troca de calor contracorrente entre os vasos arteriais e venosos, esfriando o sangue arterial antes de

entrar no testículo (COOK; COULTER; KASTELIC, 1994). Além disso, a musculatura escrotal, musculo cremaster e túnica dartos, mantém os testículos distantes ou próximos ao corpo, de acordo com a variação da temperatura ambiente (SETCHELL, 1998). As glândulas sudoríparas presentes no escroto proporcionam o resfriamento evaporativo (BLAZQUEZ; MALLARD; WEDD, 1988), e a radiação do calor da superfície escrotal propicia um resfriamento adicional (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988). O escroto de carneiros apresenta um gradiente de temperatura positivo entre a região proximal e distal do testículo, que pode chegar a 2,8 °C e tem estreita relação com a temperatura testicular (KASTELIC; COOK; COULTER, 1999). A temperatura escrotal é regulada primariamente pelo escroto, sendo capaz de influenciar diretamente a temperatura intratesticular (THUNDATHIL *et al.*, 2012). Vale ressaltar que o sistema contracorrente só tem eficácia quando há um gradiente de temperatura entre o sangue arterial e venoso (WAITES; MOULE, 1961).

Com a elevação da temperatura testicular há também aumento do metabolismo e utilização de oxigênio, entretanto o fluxo sanguíneo permanece constante resultando em hipóxia (SETCHELL, 1998). Contrariamente a este dogma, Kastelic *et al.* (2017) relataram que a principal causa da redução da motilidade e normalidade espermática em carneiros é a hipertermia testicular, já que um estado de hiperoxia não foi capaz de evitar as alterações espermáticas.

O aumento da temperatura testicular, devido a elevada temperatura ambiente é uma das causas mais comuns de sub/infertilidade em animais, prejudica a espermatogênese e reduz a qualidade seminal e a produção espermática, de modo que os espermatócitos em paquíteno, espermátides e espermatozoides epididimário são as células mais susceptíveis (SETCHELL, 1998), provavelmente devido ao remodelamento da cromatina nestas fases, culminando com o comprometimento da espermatogênese (RAHMAN *et al.*, 2011). Esta

sensibilidade tem sido relatada em homens (XIA *et al.*, 2015), ratos (PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009), touros (VOGLER *et al.*, 1991) e carneiros (MIEUSSET *et al.*, 1991).

A elevação da temperatura testicular e epididimária resulta em alterações na morfologia espermática (BARTH; BOWMAN, 1994), motilidade (MOREIRA; MOURA; ARAÚJO, 2001; NEWTON *et al.*, 2009), viabilidade (VOGLER *et al.*, 1991), capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário (FERNANDES *et al.*, 2008; WALTERS *et al.*, 2005), reduzindo assim a qualidade espermática, podendo caracterizar um processo de degeneração testicular (MOULE; WAITES, 1963), nomeada de atrofia testicular mista (DEVKOTA *et al.*, 2010).

A degeneração testicular é um processo importante na reprodução de machos pois está negativamente associada a motilidade e normalidade espermática, estresse oxidativo, fragmentação do DNA, desenvolvimento embrionário podendo ainda, alterar a concentração de testosterona (BYERS; GLOVER, 1984; HAMILTON *et al.*, 2016; PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009). De acordo com Jubb *et al.* (1985) e Roberts (1986), a degeneração testicular pode ser resultante, além de influências térmicas, de infecções, desequilíbrios nutricionais, problemas circulatórios nos testículos, lesões obstrutivas, alterações hormonais, traumas, idade, processos autoimunes, agentes tóxicos, entre outros fatores.

A redução da circunferência, volume e consistência testicular (ROCHA *et al.*, 2015), que reflete a atrofia e desorganização dos túbulos seminíferos, com conseqüente vacuolização (DEVKOTA *et al.*, 2010; HENNING *et al.*, 2014), redução também diminui a função das células de Sertoli e Leydig, do fluido da rete testis, e aumenta os níveis de FSH (AKTAS; KANTER, 2009; FRIDD *et al.*, 1975), que culminam com baixa qualidade espermática, caracterizam um quadro de degeneração testicular.

A nível experimental, os testículos podem ser submetidos a estresse térmico pelo emprego da insulação escrotal, técnica adequada para ovinos (MOREIRA; MOURA;

ARAÚJO, 2001; ROCHA *et al.*, 2015), bovinos (KARABINUS *et al.*, 1997), equinos (BLANCHARD *et al.*, 2000) e suínos (HORKY *et al.*, 2015), podendo ser contínua ou intermitente (ARMAN *et al.*, 2006; MIEUSSET *et al.*, 1991).

Kastelic *et al.* (1996) demonstraram que a insulação de parte do testículo, resulta em um maior número de espermatozoides anormais, com maiores percentagens de defeitos de cabeça e gotas citoplasmáticas. As anormalidades espermáticas específicas aparecem após intervalos pós insulação escrotal (BARTH; BOWMAN, 1994; FERNANDES *et al.*, 2008; WALTERS *et al.*, 2005) acompanhadas pela redução da motilidade espermática (KASTELIC *et al.*, 2017; THUNDATHIL *et al.*, 2012). O tipo de anormalidade corresponde com o local em que as células germinativas se encontravam no processo espermatogênico quando a temperatura testicular foi aumentada (HALES *et al.*, 2005). Devido à utilização de ATP da fosforilação oxidativa mitocondrial para manutenção da motilidade espermática (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998), o estresse térmico tem um efeito direto na mitocôndria das células germinativas (THUNDATHIL *et al.*, 2012). Além disso, o estresse térmico testicular pode alterar o funcionamento normal do epidídimo, resultando em um rápido trânsito epididimário, o que reduz o tempo de maturação espermática, culminando com grande número de espermatozoides imóveis (XIA *et al.*, 2015).

Este excesso de espermatozoides anormais acentua o estresse oxidativo resultante da hipertermia testicular (SAKKAS *et al.*, 2003). Desta forma, esse excesso de oxidantes pode participar de reações específicas e não específicas com componentes celulares, como lipídeos insaturados, proteínas e DNA, mitocondrial e nuclear, prejudicando os processos celulares normais (SAWYER *et al.*, 2003; GHARAGOZLOO; AITKEN, 2011). Este excesso de espécie reativas a oxigênio ligam-se à membrana dos espermatozoides (HAMILTON *et al.*, 2016) prejudicando sua motilidade e o potencial de fertilização (AGARWAL *et al.*, 2014).

Além de danos estruturais, o estresse oxidativo resulta em maior fragmentação do DNA espermático e anormalidades na cromatina (ALVES *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ *et al.*, 2005), que pode ser induzida pelo radical hidroxila e óxido nítrico durante o transporte através do túbulo seminífero e epidídimo (SAKKAS *et al.*, 2003), resultando em alterações no desenvolvimento embrionário (PAUL *et al.*, 2008; PEÑA *et al.*, 2017).

O plasma seminal, importante modulador da função espermática em ovinos (PINI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2010), tem sua composição alterada em resultado da hipertermia testicular, observada pela maior expressão de proteínas relacionadas à resposta ao estresse, glicólise, reestruturação proteica, e menor expressão de proteínas relacionadas a fertilização, maturação e fertilização (ROCHA *et al.*, 2015; SOLEILHAVOUP *et al.*, 2014). De modo que, proteínas como as *Ram Seminal Vesicle Proteins* (RSVPs), que participam da estabilização da membrana espermática, sendo capazes de preservar a integridade da membrana dos espermatozoides ovinos (BARRIOS *et al.*, 2000; BERNARDINI *et al.*, 2011; MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008), tem sua expressão reduzida devido à elevação da temperatura testicular (ROCHA *et al.*, 2015).

Portanto, o impacto do estresse térmico nos testículos reflete na qualidade do sêmen, provocando alterações espermáticas e na composição do plasma seminal, ambos importantes para a fertilidade. Estas alterações estão diretamente relacionadas ao tempo de exposição às altas temperaturas, o que influencia também na recuperação da função espermática e no reestabelecimento da espermatogênese pós insulto (ARMAN *et al.*, 2006; HAMILTON *et al.*, 2016; KASTELIC *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2015). Assim sendo, a insulação escrotal é um método que permite compreender os efeitos resultantes quando há episódios de elevação da temperatura testicular, similares aos que ocorrem de forma natural por aumento da temperatura ambiente.

2. INTRODUÇÃO

Os efeitos do clima sobre a reprodução dos animais de produção têm sido frequentemente relatados nos últimos anos, devido aos expressivos casos e/ou momentos de subfertilidade de reprodutores decorrente da exposição às elevadas temperaturas do ar, tanto em clima temperado quanto em clima tropical, resultando no decréscimo dos índices produtivos e reprodutivos ocasionados por danos à espermatogênese (MIEUSSET *et al.*, 1992). Tais efeitos podem ser explicados pela termorregulação testicular insuficiente que, em elevadas temperaturas, culmina no aumento da concentração de espécies reativas a oxigênio (ROS) e na apoptose de células germinativas, comprometendo assim o ciclo espermatogênico (DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; ONG, 2015).

Um método eficaz para estudar o efeito da elevação da temperatura testicular sobre a fisiologia reprodutiva de carneiros se dá através da insulação escrotal que é capaz de elevar a temperatura testicular em 2-3 °C, visto que esta pode provocar os mesmos danos ao testículo que uma temperatura do ar elevada, em torno de 40 °C (ARMAN *et al.*, 2006; IBRAHIM *et al.*, 2001). Este aumento de temperatura promove efeito deletério e reversível sobre as características seminais, como a motilidade e concentração espermática (MOREIRA; MOURA; ARAÚJO, 2001), integridade do DNA (CRUZ JÚNIOR *et al.*, 2015), secreções hormonais (BYERS; GLOVER, 1984), bem como a expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD) e *glutathione peroxidase* (GPx), antioxidantes epididimários (HAMILTON *et al.*, 2016), e o proteoma do plasma seminal (SOLEILHAVOUP *et al.*, 2014) alterando assim, a expressão de proteínas relacionadas a proteção, maturação e fertilidade espermática (ROCHA *et al.*, 2015). Dentre as proteínas presentes no plasma seminal de carneiros, as *Ram Seminal Vesicle Proteins* (RSVPs: BSPs ovinas), oriundas principalmente do fluido das vesículas seminais, compõem 30% do proteoma de carneiros Morada Nova (SOUSA *et al.*,

2014), e ligam-se a membrana espermática (SOUZA *et al.*, 2012) sendo capazes de estabilizá-la, estando associadas a capacidade fecundante do espermatozoide (LUNA *et al.*, 2015), bem como a reversão de danos em sua membrana (BARRIOS *et al.*, 2000). Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações na biometria testicular, parâmetros seminais, integridade do DNA, ligação de RSVP às células espermáticas e o proteoma do plasma seminal de carneiros Morada Nova, variedade vermelha, adultos submetidos a insulação escrotal intermitente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

Foram selecionados seis carneiros adultos da raça Morada Nova ($47,4 \pm 3,31$ kg; 2 anos), variedade vermelha, a partir da normalidade anatômico-funcional do sistema reprodutor e a qualidade do sêmen, certificando-se que estes apresentavam padrão seminal normal para a espécie (CBRA, 2013). O experimento foi realizado no Nordeste do Brasil ($3^{\circ} 45' 02''$ S e $38^{\circ} 32' 35''$ O; clima Aw segundo Köppen), durante os meses de outubro de 2014 a março de 2015, de modo que os animais foram mantidos em baias individuais (6 m^2), e alimentados com feno de Tifton (*Cynodon dactylon*), concentrado formulado conforme as recomendações do NRC (2007), água à vontade, e manejados de acordo com o *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Após o período de adaptação, à dieta, rotina de coletas e instalação, os carneiros tiveram seus testículos insulados, por quatro noites consecutivas (6:00 às 18:00) totalizando 48h, com uma bolsa de algodão revestida por duas camadas de plástico, capaz de recobrir todo o escroto sem prejudicar sua circulação, elevando a temperatura escrotal (MOREIRA; MOURA; ARAÚJO, 2001; ROCHA *et al.*, 2015). O sêmen foi coletado por eletroejaculação, desde 14 dias antes a 120 dias após o início da insulação escrotal intermitente. Os parâmetros de circunferência escrotal, motilidade e morfologia espermática, bem como a integridade do DNA e ligação da RSVP ao espermatozoide, também foram avaliados nos períodos pré e pós insulação escrotal. O plasma seminal coletado durante o período experimental foi submetido a eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e os *spots* proteicos diferencialmente expressos em consequência da insulação escrotal intermitente foram identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).

3.2 Parâmetros ambientais, temperatura retal e escrotal de ovinos

Durante todo o período experimental foram coletados os dados de temperatura do ar e umidade relativa do ar do interior da instalação por meio de *datalogger* (AK172, AKSO®). O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado a partir do modelo definido por Thom (1959): $ITU: (0,8 \times T + (UR / 100) \times (T - 14,4) + 46,4)$, onde: T = temperatura do ar (°C) e UR = umidade relativa do ar (%).

Antes das coletas de sêmen foram realizadas, em todos os animais, as mensurações da temperatura retal, utilizando termômetro digital (Incoterm®, São Paulo, Brasil), e da temperatura superficial escrotal por meio de termômetro de infravermelho (Minipa MT-350®, São Paulo, Brasil), apontado diretamente para cada testículo, em sua região medial, e pelos valores das temperaturas do testículo direito e esquerdo, foi obtida a temperatura escrotal média. Enquanto que a temperatura do microambiente promovido pela insulação escrotal foi determinada pela inserção de um termômetro ao interior da bolsa de insulação.

3.3 Avaliação da biometria testicular de ovinos

Antes das coletas de sêmen, foram realizadas as aferições do diâmetro testicular (DT) e circunferência escrotal (CE), com auxílio de paquímetro digital e fita métrica, respectivamente, para posterior obtenção do volume testicular (VT): $VT = 0,0396 \times DT \times CE^2$ (LUNSTRA; GREGORY; CUNDIFF, 1988).

3.4 Coletas, avaliação e processamento do sêmen

Amostras de sêmen dos carneiros foram coletadas por eletroejaculação (Torjet-65; Neovet, Minas Gerais, Brasil). Alíquotas de sêmen foram utilizadas para avaliação da motilidade massal (0-5) em microscopia de campo claro (aumento: x 100) e outra gota diluída (1:1) em PBS (tampão fosfato salino; pH 7,4) pré-aquecido a 37 °C e posicionada em lâmina sob lamínula para avaliação da motilidade individual progressiva (0-5) e do percentual de espermatozoides móveis em microscopia de campo claro (aumento: x 400; EVANS; MAXWELL, 1990). Para a avaliação da morfologia espermática foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol (OLIVEIRA *et al.*, 2009) e estas lâminas avaliadas em microscopia de campo claro (200 células/ animal/coleta de sêmen; aumento: x 1000 sob óleo de imersão). Uma alíquota de sêmen foi diluída (1:200) em formol salino tamponado para estimativa da concentração espermática em espectrofotômetro (SP 1105, Bel Photonics®) através da transmitância sob comprimento de onda de 490 nm. Ao sêmen restante foi adicionado inibidor de protease (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) e, em seguida, centrifugado (700 x g, 15 minutos, 4 °C). O plasma seminal sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado (5000 x g, 15 minutos, 4 °C), sendo o novo sobrenadante armazenado a -20 °C.

3.5 Avaliação da integridade da cromatina espermática

Após cada coleta, uma alíquota de sêmen foi destinada ao teste de dispersão da cromatina para avaliação da integridade do DNA espermático (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003, 2005). A alíquota de sêmen foi diluída (1:1) em PBS e, desta solução, 25 µL foram adicionados a 50 µl de agarose “*low gelling temperature*” e gentilmente misturados. Em

seguida, alíquotas de 2 μ L desta mistura foram aplicadas sobre lâminas previamente tratadas com 0,65% Agarose NA e cobertas com lamínulas. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a 4 °C por 5 minutos e em seguida removidas gentilmente e, incubadas em solução de HCl 0,08 N por 7 minutos na ausência de luz. Após este período, as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2 M, SDS 0,5%, Triton-X 0,3%, EDTA 0,02 M, β -mercaptoetanol 2 M e Tris-Cl 0,2 M) por 25 minutos. Após este tratamento as lâminas foram submersas em água destilada por 5 minutos e, em seguida, tratadas com etanol (70%, 90% e 95%, 2 minutos em cada concentração). Por fim, as lâminas foram secas ao ar, em temperatura ambiente (27 °C), e coradas com reagentes panóticos (Intant-Prov[®], NewProv, Brasil). Após confeccionadas, as lâminas foram avaliadas sob microscopia óptica (magnificação: x 1000, sob óleo de imersão), pela contagem de 500 espermatozoides classificando-as em células com halo (DNA íntegro; Figura 5B), sem halo (DNA fragmentado; Figura 5C) e células sem halo e degradadas (células não coradas; Figura 5D).

3.6 Imunocitoquímica das proteínas RSVP nos espermatozoides de ovinos pré e pós insulação

A imunocitoquímica das proteínas RSVP nos espermatozoides de ovinos antes (dia 0) e após a insulação escrotal (dia 4) foi realizada conforme Rodríguez-Villamil *et al.* (2016) com algumas modificações. Resumidamente, imediatamente após a coleta do ejaculado, uma alíquota do sêmen foi centrifugada à temperatura ambiente (27 °C, 700 x g, 15 minutos) para separar os espermatozoides do plasma seminal. Em seguida, 1×10^7 espermatozoides foram lavados duas vezes com PBS, aderidos em lâminas revestidas com poli-L-lisina e fixados com paraformaldeído a 2%, durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, as células espermáticas foram lavadas novamente com PBS contendo 0,3% de Tween-20

(PBS-T) e incubadas em solução de bloqueio de 5% de BSA em PBS-T, durante 1 hora a 4 °C. As lâminas foram então incubadas durante 1 hora a 4 °C com o anticorpo primário anti-RSVP de carneiro produzido em coelho, policlonal, na diluição de 1:500 em solução contendo 2% de BSA em PBS-T. Logo em seguida, os espermatozoides foram lavados três vezes com PBS-T e incubados em câmara escura, por 1 hora em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, produzido em burro, conjugado com FITC (Fluorescein-isothiocyanate; 1:300, Santa Cruz, EUA) diluído em PBS-T. As células espermáticas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T, incubadas com 2,5 mg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Life Technology, EUA,) durante 10 minutos à temperatura ambiente, e lavadas com PBS durante 1 minuto. Todas as lâminas foram cobertas com reagente anti-esmaecimento (ProLong-Gold, Invitrogen Corp., EUA), montadas com lamínulas e analisadas por microscopia confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha) sob aumento de 1000x em objetiva de imersão. As imagens foram digitalizadas pelo programa computacional ZEN 2011 (Zeiss, Alemanha). Para os controles negativos foram utilizados espermatozoides epididimários de ovinos proveniente de abatedouro.

3.7 Eletroforese bidimensional

Com base na motilidade total e integridade do DNA foram escolhidos oito momentos, sendo dois pré e seis pós insulação, para realização da eletroforese 2-D de proteínas do plasma seminal: dias -14, 0 (pré-insulação), 7, 18, 28 (motilidade total: 0%), 48, 77 (parâmetros seminais reestabelecidos) e 120 (integridade do DNA reestabelecida). Alíquotas do plasma seminal foram previamente descongeladas para determinação da concentração total de proteína (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) como padrão.

A eletroforese do plasma seminal foi conduzida como descrita anteriormente (ROCHA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2012), com algumas modificações. Deste modo, amostras de plasma seminal contendo 700µg de proteína total foram misturadas a tampão de hidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 65 mM DTT (dithiothreitol), 0,5% anfólitos (IPG buffer, 4–7), 0,5% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimetilammonio]-1-propanesulfonate) e traços de azul de bromofenol) suficiente para obter 340 µL. Então, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente *overnight* com tiras de 18 cm (pH 4-7, linear, GE Lifesciences, Piscataway, NJ, USA). A focalização isoeétrica foi realizada utilizando focalizador isoeétrico ETTAN IPGphor 3 (GE LifeSciences), a 20 °C, de acordo com a seguinte programação: 200 V (3 h), 500 V (1h), 1 kV (10 min), 1 kV (30 min), 5 kV (1h), 10 kV (54 kVh), totalizando 60 kVh. Após a focalização, as proteínas tiveram suas ligações dissulfeto reduzidas pela incubação das tiras por 15 minutos com tampão de equilíbrio I (6 M uréia, 50 mM Tris–HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT), e, em seguida, alquiladas por incubação com tampão de equilíbrio II (similar à solução I, mas contendo 2,5% de iodoacetamida ao invés de DTT) também por 15 minutos. Posteriormente, as tiras foram fixadas com agarose (5% in SDS-PAGE running buffer) acima do gel de poliacrilamida (SDS-polyacrylamide gels, 12,5%) e fixadas com agarose, e então separadas de acordo com sua massa molecular (500 V e 40 mA por gel; Ettan™ Dalt Six, GE Lifesciences, USA). Após a eletroforese, os géis foram submersos em solução de fixação (metanol: 30%; e ácido fosfórico: 2%) por 18 horas. Em seguida, os géis foram lavados três vezes por 20 minutos com solução de ácido fosfórico (2%), e então colocados em solução com ácido fosfórico (2%), metanol (18%) e sulfato de amônio (15%) adicionado de *Coomassie* G-250 (2%) por 72 horas (ROCHA *et al.*, 2015). Os reagentes utilizados para eletroforese foram adquiridos da Bio-Rad, GE Lifesciences e Sigma Aldrich.

3.8 Análises dos mapas proteicos

Os géis bidimensionais foram digitalizados a 300 dpi (ImageScanner III[®]; GE Lifesciences, USA), salvo como *tagged image file format* (.tiff) e analisados usando o software PDQuest[®], versão 7.3.0 (Bio-Rad, USA). Para esta análise, foram formados 8 grupos, em relação aos momentos pré e pós insulação (pré-insulação: dia -14: 6 géis; dia 0: 6 géis; pós-insulação: dia 7: 6 géis; dia 18: 6 géis; dia 28: 6 géis; dia 48: 5 géis; dia 77: 6 géis; dia 120: 6 géis), para obtenção de seu respectivo gel master e então submetidos a ferramenta “*compare experiments*” do software PDQuest[®], que agrupa as intensidades dos *spots* em um único gel master. *Spots* presentes em diversas regiões dos géis foram usadas como referência de forma que todos os *spots* fossem corretamente associados ao seu correspondente em cada um dos géis analisados. A quantificação dos *spots* proteicos nos géis foi dada em partes por milhão (ppm) do total da densidade óptica integrada dos *spots* de acordo com o PDQuest[®].

3.9 Digestão dos *spots* proteicos

Os *spots* separados por eletroforese bidimensional e diferencialmente expressos durante o período experimental, de acordo com a análise estatística, foram descorados e submetidas a digestão com tripsina (MARTINS *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2007). Cada *spot* foi cortado, transferido para tubo limpo e lavado três vezes com solução contendo acetonitrila (50%) e bicarbonato de amônia (50%; 25 mM a pH 8.0) e, novamente lavado duas vezes com 200 µl de acetonitrila por cinco minutos e secos a temperatura ambiente. Os pedaços de géis foram incubados com tripsina (166 ng por *spot*; Promega, cat #v511; Madison, WI, USA) por 20 horas a 37 °C. Em seguida, os peptídeos foram extraídos por lavagem tripla com 5% de ácido trifluoroacético, 50% de acetonitrila, em bicarbonato de amônio (50 mM) durante 30

minutos. Os sobrenadantes foram concentrados em microtubos e secos sob vácuo (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA).

3.10 Identificação das proteínas usando espectrometria de massa (ESI-Q-ToF)

Os peptídeos foram separados em coluna C18 BEH300 (100 μm \times 100 mm) usando o sistema nanoAcquity™ (Waters Corp., USA) e eluídos a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ com gradiente de acetonitrila (5–85%) contendo 0,1% de ácido fórmico. O sistema de cromatografia líquida foi conectado a uma fonte de ionização de massa nanospray (SYNAPT HDMS system, Waters Corp., USA). O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo usando capilar a 90 °C e voltagem de 3,5 kV. A calibração do instrumento foi realizada utilizando fragmentos de [Glu1]-fibrinopeptídeo B duplamente protonado (m/z 785,84), e o Lock-mass usado durante aquisição foi o íon intacto. O procedimento LC–MS/MS foi realizado de acordo com o método de aquisição de dados-dependente (DDA), selecionando MS/MS de íons precursores de dupla ou tripla carga. Os íons foram fragmentados por dissociação de colisão induzida usando argon como gás de colisão e rampa de energia de colisão que variou de acordo com o estado de carga do íon precursor selecionado. A coleta dos dados foi feita num alcance de m/z de 300–2100 para a amostragem de MS (1 escaneamento/s), identificando íons com m/z variando entre 50–2500 para MS/MS. Os dados foram coletados com o software MassLynx 4.1, processados utilizando o servidor Protein Lynx Global Server 2.4 (Waters Corp.) e foram convertidos em arquivo de texto de lista de picos (.pkl) para busca nos bancos de dados. Os arquivos .pkl foram submetidos ao servidor Mascot (Matrix Science, London, UK, v.2.6) e associados aos bancos de dados NCBIprot para outros mamíferos. As buscas foram feitas de acordo com o seguinte critério: perda de no máximo uma clivagem tríplica, peptídeos monoisotópicos com carga de +1, +2 e +3, com oxidação de resíduos de metionina

variável e variação fixa de resíduos de cisteína carbamidometilados usando modo de busca íon espectro MS/MS. A tolerância utilizada para massa de peptídeo e fragmento de massa foi $\pm 1,2$ Da e $\pm 0,6$ Da, respectivamente.

3.11 Análises de Ontologia Gênica e Interação entre Proteínas

As proteínas identificadas (tabela 2) foram analisadas por meio do programa STRAP (Boston, MA). Os termos da ontologia gênica para os processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares foram obtidas da base de dados do UniProtKB (BHATIA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2015). Já as interações interproteicas das proteínas que tiveram suas expressões aumentadas ou diminuídas em função da insulação escrotal intermitente foram analisadas por meio da base de dados STRING v.10.5 (<http://string-db.org>).

3.12 Análise estatística

O experimento foi conduzindo sob delineamento em blocos casualizados, onde foram avaliados os períodos em relação à insulação escrotal, e os animais considerados os blocos. Todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e por suas assimetrias e curtoses, por meio do procedimento UNIVARIATE do SAS (2002), sendo transformadas por $\log(x+1)$ ou $\arcsen(\sqrt{x/100})$, quando necessário. As variáveis paramétricas foram avaliadas por análise de variância por meio do procedimento GLM do SAS e as médias comparadas pelo teste t. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os períodos pelo teste de Friedman (SAMPAIO, 2002). Inicialmente realizou-se uma ordenação das variáveis pelo procedimento RANK do SAS. Em

seguida, as variáveis ordenadas foram avaliadas pelo GLM do SAS e as médias comparadas pelo método dos quadrados mínimos (IPE, 1987).

Para a análise estatística das diferenças entre as intensidades dos *spots* foram utilizados géis do plasma seminal obtido antes da insulação e após a insulação em diferentes momentos quanto à qualidade do ejaculado. Os efeitos de tratamentos, de período em relação à insulação escrotal e da interação entre ambos e as médias foram comparadas por meio do teste de Friedman, segundo Ipe (1987).

4. RESULTADOS

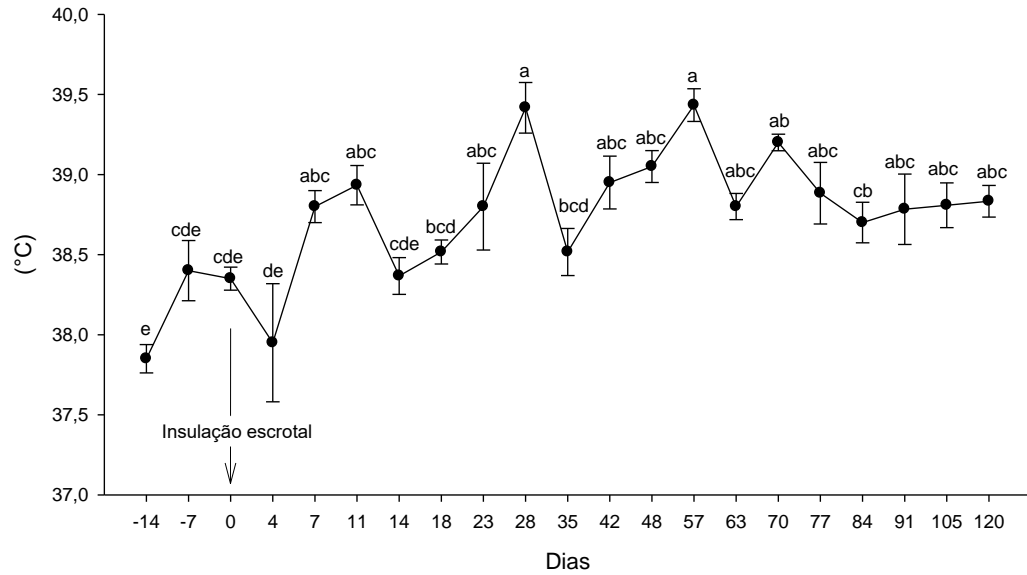
Os dados ambientais, obtidos no interior das instalações, de temperatura ambiente, umidade relativa do ar e o índice de temperatura e umidade médios, bem como seus valores máximos e mínimos, para o período experimental, são apresentados na tabela 1. Pode-se observar que, mesmo os animais abrigados, estão sujeitos à estresse térmico, já que segundo o segundo Hahn (1985), observou-se uma situação de perigo ($79 < ITU > 83$).

Tabela 1. Dados climáticos obtidos durante o período experimental, pré e pós insulação, e nas noites de insulação escrotal (media \pm erro-padrão).

Valores	Período experimental			Noites de insulação		
	Temperatura ambiente (°C)	Umidade relativa do ar (%)	ITU	Temperatura ambiente (°C)	Umidade relativa do ar (%)	ITU
Média	28,1 \pm 0,01	76,1 \pm 0,03	79,2 \pm 0,01	27,2 \pm 0,01	77,4 \pm 0,07	78,0 \pm 0,01
Máxima	33,0	98,4	85,2	28,4	81,8	79,2
Mínima	23,8	50,2	74,1	26,4	68,5	77,0

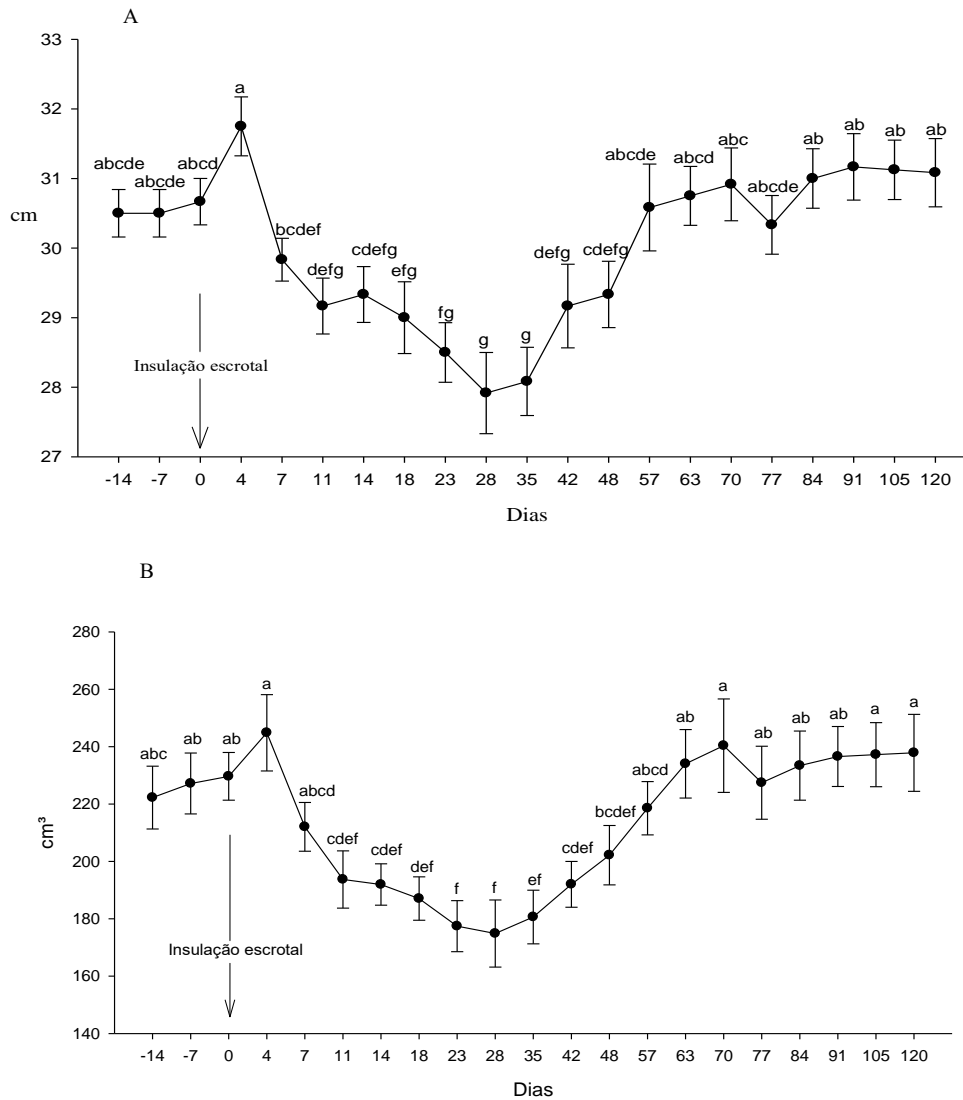
A temperatura interna da bolsa de insulação chegou a $38,1 \pm 0,2$ °C, criando um microambiente 11 °C mais quente que a temperatura ambiente nas noites de insulação ($27,2 \pm 0,01$ °C), resultando em aumento de 2 °C na temperatura testicular ao final das noites de insulação escrotal (6:00 h). A temperatura retal dos animais variou em relação à insulação escrotal, apresentando elevação do dia 14 ao dia 28, retornando aos valores normais, pré-insulação, ao dia 77 (Figura 1).

Figura 1. Temperatura retal de ovinos morada nova submetidos a insulação escrotal intermitente.



A circunferência escrotal foi aumentada em $1,1 \pm 0,5$ cm ao fim da insulação escrotal, entretanto, sofreu redução de 10% ao dia 28, em relação aos valores pré-insulação, retornando ao normal no dia 57 (Figura 2A), bem como o volume testicular, que possui relação direta com a circunferência escrotal, acompanhou o mesmo padrão de elevação, redução e recuperação (Figura 2B).

Figura 2. Valores de circunferência escrotal (A) e volume testicular (B) de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.



Os parâmetros de motilidade massal, motilidade individual progressiva e a motilidade total foram reduzidos devido à insulação escrotal (Figura 3A-C), de modo que não foi observada motilidade ao dia 23, sendo reestabelecida ao dia 77. A concentração espermática alcançou menor valor ao dia 23, e retornou à normalidade ao dia 57 (Figura 3D). O percentual de células normais foi reduzido para 76,9% (dia 7), apresentando menores valores no dia 35, retornando à normalidade apenas ao dia 91 (Figura 4).

Figura 3. Valores de motilidade massal (A), motilidade individual progressiva (B), percentual de espermatozoides móveis (C) e concentração espermática (D) de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.

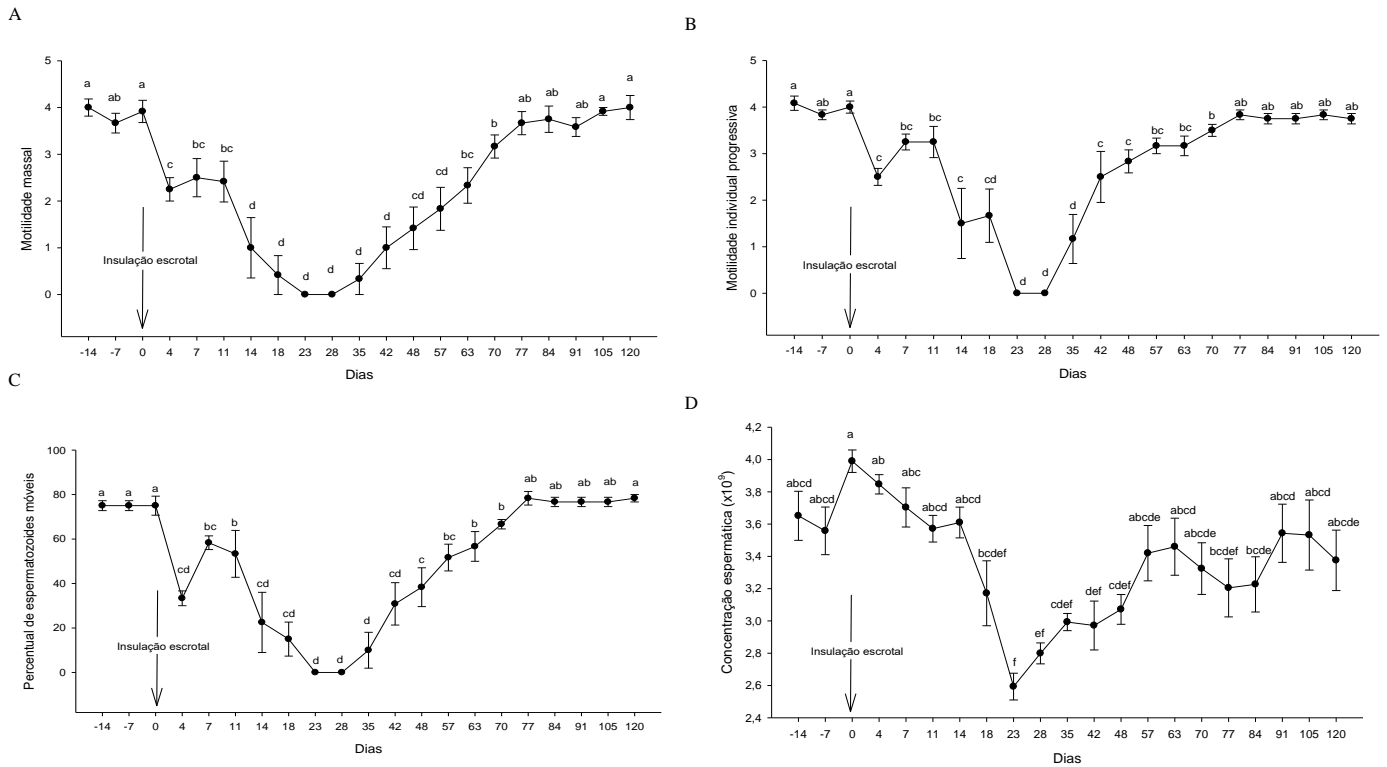
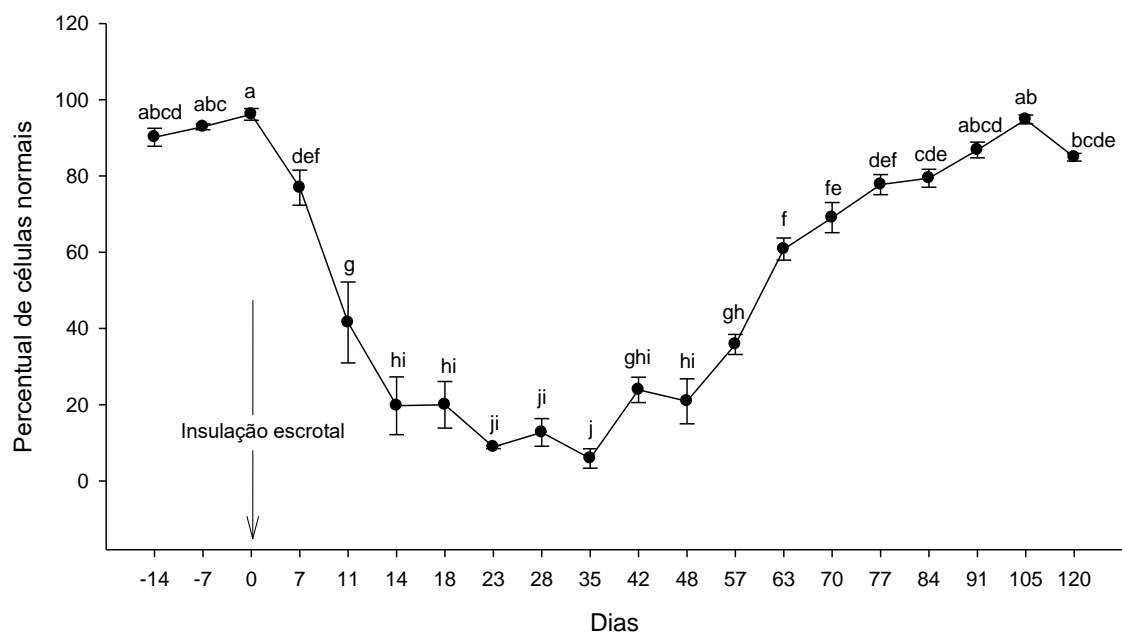
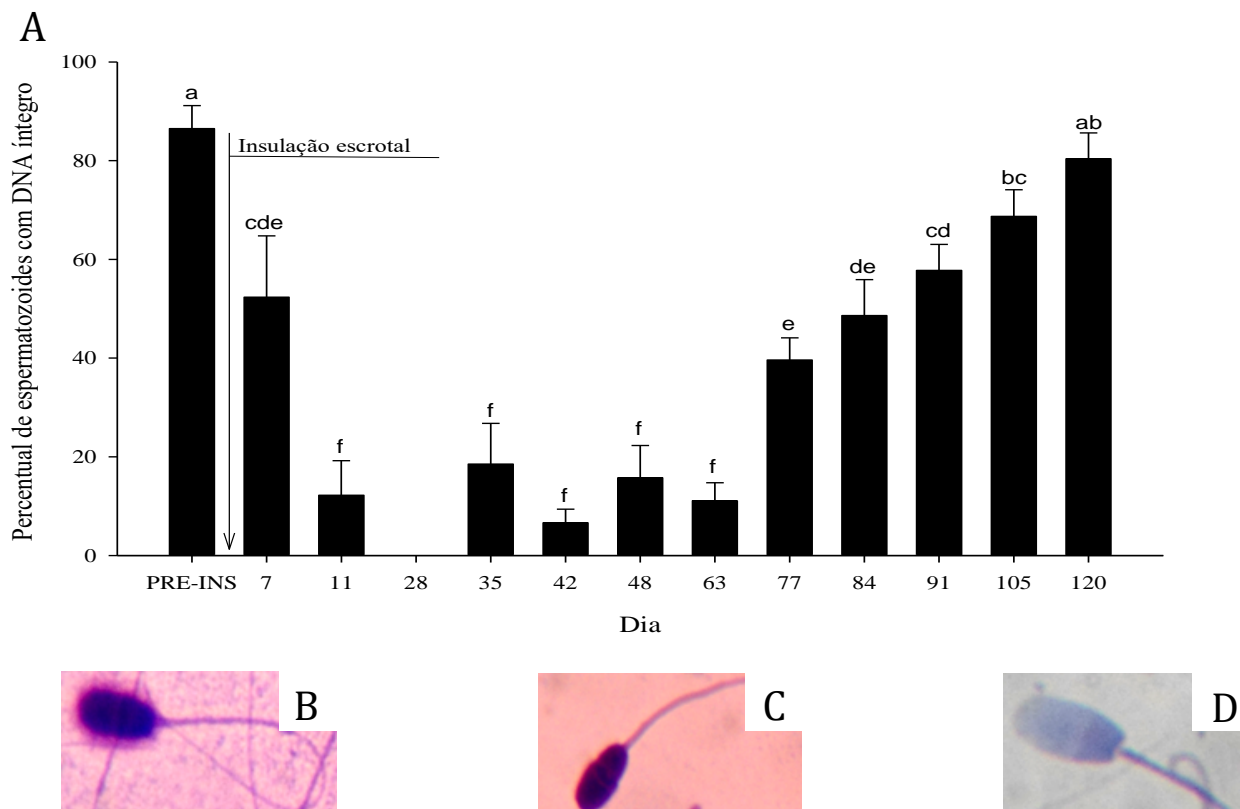


Figura 4. Percentual de espermatozoides normais de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.



A insulação escrotal intermitente reduziu a integridade do DNA das células espermáticas (Figura 5). No período pré-insulação havia uma grande quantidade de espermatozoides com DNA íntegro (86,5%). Entretanto, após a insulação houve uma redução superior a 30% (dia 7), apresentando menores valores entre os dias 11 a 63, iniciando sua recuperação ao dia 77, sendo reestabelecida apenas aos 120 dias após a insulação escrotal.

Figura 5. Integridade do DNA de células espermáticas de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente (A). Espermatozoide com halo (DNA íntegro; B), sem halo (DNA fragmentado), sem halo e degradado (DNA fragmentado; C)



As análises imunocitoquímicas mostraram que houve uma modificação no padrão de ligação das proteínas RSVP e diminuição da imunomarcção dessas proteínas nos espermatozoides ejaculados dos ovinos após a insulação escrotal, de modo que a quantidade de células espermáticas imunomarcadas com RSVP reduziu em 20% (54.9% vs. 34.6%, pré e

pós insulação, respectivamente; figura 6). Antes da insulação escrotal, foi observada marcação das proteínas RSVP no acrosoma, segmento equatorial e pós-equatorial e na peça intermediária dos espermatozoides ovinos (Figura 7A, 7B, 7C). Após a insulação, foi detectada uma baixa intensidade de fluorescência das proteínas RSVP na região da peça intermediária dos espermatozoides de ovinos (figura 7D, 7E, 7F).

Figura 6. Percentual de células espermáticas marcadas para RSVP antes (dia 0) e após (dia 4) insulação escrotal intermitente.

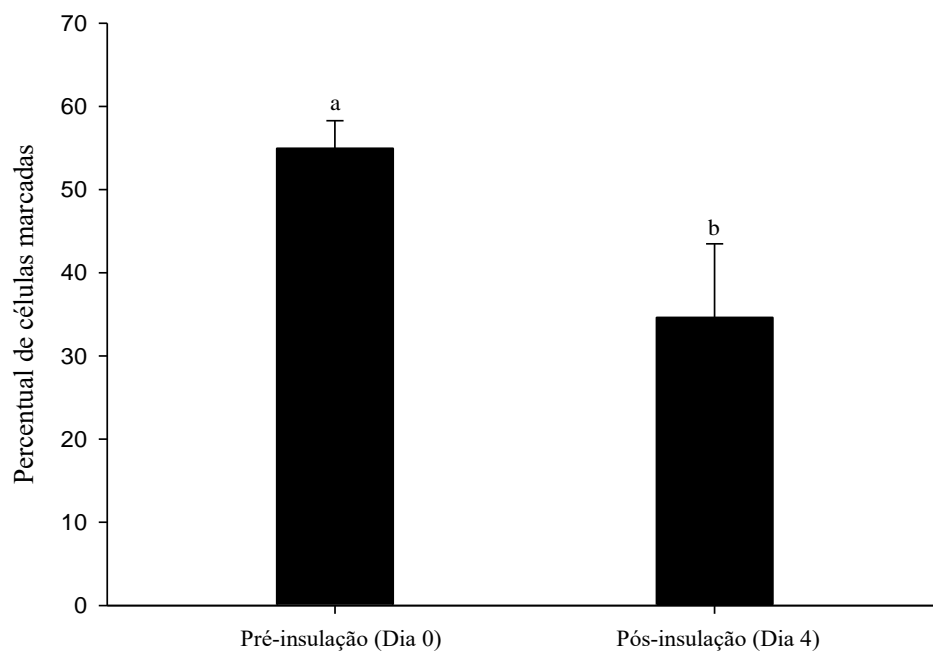
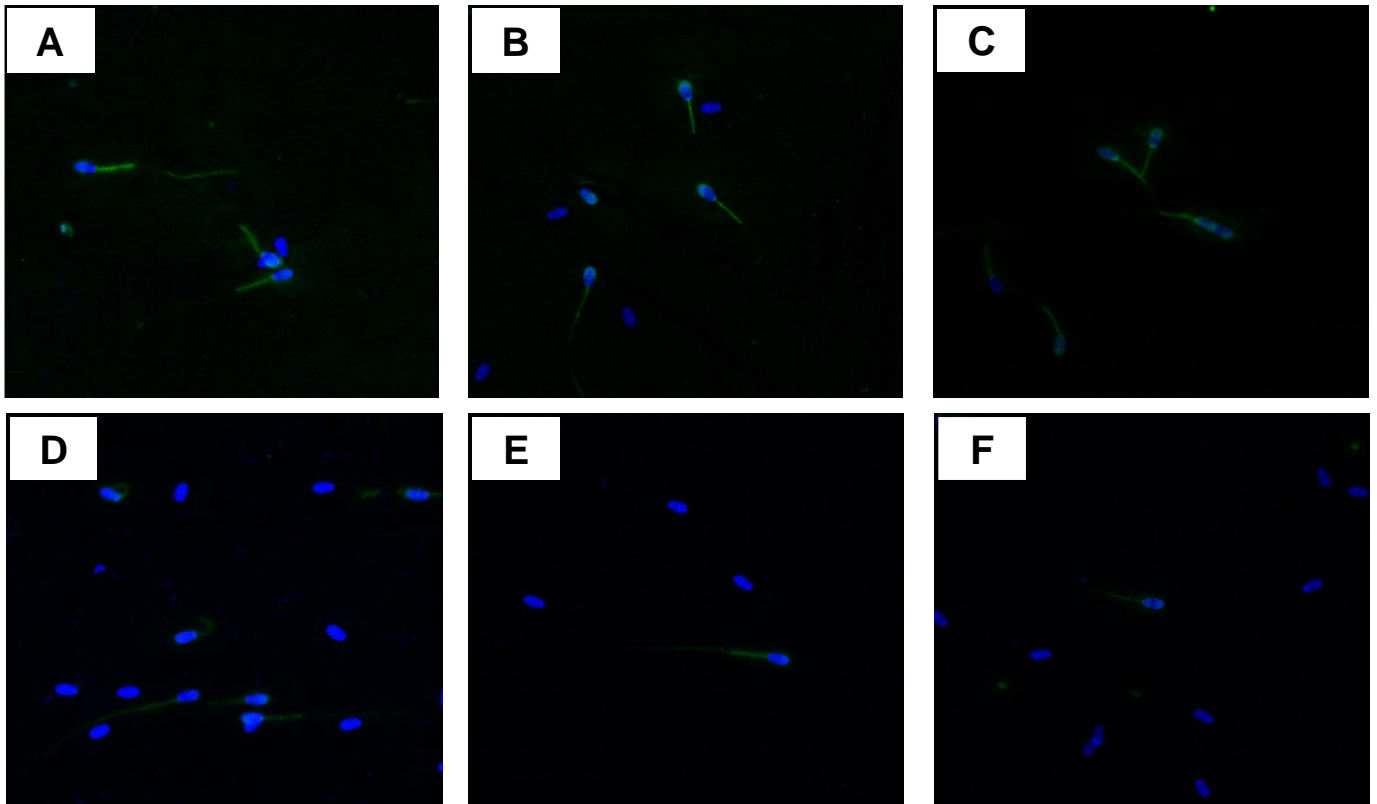


Figura 7. Padrão de ligação da RSVP ao espermatozoide ejaculado antes (dia 0) e após (dia 4) a insulação escrotal intermitente.



Foram detectados 342 *spots* no gel *master* (Figura 8). Ao observarmos os géis *master* dos diferentes momentos, pré e pós insulação (Figura 9), podemos constatar visualmente que há poucas alterações nos mapas proteicos do plasma seminal de carneiros submetidos a insulação escrotal intermitentemente pela utilização de eletroforese bidimensional com uso de tiras de 18 cm e gel de poliacrilamida de 12,5%.

Figura 8. Mapa bidimensional do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente (Master Gel). Os *spots* indicados representam os que foram expressos diferencialmente em função da insulação escrotal, e referem-se aos mostrados no anexo como Tabela 2. As proteínas foram coradas com azul de coomassie coloidal G-250 e identificadas por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF).

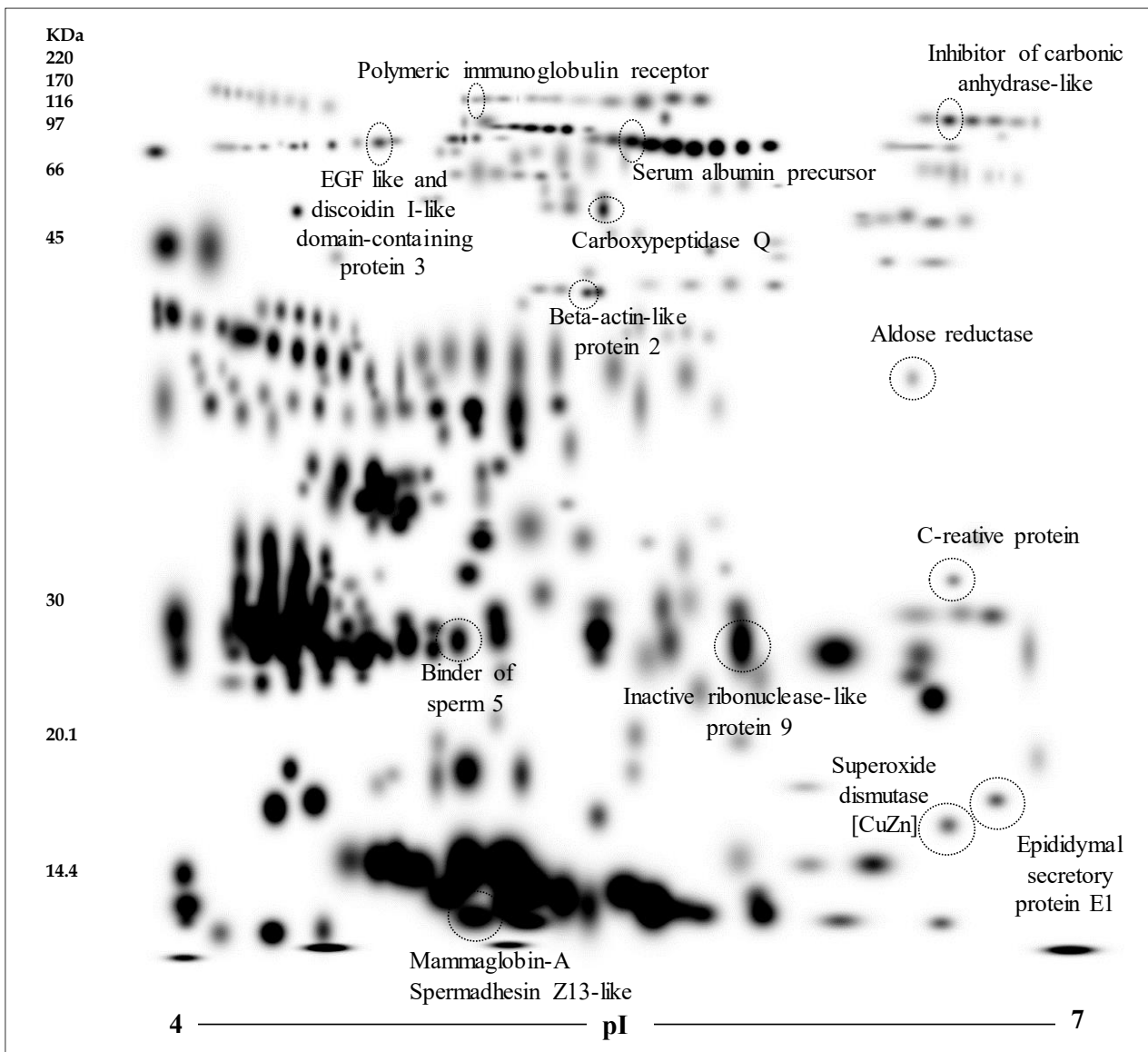
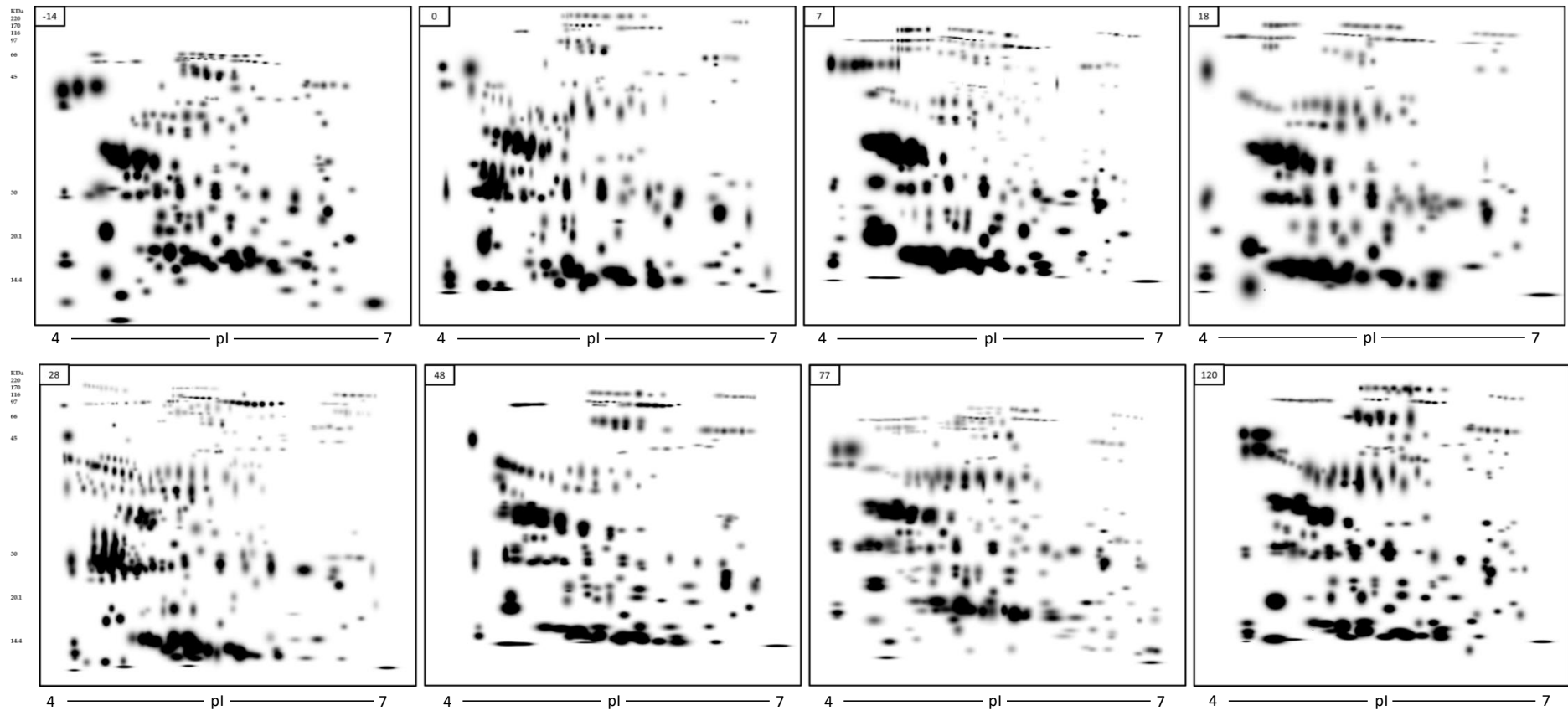


Figura 9. Proteomas do plasma seminal (2D-SDS-PAGE) de carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente referentes aos períodos pré (-14 e 0) e pós insulação (7, 18, 28, 48, 77 e 120). Os géis foram corados com azul de coomassie coloidal G-250 e analisados usando o software PDQuest[®] (Bio-Rad, USA).



Dos 342 *spots* detectados, 13 *spots* mostraram-se diferenciadas e corresponderam a 14 proteínas. Destes, nove tiveram sua expressão reduzida após a insulação escrotal (Figura 10) e foram identificados como *Carboxypeptidase Q precursor*, *Beta-actin-like protein 2*, *Superoxide dismutase [Cu-Zn]*, *Epididymal secretory protein E1*, *Spermadhesin z-13*, *Mammaglobin – A*, *Binder of sperm 5 precursor*, *Aldose reductase*, *C-reactive protein*; enquanto 5 *spots* referentes as proteínas *Serum albumin precursor*, *Inhibitor of carbonic anhydrase-like*, *Inactive ribonuclease-like protein 9*, *EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3* e *Polymeric immunoglobulin receptor* tiveram sua expressão aumentada devido a insulação escrotal intermitente (Figura 11).

De acordo com a análise *in silico* obtida através do STRAP pode-se observar que as proteínas identificadas neste estudo se encontram principalmente no meio extracelular (39%), e participam de diferentes processos biológicos, como regulação (25%), interação com células e organismos (20%), localização (15%), processo celular (10%), além de resposta a estímulos (10%) e sistema imune (10%). No que diz respeito à função molecular, observou-se que 62% destas proteínas possuem função de ligação, 15% atividade catalíticas, 8% atividade antioxidante e 8% atividade estrutural (Figura 12). Já as interações proteicas realizadas *in silico* pela ferramenta STRING (v. 10.5) são apresentadas para os *spots* mais (Figura 13) e menos expressos (Figura 14) após a insulação escrotal testicular intermitente.

Figura 10. Intensidade dos *spots* proteicos do plasma seminal de carneiros Morada Nova, que tiveram sua expressão reduzida após a insulação escrotal intermitente (média \pm erro-padrão). Carboxypeptidase Q precursor (A), Beta-actin-like protein 2 (B), Superoxide dismutase [Cu-Zn] (C), Epididymal secretory protein E1 (NPC2) (D), Spermadhesin z-13 precursor e Mammaglobin-A (E), Aldose reductase (F), Binder of sperm 5 (G), C-reactive protein (H).

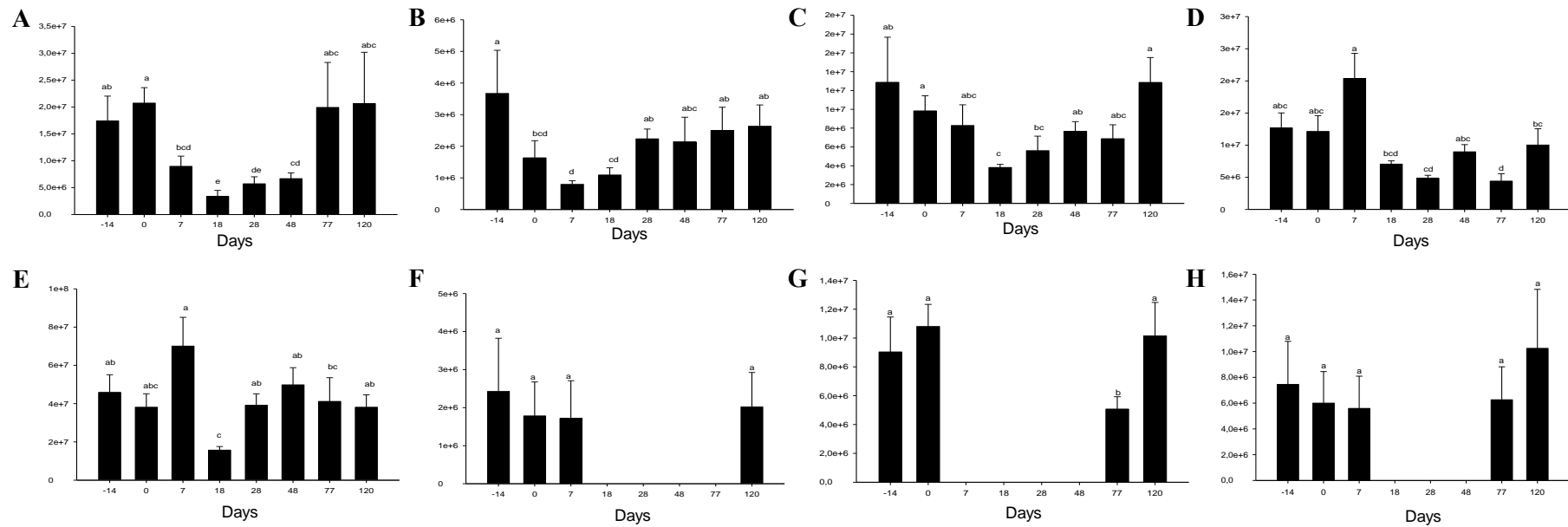


Figura 11. Intensidade dos spots proteicos do plasma seminal de carneiros Morada Nova, que tiveram sua expressão aumentada após a insulação escrotal intermitente (média \pm erro-padrão). Serum albumin precursor (A), Inhibitor of carbonic anhydrase-like (B), EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 (C), Inactive ribonuclease-like protein 9 (D) and Polymeric immunoglobulin receptor (E).

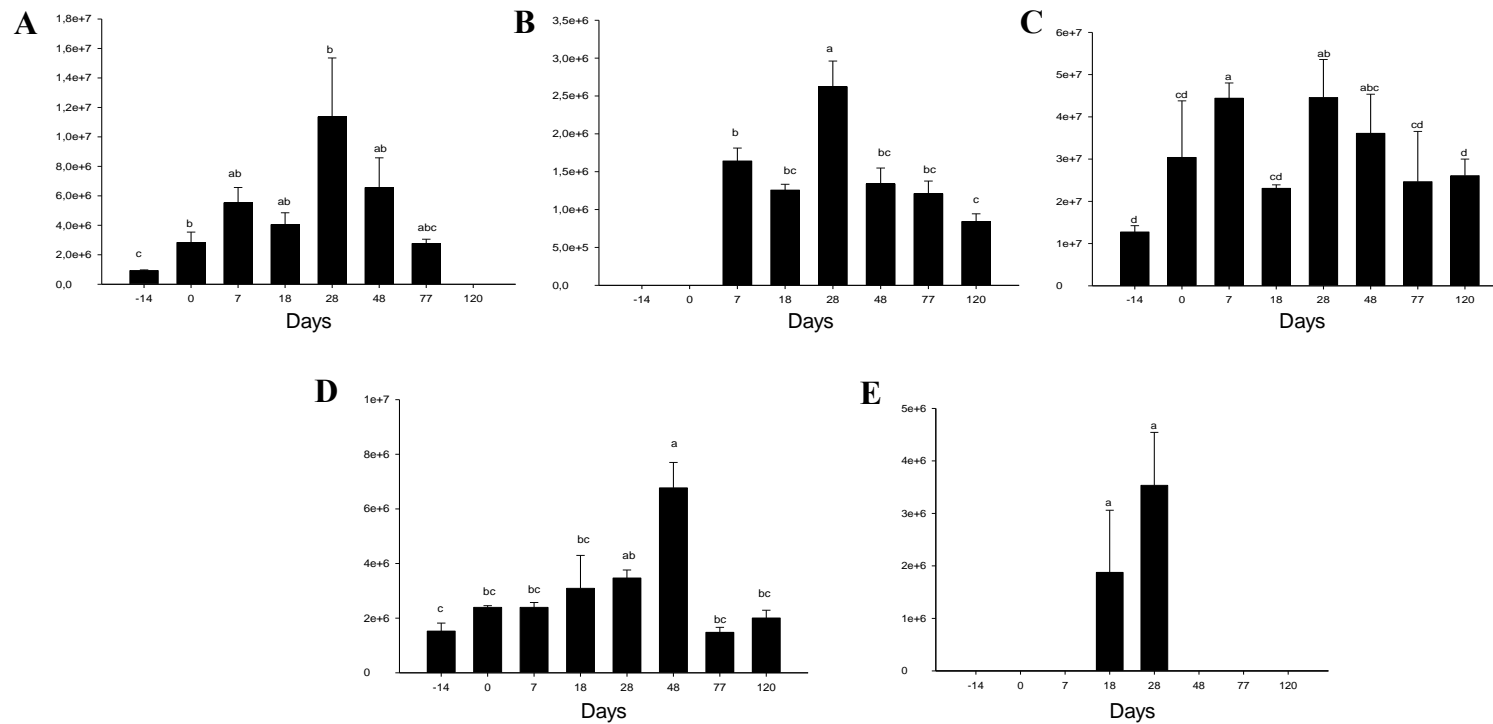


Figura 12. Ontologia gênica das proteínas do plasma seminal de carneiros Morada Nova submetidos à insulação escrotal intermitente diferencialmente expressas, com base nos seus processos biológicos (A), componentes celulares (B) e funções moleculares (C).

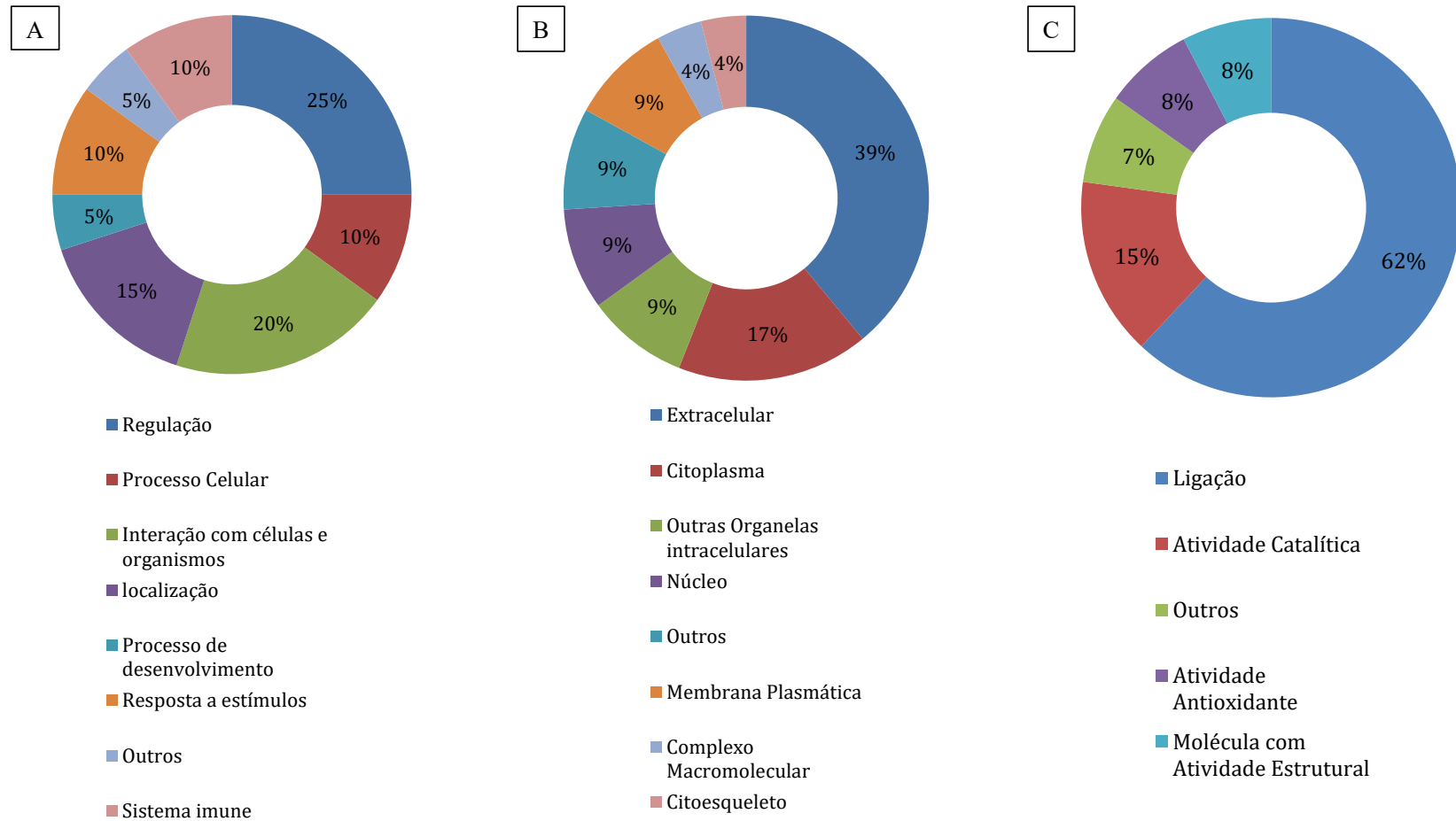
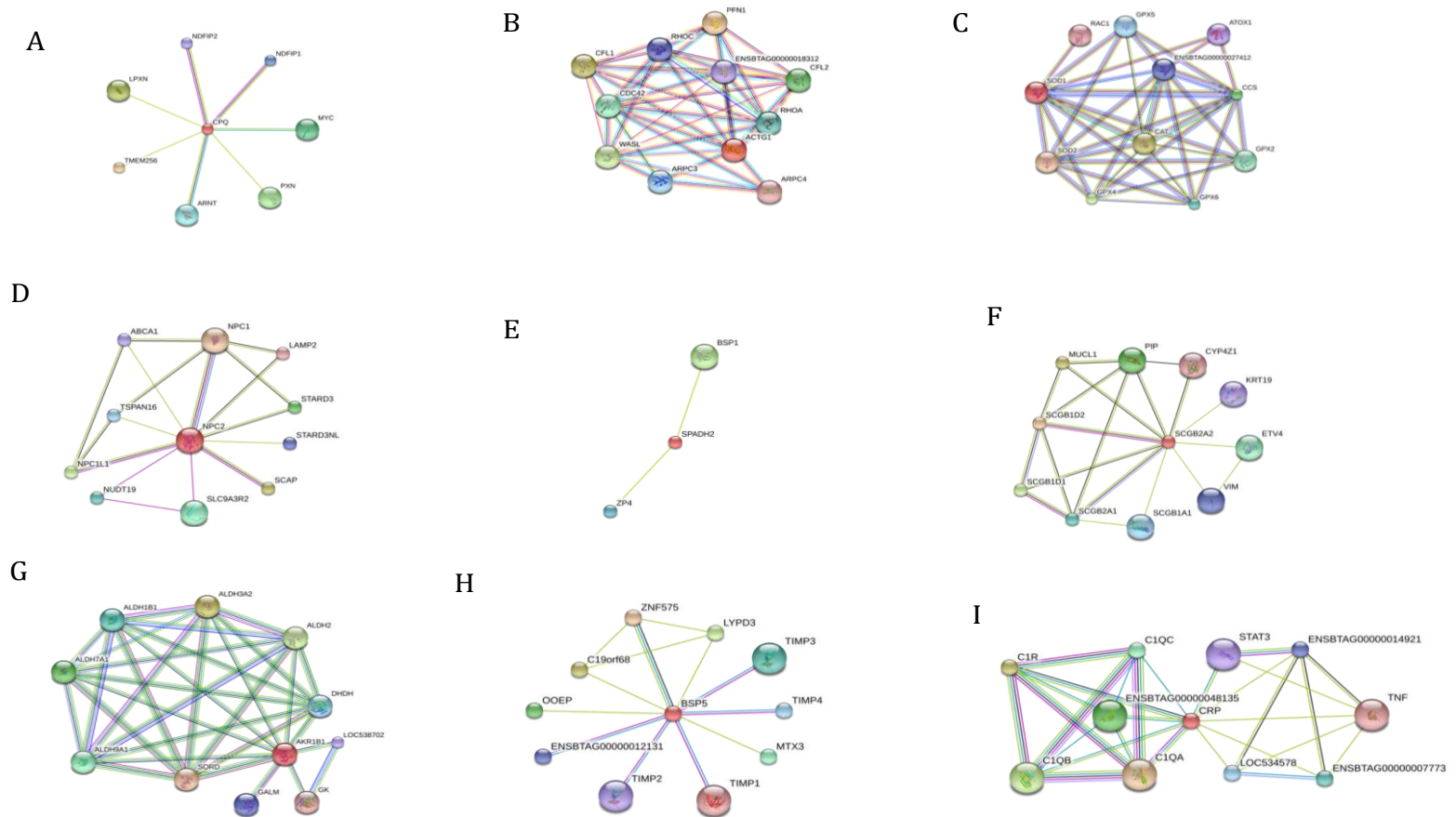
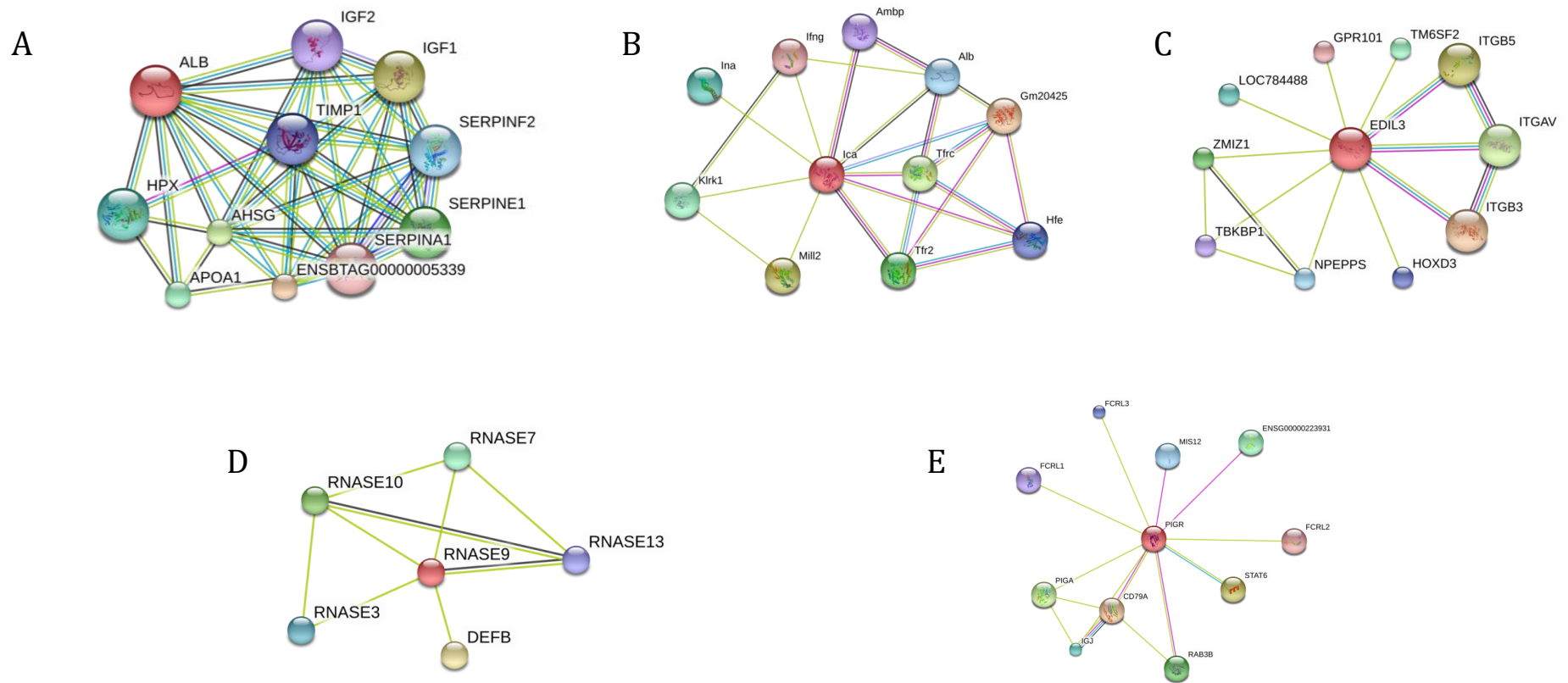


Figura 13. Redes de interação interprotéica das proteínas Carboxypeptidase Q (A; CPQ), Beta-actin-like protein 2 (B; ACTG1), Superóxido Dismutase [Cu-Zn] (C; SOD1), Epididymal secretory protein E1 (D; NPC2), Spermadhezina – Z13 (E; SPADH2), Mammaglobina-A (F; SCGB2A2), Aldose redutase (G; AKR1B1), BSP5 precursor (H: BSP5) e C-Reactive protein (I; CRP) obtidas com base no banco de dados



STRING (v. 10.5).

Figura 14. Redes de interação interproteica das proteínas Serum Albumin precursor (A; ALB), Inhibitor of carbonic anhydrase (B; ICA), EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 (C; EDIL3), Inactive ribonuclease-like protein 9 (D; RNASE9), Polymeric immunoglobulin receptor (E; PIGR) obtidas com base no banco de dados STRING (v. 10.5).



5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram demonstrados os efeitos da insulação escrotal intermitente sobre a biometria testicular, os parâmetros seminais e o proteoma do plasma seminal de carneiros deslanados da raça Morada Nova, variedade vermelha. O aumento da temperatura escrotal verificada neste estudo, causada pela insulação escrotal intermitente, resultou na redução dos parâmetros seminais, volume testicular e integridade do DNA espermático. Isto ocorre devido a inabilidade do animal em manter a temperatura testicular, comprometendo a função testicular e epididimária, aumentando a concentração de espécies reativas a oxigênio (ROS), prejudicando a produção espermática, a integridade de sua membrana e de seu DNA, comprometendo o potencial de fertilização (DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; ONG, 2015).

A temperatura ambiente atua diretamente sobre a termorregulação testicular visto que Hamilton *et al.* (2016) ao insularem os testículos de carneiros por 288 horas (12 dias), a uma temperatura ambiente de 17 °C, não observaram grandes alterações na motilidade espermática, mesmo com uma temperatura da bolsa escrotal de 33,29 °C ± 0,34. Desta forma, as altas temperaturas ambiente observadas durante o presente estudo (25,5 a 29,5 °C) favoreceram o efeito deletério da insulação escrotal, indicando que animais criados em locais com elevadas temperaturas tem uma maior probabilidade em sofrer efeitos deletérios resultantes da hipertermia testicular.

O aumento da biometria testicular observado ao final da insulação escrotal (dia 4), fato também observado por Moreira *et al.* (2001) e Rocha *et al.* (2015), deve-se ao processo inflamatório resultante do insulto testicular devido ao aumento de apoptose (GUAZZONE *et al.*, 2009; SHAHA; TRIPATHI; MISHRA, 2010). Já a redução da circunferência escrotal, principalmente no dia 28, deve-se ao efeito deletério pelo

aumento da temperatura testicular que resulta em alterações histológicas, bem como, sobre a população celular nos túbulos seminíferos causando alterações reversíveis no ciclo espermático (LI *et al.*, 2013; PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009), reduzindo a função das células de Sertoli e a quantidade de esfingomiélin do tipo n-V nos testículos (VALLÉS; AVELDAÑO; FURLAND, 2014) como também, diminuição da população de espermátides (LI *et al.*, 2013), caracterizando um processo de degeneração testicular.

Foi observado que após a insulação escrotal a motilidade espermática reduziu, entretanto, observou-se um aumento no dia 7, que antecedeu sua contínua redução, fato também observado por Arman *et al.* (2006). Certamente, a composição proteica diferenciada das diferentes regiões do epidídimo, como visto por Dacheux *et al.* (2009), pode ter sido responsável pela sobrevivência e manutenção desses espermatozoides.

Pode-se observar que a recuperação da biometria testicular foi coincidente a restauração da concentração espermática, fato justificado pela alta correlação entre a circunferência escrotal e a produção espermática (LANGFORD; SHRESTHA; MARCUS, 1989). A insulação escrotal intermitente, realizada no presente estudo, provocou oligozoospermia, certamente devido ao fato da insulação escrotal ter sido intermitente e de menor duração (ARMAN *et al.*, 2006), diferente dos estudos de Moreira *et al.* (2001) e Rocha *et al.* (2015), realizados na mesma região, utilizando insulação escrotal, o qual relataram azoospermia. Pode-se observar em uma ordem sucessória de eventos que somente após a recuperação do tecido testicular e, conseqüente concentração espermática, seguido pelo reestabelecimento da motilidade é que ocorreu a recuperação da normalidade espermática. A insulação escrotal provoca alterações na morfologia espermática, aumentando a quantidade de células defeituosas (ALVES *et al.*, 2016; BARTH; BOWMAN, 1994), como de espermatozoides com

cabeça piriforme, que está diretamente relacionado a aumento de ROS (SHOJAEI SAADI *et al.*, 2013). Também Oliveira *et al.* (2014) também observaram um maior percentual de espermatozoides morfologicamente anormais 30 dias após o início da insulação escrotal, sendo os parâmetros seminais reestabelecidos 153 após a insulação escrotal.

No presente estudo foi possível verificar que o reestabelecimento da integridade do DNA de espermatozoides ejaculados de ovinos submetidos a insulação escrotal intermitente ocorreu após dois ciclos espermáticos (120 dias; EVANS e MAXWELL, 1990). Diferente deste resultado, Alves *et al.* (2016) relatam a recuperação da quantidade de espermatozoides ovinos com DNA íntegro aos 35 dias pós insulação escrotal. O aumento da temperatura testicular resulta em acúmulo de espécies reativas a oxigênio (HOSSEINIFAR *et al.*, 2013) promovendo alterações biomoleculares que modificam a fisiologia das células espermáticas (PATRICIO *et al.*, 2016), provocando danos à membrana espermática (PARK *et al.*, 2012), reduzindo a quantidade de células vivas, aumentando a concentração do óxido nítrico, a expressão de caspase-3 (LI *et al.*, 2013) e, por fim, fragmentação do DNA espermático (NEZHAD; LAVVAF; KARIMI, 2013). A espermatocitogênese é a fase mais sensível ao estresse térmico resultando em maior grau de fragmentação do DNA, evento este que também está associado a menor expressão de HSP90-alfa, prejudicando a compactação do DNA e sua resistência ao estresse térmico (SALCES-ORTIZ *et al.*, 2015).

A redução do percentual de espermatozoides ejaculados marcados para RSVP pode estar associada tanto a sua menor concentração no plasma seminal quanto a modificações na membrana espermática, devido ao estresse oxidativo provocado pela insulação escrotal, já que ambos podem alterar o padrão e a quantidade de espermatozoides para esta imunomarcagem (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2017;

ODHIAMBO *et al.*, 2014). Entretanto, acredita-se que, devido ao estresse oxidativo, houve alteração da membrana espermática, visto que esta é rica em ácidos graxos poli-insaturados, que por sua vez são altamente sensíveis às espécies reativas a oxigênio (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004), associado a menor expressão de SOD1 observada neste estudo.

Dentre os *spots* que tiveram sua expressão reduzida, a *Carboxypeptidase Q precursor* (CPQ) é caracterizada como uma metaloenzima que participa na motilidade espermática, através da ativação ou inativação de peptídeos hormonais, além de aumentar a concentração de arginina no plasma seminal (SKIDGEL; ERDOS, 1998). Isto sugere que os baixos níveis de CPQ, observados do dia 7 ao dia 48 (Figura 10A), foram também responsáveis pela redução da motilidade dos carneiros submetidos a insulação escrotal, principalmente ao dia 28.

A *Beta-actin-like protein 2* reduziu sua expressão após a insulação (Figura 10B), resultado diferente dos encontrados por Rocha *et al.* (2015) que relatam um aumento de actina após o período de insulação e associa isto a danos celulares no epidídimo e testículos, entretanto, vale ressaltar que estes autores provocaram um estresse térmico testicular severo (8 dias de insulação escrotal). A actina está presente no fluido da cauda do epidídimo e no plasma seminal de ovinos (SOUZA *et al.*, 2012) bem como na membrana de seus espermatozoides (VAN TILBURG *et al.*, 2013). A presença de actina no plasma seminal de touros está associada a danos na membrana espermática (REGO *et al.*, 2014), sendo a actina mais oxidada em resultado à criopreservação (MOSTEK *et al.*, 2017).

A proteína *Superoxide dismutase [Cu-Zn] (SOD1)*, que teve sua expressão diminuída logo ao dia 7 pós insulação retornou ao normal ao dia 77 (Figura 10C), participa no armazenamento dos espermatozoides na cauda do epidídimo protegendo-os

contra o estresse oxidativo mantendo-os viáveis (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2012; PATRICIO *et al.*, 2016; VERNET; AITKEN; DREVET, 2004) justificando o reestabelecimento da motilidade espermática ao dia do reestabelecimento de sua expressão. A redução dos níveis de SOD1 resulta em peroxidação lipídica, danos à membrana espermática e de sua composição (GOPALAKRISHNAN; SHAHA, 1998; GÜRLER *et al.*, 2015) e menor expressão de glutathiona peroxidase e peroxidixina 5 (PARK *et al.*, 2012). Esta redução da SOD1 em função do processo degenerativo provocado pela insulação escrotal também foi observado por Rocha *et al.* (2015). A normalização da quantidade de células espermáticas com DNA não fragmentado aconteceu em associação a normalidade na expressão de SOD1. Desta forma, a menor expressão de SOD1 contribuiu para uma maior fragmentação do DNA espermático, como demonstrado por Hosseinifar *et al.* (2013).

O *spot* identificado como *Epididymal secretory protein E1 (NPC2)* teve menor expressão ao dia 28 (Figura 10D), coincidindo com a ausência de motilidade espermática e maior quantidade de células anormais. A NCP2 secretada em todas as regiões do epidídimo (BELLEANNÉE *et al.*, 2011), encontrada no plasma seminal de ovinos Santa Inês (SOUZA *et al.*, 2012), atua na remodelagem da membrada dos espermatozoides durante o transito epididimário, tendo sua função reduzida quando exposta a alta temperatura (OKAMURA *et al.*, 1999), indicando assim que a insulação escrotal pode ter levado a sua menor expressão e atividade. Mesmo estando negativamente associada ao percentual de espermatozoides normais em touros (BOEHANSEN *et al.*, 2015) e não afetando diretamente a concentração e a morfologia espermática de espermatozoides humanos (SHARMA *et al.*, 2013), sua função no sêmen de ovinos permanece indefinida.

A *Spermadhesin z-13 precursor* e *Mammaglobin-A*, identificadas no mesmo *spot*, apresentaram menor expressão ao dia 18 (Figura 10E), antecedendo a redução total da motilidade. A espermalesina Z13 (SPDH2) está presente nos fluidos das glândulas sexuais acessórias e epididimário de bovinos (MOURA *et al.*, 2007), de modo que, Moura *et al.* (2007) e Kumar *et al.* (2012) propuseram uma relação inversa entre a concentração de espermalesina Z13 e fertilidade de touros, no entanto, Caballero *et al.* (2010) relatam que esta proteína pode estimular a motilidade espermática em concentrações adequadas, atuando ainda na estabilização da membrana espermática (ODHIAMBO; DAILEY, 2011). Assim, a menor expressão de espermalesina Z13 colaborou para a redução da motilidade como relatado por Lee *et al.* (2012).

A *Mammaglobin-A* advinda do gene 101110371, localizado no cromossomo 21 de ovinos, não anteriormente relatada no sêmen de carneiros, é uma glicoproteína que possui homologia com outros membros das famílias secretoglobina-uteroglobina e, o aumento de sua expressão está relacionada ao câncer de mama em humanos (AL JOUDI, 2014; WANG *et al.*, 2009). Boe-Hansen *et al.* (2015) relacionaram a presença da proteína *Secretoglobin 1D*, uma proteína da mesma família, ao percentual de espermatozoides normais aos 24 meses em touros Brahman. Desta forma, a *mammaglobin-A* pode estar associada a normalidade espermática, uma vez que sua menor expressão coincide com o baixo percentual de espermatozoides normais.

O *spot* identificado como *Aldose reductase* não foi detectado, pela técnica de coloração utilizada, a partir do dia 18 retornando ao normal apenas ao dia 120 (Figura 10F). Esta proteína, localizada em diferentes porções do trato reprodutivo do macho, é um dos importantes fatores que conferem capacidade fertilizante ao espermatozoide durante sua maturação (KATOH *et al.*, 2014), pois participa da formação da frutose (FRENETTE; LESSARD; SULLIVAN, 2004), atuando na

modulação da motilidade espermática, estando presente também nos epididimosomos (CABALLERO; FRENETTE; SULLIVAN, 2010), contribuindo para a manutenção do estado quiescente dos espermatozoides no epidídimo (FRENETTE; THABET; SULLIVAN, 2006). Em ovinos, Souza *et al.* (2012) relataram a presença de aldose redutase no fluido da glândula vesicular de carneiros da raça Santa Inês, enquanto Rodrigues (2011) relacionou a maior expressão de Aldose redutase à carneiros com maior percentual de espermatozoides móveis. Portanto, esta não detecção de aldose redutase, que resulta na não formação de sorbitol (HERWIG *et al.*, 2013), responsável pela resistência e sobrevivência espermática durante o trânsito epididimário (FRENETTE *et al.*, 2003) e, o acúmulo de componentes carbonil, ambos colaboraram para redução da motilidade espermática observada neste estudo após a insulação escrotal.

A *Binder of sperm 5 precursor* que corresponde a RSVP20 (NCBI) e a proteína não caracterizada W5PFH1 (UniProt: BSP5a; SERRANO *et al.*, 2015), não foi detectada logo ao final da insulação escrotal, retornando ao dia 77 (Figura 10G), coincidindo ao reestabelecimento da motilidade espermática, fato visto também por Rocha *et al.* (2015), de modo que amostras de sêmen ovino com uma maior quantidade de *RSVPs* estão associadas a elevada quantidade de espermatozoides com membrana e acrossoma íntegros, resultando em maior potencial de fertilização (LEDESMA *et al.*, 2015), podendo permanecer ligada ao espermatozoide mesmo após a capacitação (JOIS *et al.*, 2015).

O *spot* identificado como *C-reactive protein* não foi detectada nos géis do plasma seminal dos dias 18 a 48 (Figura 10H), fato semelhante ao relatado por Soleilhavoup *et al.* (2014), mas contraditório aos resultados de Rocha *et al.* (2015) que relataram uma maior concentração desta proteína no plasma seminal de carneiros

submetidos a insulação escrotal, já que a *C-reactive protein* tem sua expressão aumentada em resposta a processos inflamatórios mostrando atividade pro ou anti-inflamatória (BLACK; KUSHNER; SAMOLS, 2004), como prostatite (GIRGIS *et al.*, 2009; LUDWIG *et al.*, 1998), resultando na aumento de ROS e apoptose (FUJII *et al.*, 2006). No entanto, Rickard *et al.* (2015) associaram a presença de *C-reactive protein* a melhor congelabilidade em carneiros. Assim, a *C-reactive protein* pode ter efeito benéfico sobre o espermatozoide quando em concentrações ideais.

A proteína *Serum albumin precursor* foi mais expressa ao dia 28 (Figura 11A). Rocha *et al.* (2015) observaram também uma maior expressão de albumina ao dia 29 pós insulação. Isso mostra que, independente da intensidade do insulto, visto que os autores trabalharam com insulação contínua, algumas respostas moleculares são semelhantes. Esta maior expressão de albumina pode ser uma resposta do organismo em busca de reverter o quadro de alterações moleculares a fim de alcançar a homeostase epididimária (SOUZA *et al.*, 2011), já que a albumina é um antioxidante não enzimático (SUNIL KUMAR; KATARIA; KUMAR, 2011), abundante nos fluidos da cauda do epidídimo e da glândula vesicular de ovinos (SOUZA *et al.*, 2012), resultando assim, no reestabelecimento dos parâmetros espermáticos dias após seu pico de expressão.

A proteína *Inhibitor of carbonic anhydrase-like (ICA)*, detectada após a insulação escrotal (dia 7), tendo maior expressão ao dia 28 (Figura 11B). Sua proteína alvo, a anidrase carbônica, é encontrada no epidídimo (COHEN; HOFFER; ROSEN, 1976), e atua na regulação do HCO_3^- tanto no espermatozoide quanto nos fluidos do trato reprodutivo, e sua ausência resulta em um menor peso testicular devido a uma redução na população de células germinativas (WANDERNOTH *et al.*, 2015). Além disso, a regulação da concentração de HCO_3^- é um importante fator na manutenção do espermatozoide epididimário (DACHEUX; DACHEUX, 2013). Deste modo, a maior

expressão de ICA parece ter afetado diretamente a função da anidrase carbônica e assim, a homeostase epididimária dos carneiros acarretando na redução da circunferência escrotal e da motilidade (WANDERNOTH *et al.*, 2010).

A *EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 (EGF3)* teve maior expressão ao dia 48, antecedendo a recuperação da circunferência e volume escrotal, bem como da concentração espermática (Figura 11C). A EGF é um citocina, presente nas células germinativas (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1992) secretada principalmente pelas células de Leydig (SHIRAISHI; MATSUYAMA, 2012; YAN *et al.*, 1998), com atuação endócrina durante a espermatogênese por meio de receptores de EGF e vias de sinalização (MAPK e PI3K; Abé *et al.*, 2008) promovendo a proliferação celular por induzir tanto a mitose quanto a meiose de células germinativas presentes nos túbulos seminíferos, atuando assim, diretamente sobre a fertilidade (KUROKAWA *et al.*, 2005). Assim, a EGF pode ter colaborado diretamente para recuperação da biometria testicular, bem como da concentração espermática, por promover a proliferação e diferenciação celular e reduzir o estresse oxidativo e a apoptose como visto por Uguralp *et al.* (2004), Kurokawa *et al.* (2005) e Cheng *et al.* (2006). Além disso, a EGF aumenta a viabilidade espermática de carneiros devido a seu benéfico e protetivo efeito sobre os espermatozoides (MAKAREVICH *et al.*, 2010), reduzindo a quantidade de espermatozoides com danos de membrana, células mortas e células apoptóticas (JASKOVA; PAVLOVICOVA; JURKOVICOVA, 2012), atuando na homeostase epididimária e maturação espermática (ASHRAFZADEH; KARSANI; NATHAN, 2013), contribuindo para o reestabelecimento da normalidade espermática.

A *Inactive ribonuclease-like protein 9 (RNASE9)*, que foi mais expressa ao dia 48 (Figura 11D) tem origem epididimária e pode ligar-se ao espermatozoide na região acrosomal (ZHU *et al.*, 2007), durante o transito epididimário, permanecendo

ligada após a capacitação espermática (CHENG *et al.*, 2009). Além de sua relação com a maturação espermática (WESTMUCKETT *et al.*, 2014), a RNase9 é um dos constituintes imunossupressivos do plasma seminal (TAMBURRINI *et al.*, 1990) atuando na resposta imune (PENTTINEN *et al.*, 2003). Desta forma, a maior expressão de RNase9 pode estar associada ao processo de recuperação celular e funcional do testículo e epidídimo combatendo o processo inflamatório.

Expressa durante os dias 7 e 18 (Figura 11E), a *Polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)* é uma proteína transmembrana de 120 kDa (ASANO; KOMIYAMA, 2011), que está relacionada a resposta imune, sendo responsável pela transferência de imunoglobulinas para as células espermatógenicas (HUANG *et al.*, 2009), de forma que sua maior expressão pressupõe uma maior secreção de IgA e aumento de SIgA (ARMITAGE; O'MEARA; BEAGLEY, 2017). Santos (2015) observou que touros com hipoplasia mostraram maior expressão de *pIgR*, enquanto que, Wang & Yang (2016) detectaram esta proteína na próstata e epidídimo de ratos infectados com clamídia, e Cunningham *et al.* (2008) relataram que ratos *pIgR*^{-/-} apresentaram um maior peso testicular resultante do aumento da infecção por clamídia, demonstrando assim a participação da *pIgR* na resposta imune e homeostase do trato reprodutivo do macho. Esta maior expressão de *pIgR* foi concomitante com um aumento da temperatura retal, bem como, antecedeu a redução da biometria testicular (CE e VT), reforçando a ideia do processo inflamatório causado pela insulação escrotal.

6. CONCLUSÕES

O estresse térmico testicular intermitente é um modelo ideal para estudar os efeitos de períodos curtos de exposição a injúria térmica, provocando, em menor escala, redução na qualidade seminal, em função de degeneração testicular grave.

Este modelo permitiu, ainda, observar que a redução dos parâmetros seminais, principalmente os de motilidade, estão bem relacionados com a expressão de proteínas ligadas a motilidade e fertilidade, devido a alteração da expressão destas após a insulação escrotal intermitente. Além disso, observou-se que estas alterações no proteoma do plasma seminal são correspondentes também com as alterações na biometria testicular, parâmetros seminais e integridade do DNA.

Assim, o modelo reproduz alterações similares que ocorrem no processo de degeneração testicular grave em consequência de insulto térmico ambiental, que determina diminuição da fertilidade em carneiros criados em clima tropical.

REFERÊNCIAS

- ABÉ, K.; ETO, K.; ABÉ, S. Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 7, 6 fev. 2008.
- AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The world journal of men's health**, v. 32, n. 1, p. 1–17, 2014.
- AKTAS, C.; KANTER, M. A morphological study on Leydig cells of scrotal hyperthermia applied rats in short-term. **Journal of Molecular Histology**, v. 40, n. 1, p. 31–9, 2009.
- AL JOUDI, F. S. Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. **The Indian journal of medical research**, v. 139, n. 5, p. 675–85, maio 2014.
- ALVES, M. B. R. *et al.* Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 795–805.e2, ago. 2016.
- ARMAN, C. *et al.* Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 4, p. 411–418, jul. 2006.
- ARMITAGE, C. W.; O'MEARA, C. P.; BEAGLEY, K. W. Chlamydial infection enhances expression of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and transcytosis of IgA. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 1, p. 1–8, 2017.
- ASANO, M.; KOMIYAMA, K. Polymeric immunoglobulin receptor. **Journal of oral science**, v. 53, n. 2, p. 147–156, 2011.
- ASHRAFZADEH, A.; KARSANI, S. A.; NATHAN, S. Mammalian sperm fertility related proteins. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1649–1657, 2013.
- BARRIOS, B. *et al.* Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1531–7, nov. 2000.
- BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 93–102, 1994.
- BERNARDINI, A. et al. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 436–447, 2011.
- BELLEANNÉE, C. *et al.* Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 1, p. 59–78, 2011.
- BHATIA, V. N. *et al.* Software tool for researching annotations of proteins: open-

source protein annotation software with data visualization. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 23, p. 9819–23, 1 dez. 2009.

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

BLANCHARD, T. et al. Testicular and hormonal changes in stallions with thermally induced testicular degeneration. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, n. 56, p. 51–9, 2000.

BLAZQUEZ, N. B.; MALLARD, G. J.; WEDD, S. R. Sweat glands of the scrotum of the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 673–7, 1988

BOE-HANSEN, G. B. *et al.* Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 162, p. 20–30, nov. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

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

CABALLERO, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Veterinary medicine international**, v. 2011, p. 757194, 13 out. 2010.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

CHENG, D. *et al.* Effects of epidermal growth factor on sperm content and motility of rats with surgically induced varicoceles. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 6, p. 713–717, 2006.

CHENG, G.-Z. *et al.* Human ribonuclease 9, a member of ribonuclease A superfamily, specifically expressed in epididymis, is a novel sperm-binding protein. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 2, p. 240–251, 2009.

COHEN, J. P.; HOFFER, A. P.; ROSEN, S. Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. **Biol Reprod**, v. 14, n. 3, p. 339–346, 1976.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 653–71, 1994.

COULTER, G. H.; SENGER, P. L.; BAILEY, D. R. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 417–423, 1988.

CRUZ JÚNIOR, C. A. *et al.* Effects of testicle insulation on seminal traits in rams: Preliminary study. **Small Ruminant Research**, v. 130, p. 157–165, set. 2015.

CUNNINGHAM, K. A. *et al.* Poly-Immunoglobulin receptor-mediated transport of IgA into the male genital tract is important for clearance of chlamydia muridarum infection. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 5, p. 405–414, 2008.

DACHEUX, J.-L. *et al.* Mammalian epididymal proteome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1–2, p. 45–50, 10 jul. 2009.

DACHEUX, J.-L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27–R42, 19 dez. 2013.

DEVKOTA, B. *et al.* Effects of scrotal insulation and pathological lesions on alpha-Smooth Muscle Actin (SMA) and vimentin in the bull testes. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 2, p. 187–190, 2010.

DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14–27, jan. 2015.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990.

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

FERNÁNDEZ, J. L. *et al.* The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. **Journal of andrology**, v. 24, n. 1, p. 59–66, 2003.

FERNÁNDEZ, J. L. *et al.* Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and sterility**, v. 84, n. 4, p. 833–42, out. 2005.

FRENETTE, G. *et al.* Aldose Reductase and Macrophage Migration Inhibitory Factor Are Associated with Epididymosomes and Spermatozoa in the Bovine Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1586–1592, 1 nov. 2003.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Polyol pathway along the bovine epididymis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 4, p. 448–456, 2004.

FRENETTE, G.; THABET, M.; SULLIVAN, R. Polyol pathway in human epididymis and semen. **Journal of andrology**, v. 27, n. 2, p. 233–9, 1 mar. 2006.

FRIDD, C. W. *et al.* Response of rat testis to localized induced hyperthermia. **Urology**, v. 5, n. 1, p. 76–82, 1975.

FUJII, H. *et al.* C-Reactive Protein Alters Antioxidant Defenses and Promotes Apoptosis in Endothelial Progenitor Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and**

Vascular Biology, v. 26, n. 11, p. 2476–2482, 2006.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R. J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1628–1640, 2011

GIRGIS, S. M. *et al.* C-Reactive Protein in Semen and Serum of Men with Chronic Prostatitis. **Andrologia**, v. 15, n. 2, p. 151–154, 24 abr. 2009.

GOPALAKRISHNAN, B.; SHAHA, C. Inhibition of sperm glutathione S -transferase leads to functional impairment due to membrane damage. **FEBS Letters**, v. 422, n. 3, p. 296–300, 6 fev. 1998.

GUAZZONE, V. A. *et al.* Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 8, p. 620–628, 2009.

GÜRLER, H. *et al.* Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidative capacity of bovine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p. 97–104, set. 2015.

HAHN, G. L. Management and housing of farm animals in hot environments. In: YOUSEF, M. K. (Ed.). . **Stress Physiology in Livestock: ungulates**. 2. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1985. p. 151

HALES, D. B. *et al.* Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1061, p. 120–34, 2005. –174.

HAMILTON, T. R. DOS S. *et al.* Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

HENNING, H. *et al.* Effect of short-term scrotal hyperthermia on spermatological parameters, testicular blood flow and gonadal tissue in dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 145–157, 2014.

HERWIG, R. *et al.* Proteomic analysis of seminal plasma from infertile patients with oligoasthenoteratozoospermia due to oxidative stress and comparison with fertile volunteers. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 2, p. 355–366.e2, 2013.

HOSSEINIFAR, H. *et al.* Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. **Urology**, v. 81, n. 2, p. 293–300, 2013.

HORKY, P. *et al.* Effect of heat stress on the antioxidant activity of boar ejaculate revealed by spectroscopic and electrochemical methods. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, p. 6610–6626, 2015

HUANG, J. *et al.* Expression of Immunoglobulin Gene With Classical V-(D)-J Rearrangement in Mouse Testis and Epididymis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 57, n. 4, p. 339–349, 2009.

IBRAHIM, N. M. *et al.* Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram

semen and their relationship to semen quality. **Journal of andrology**, v. 22, n. 5, p. 863–877, 2001.

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

JASKOVA, K.; PAVLOVICOVA, M.; JURKOVICOVA, D. Calcium transporters and their role in the development of neuronal disease and neuronal damage. **General physiology and biophysics**, v. 31, n. 4, p. 375–382, 2012.

JOIS, P. S. *et al.* Functional characterization of the domains of the bovine binder of SPerm 5 (BSP5) protein. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 13, n. 1, p. 64, 2015.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. & PALMER, N. The male genital system. In: **Pathology of Domestic Animals**. 4a ed. Florida, Academic Press, v.3, cap.5, p.428-32, 1985.

KARABINUS, D. S. *et al.* Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 5, p. 549–55, 1997.

KASTELIC, J. *et al.* Hyperthermia and not hypoxia may reduce sperm motility and morphology following testicular hyperthermia. **Veterinarni Medicina**, v. 62, n. 8, p. 437–442, 2017.

KASTELIC, J. P. *et al.* Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, 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, n. 4, p. 255–61, 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. 157–160, 1999.

KATOH, Y. *et al.* Porcine sperm capacitation involves tyrosine phosphorylation and activation of aldose reductase. **Reproduction**, v. 148, n. 4, p. 389–401, 2014.

KRISHNAKUMAR, S. *et al.* A preliminary assessment of the effects of reproductive seasonality on seminal characteristics in North American Bison (Bison Bison). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48, n. 1, p. 91–101, 2017.

KUMAR, P. *et al.* Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. **Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 78–86, 2012.

KUROKAWA, S. *et al.* Effect of epidermal growth factor on spermatogenesis in the cryptorchid rat. **The Journal of Urology**, v. 174, n. 6, p. 2415–2419, dez. 2005.

LANGFORD, G. A.; SHRESTHA, J. N. B.; MARCUS, G. J. Repeatability of scrotal

size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime. **Animal Reproduction Science**, v. 19, n. 1–2, p. 19–27, maio 1989.

LEDESMA, A. *et al.* Effect of seminal plasma on post-thaw quality and functionality of corriedale ram sperm obtained by electroejaculation and artificial vagina. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 3, p. 386–392, 2015.

LEE, S. *et al.* Analysis of Bovine Seminal Plasma Proteins from Korean Native Cattle, Hanwoo, and Korean Native Brindle Cattle. **Reproductive & developmental biology**, v. 36, n. 2, p. 121–131, 2012.

LI, L. *et al.* Upregulation of heat shock protein 32 in Sertoli cells alleviates the impairments caused by heat shock-induced apoptosis in mouse testis. **Cell stress & chaperones**, v. 18, n. 3, p. 333–51, maio 2013.

LUDWIG, M. *et al.* Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or leukocytospermia. **Andrologia**, v. 30 Suppl 1, p. 41–7, 1998.

LUNA, C. *et al.* Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 670–678, mar. 2015.

LUNSTRA, D. D.; GREGORY, K. E.; CUNDIFF, L. V. Heritability estimates and adjustment factors for the effects of bull age and age of dam on yearling testicular size in breeds of bulls. **Theriogenology**, v. 30, n. 1, p. 127–36, jul. 1988.

MARAI, I. F. M. *et al.* Physiological traits as affected by heat stress in sheep - A review. **Small Ruminant Research**, v. 71, n. 1–3, p. 1–12, 2007.

MAKAREVICH, A. V. *et al.* Demonstration of the effect of epidermal growth factor on ram sperm parameters using two fluorescent assays. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 12, p. 581–589, 2010.

MARTINS, J. A. M. *et al.* Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 115–127, jun. 2013.

MIEUSSET, R. *et al.* The effects of moderate heating of the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on body temperature, respiratory rate, spermatozoa output and motility, and on fertility and embryonic survival in ewes inseminated with frozen semen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 637, n. 1 The Male Germ, p. 445–458, 1991.

MIEUSSET, R. *et al.* Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. **Reproduction**, v. 94, n. 2, p. 337–343, 1 mar. 1992.

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

MOSTEK, A. *et al.* Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. **Theriogenology**, v. 92, p. 95–102, abr. 2017.

- MOULE, G. R.; WAITES, G. M. H. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Reproduction**, v. 5, n. 3, p. 433–446, 1963.
- MOURA, A. A. *et al.* A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3–4, p. 169–188, 2007.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 18–31, 2008.
- NEWTON, L. D. *et al.* Elevated testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in Holstein bulls. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 1, p. 109–118, 2009.
- NEZHAD, F. S.; LAVVAF, A.; KARIMI, S. Effect of heat stress on oxidative reactions in the sheep Sertoli cells. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, n. 12, p. 833–839, 2013.
- NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007.
- ODHIAMBO, J.; DAILEY, R. Characterization of proteins in cryopreserved and non-cryopreserved seminal plasma of dairy bulls of differing fertility. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 1, n. 2, p. 33–40, 2011.
- ODHIAMBO, J. F. *et al.* Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 4, p. 97, 2014.
- OKAMURA, N. *et al.* A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1438, n. 3, p. 377–87, 10 jun. 1999.
- OLIVEIRA, M. E. F. *et al.* Effect of Scrotal Insulation Associated to Environmental Discomfort on Andrologic Characteristics in Santa Rams. **Journal of Animal Science Advances**, v. 4, n. 10, p. 1, 2014.
- OLIVEIRA, R. V. DE *et al.* Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, 2009.
- PARK, K. *et al.* Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 135, n. 1–4, p. 53–61, 2012.
- PATRICIO, A. *et al.* Relation between seminal quality and oxidative balance in sperm cells. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 33, n. 1, p. 6–15, 2016.
- PAUL, C. *et al.* A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, v. 136, n. 1, p. 73–84, 2008.

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, n. January, p. 913–919, 2009.

PEÑA, J. S. T. et al. Revisiting summer infertility in the pig: could heat stress-induced sperm DNA damage negatively affect early embryo development? **Animal Production Science**, v. 57, n. 10, p. 1975–1983, 2017.

PENTTINEN, J. *et al.* Discovery in silico and characterization in vitro of novel genes exclusively expressed in the mouse epididymis. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 11, p. 2138–51, 2003.

PINI, T. et al. Proteomic investigation of ram spermatozoa and the proteins conferred by seminal plasma. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3700–3711, 2016.

RADHAKRISHNAN, B. *et al.* Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. **Endocrinology**, v. 131, n. 6, p. 3091–9, dez. 1992.

RAHMAN, M. B. et al. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1246–57, 2011.

REGO, J. P. A. *et al.* Seminal plasma proteome of electroejaculated Bos indicus bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 1–2, p. 1–17, 2014.

RICKARD, J. P. *et al.* The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. **Journal of proteomics**, v. 126, p. 303–11, 3 ago. 2015.

ROBERTS, S.Y. Infertility in Male Animals. Veterinary. **Obstetrics and Genital Diseases**. Michigan, Edwards Brothers, 3ª ed. cap.18, p.752-893, 1986.

ROCHA, D. R. *et al.* Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1291–1305, 2015.

RODRIGUES, M. A. DE M. **Expressão de proteínas do plasma seminal em carneiros das raças Santa Inês e Morada Nova: associações com parâmetros seminais e influência de fontes de proteína e de nitrogênio não protéico nas dietas.** [s.l.] Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.

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

RODRÍGUEZ-VILLAMIL, P. *et al.* Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 540–554, 2016.

RUIZ-PESINI, E. et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1616–20, 1998.

SAKKAS, D. et al. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and

faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, n. 4, p. 428–432, 2003.

SALCES-ORTIZ, J. *et al.* Differences in the Ovine HSP90AA1 Gene Expression Rates Caused by Two Linked Polymorphisms at Its Promoter Affect Rams Sperm DNA Fragmentation under Environmental Heat Stress Conditions. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116360, 11 fev. 2015.

SALLES, M. G. F. *et al.* Respostas fisiológicas ao estresse térmico de bodes Saanen em clima tropical. **Ciência Animal**, v. 19, n. 1, p. 19–28, 2009.

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

SANTOS, C. L. F. **Proteoma do plasma seminal de touros da raça Gir Leiteiro (Bos taurus indicus) clinicamente normais e com hipoplasia testicular**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

SAS, I. I. **Statistical Analysis System user's guide**. Cary Statistical Analysis System Institute, , 2002.

SAWYER, D. E. *et al.* Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. **Mutation Research**, v. 529, n. 1–2, p. 21–34, 2003.

SERRANO, E. *et al.* New insights into the phylogeny and gene context analysis of binder of sperm proteins (BSPs). **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2015.

SETCHELL, B. P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, n. 2, p. 179–194, 1998.

SHAHA, C.; TRIPATHI, R.; MISHRA, D. P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1501–15, 2010.

SHARMA, R. *et al.* Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 11, n. 1, p. 38, jan. 2013.

SHIRAISHI, K.; MATSUYAMA, H. Local expression of epidermal growth factor-like growth factors in human testis and its role in spermatogenesis. **Journal of andrology**, v. 33, n. 1, p. 66–73, 2012.

SHOJAEI SAADI, H. A *et al.* Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of proteomics**, v. 82, p. 64–80, 26 abr. 2013.

SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Cellular carboxypeptidases. **Immunological Reviews**, v. 161, n. 1, p. 129–141, fev. 1998.

SOLEILHAVOUP, C. *et al.* Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. **Journal of Proteomics**, v. 109, p. 245–260, 15 set. 2014.

SOUZA, C. E. A. et al. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 644–53, 2010.

SOUZA, F. M. L. et al. Parameters of the reproductive tract, spermatogenesis, daily sperm production and major seminal plasma proteins of tropically adapted morada nova rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 409–419, 2014.

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

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

SUNIL KUMAR, B. V.; KATARIA, M.; KUMAR, A. Amelioration of heat stress by feeding electrolytes, ascorbic acid and zinc in buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v. 30, n. 4, p. 229–239, 2011.

TAMBURRINI, M. et al. Immunosuppressive activity of bovine seminal RNase on T-cell proliferation. **European journal of biochemistry**, v. 190, n. 1, p. 145–8, 31 maio 1990.

THOM, E. C. The discomfort index. **Weatherwise**, v. 12, p. 57–59, 1959.

THUNDATHIL, J. C. et al. The effects of increased testicular temperature on testis-specific isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and sperm function. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 170–177, 2012.

UGURALP, S. et al. The effect of sustained and local administration of epidermal growth factor on improving bilateral testicular tissue after torsion. **Urological Research**, v. 32, n. 5, p. 323–331, 2004.

VALLÉS, A. S.; AVELDAÑO, M. I.; FURLAND, N. E. Altered lipid homeostasis in Sertoli cells stressed by mild hyperthermia. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e91127, jan. 2014.

VAN TILBURG, M. F. et al. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247–61, jun. 2013.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1, p. 31–39, 2004.

VOGLER, C. J. et al. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3827–3835, 1991.

WAITES, G. M.; MOULE, G. R. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 2, p. 213–24, 1961.

WALTERS, A. H. et al. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925–1937, 2005.

WANDERNOTH, P. M. *et al.* Role of Carbonic Anhydrase IV in the Bicarbonate-Mediated Activation of Murine and Human Sperm. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e15061, 24 nov. 2010.

WANDERNOTH, P. M. *et al.* Normal fertility requires the expression of carbonic anhydrases II and IV in sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 49, p. 29202–29216, 2015.

WANG, Y.; YANG, G. Alteration of Polymeric Immunoglobulin Receptor and Neonatal Fc Receptor Expression in the Gut Mucosa of Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 4, p. 235–243, 2016.

WANG, Z. *et al.* Mammaglobin, a valuable diagnostic marker for metastatic breast carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 2, n. 4, p. 384–9, 2009.

WESTMUCKETT, A. D. *et al.* Impaired Sperm Maturation in Rnase9 Knockout Mice1. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 6, p. 120–120, 2014.

XIA, W. et al. Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 668, 2015.

YAN, Y.-C. *et al.* Testis Epidermal Growth Factor and Spermatogenesis. **Archives of Andrology**, v. 40, n. 2, p. 133–146, 9 jan. 1998.

ZHU, C.-F. *et al.* RNase9, an androgen-dependent member of the RNase A family, is specifically expressed in the rat epididymis. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 1, p. 63–73, 2007.

ANEXO A - PROTEÍNAS EXPRESSAS DIFERENCIALMENTE NO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS MORADA NOVA COMO RESULTADO DA INSULAÇÃO ESCROTAL INTERMITENTE. AS PROTEÍNAS MOSTRADAS NA FIGURA 9, FORAM SEPARADAS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-SDS-PAGE) E IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI-Q-TOF).

Proteína	kDa/pI Teórico	Número de acesso NCBI	Escore de proteína MS/MS	Sequência coberta (%)	Peptídeos	Escore do íon	m/z	z
Superoxide dismutase [CuZn]								
	15.88/6.14	223633904	102	21	⁽¹¹⁾ GDGPVQGTIR ⁽²⁰⁾	52	500.2633	2
					⁽⁷⁹⁾ HVGDLGNVK ⁽⁸⁷⁾	31	469.7536	2
					⁽¹¹⁵⁾ TMVVHERPDDLGR ⁽¹²⁷⁾	20	514.2537	3
Epididymal secretory protein E1								
	16.77/8.20	426233668	318	55	⁽²⁴⁾ FKDCGSGVGVK ⁽³⁵⁾	27	422.8803	3
					⁽²⁴⁾ FKDCGSGVGVK ⁽³⁵⁾	71	633.8276	2
					⁽²⁴⁾ FKDCGSGVGVK ⁽³⁵⁾	71	634.3205	2
					⁽²⁶⁾ DCGSGVGVK ⁽³⁵⁾	34	496.2424	2
					⁽³⁶⁾ EVNVSPCPTQPCK ⁽⁴⁸⁾	26	758.3473	2
					⁽³⁶⁾ EVNVSPCPTQPCK ⁽⁴⁸⁾	26	758.8339	2
					⁽⁷²⁾ AVVHGIVMGIPVPPPIPESDGCK ⁽⁹⁴⁾	40	807.0829	3

⁽⁷²⁾ AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁽⁹⁴⁾	41	812.4101	3
⁽⁷²⁾ AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁽⁹⁴⁾	63	812.4128	3
⁽⁷²⁾ AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁽⁹⁴⁾	41	812.7312	3
⁽⁷²⁾ AVVHGIVMGIPVPFPIPESDGCK ⁽⁹⁴⁾	63	812.7423	3
⁽¹⁰⁴⁾ DKTYNYVNK ⁽¹¹²⁾	23	572.7815	2
⁽¹⁰⁶⁾ TYNYVNKLPVK ⁽¹¹⁶⁾	27	670.3682	2
⁽¹¹⁷⁾ SEYPSIK ⁽¹²³⁾	16	412.208	2
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	42	577.6207	3
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	18	577.6216	3
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	47	577.623	3
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	58	865.9392	2
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	17	865.9412	2
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	42	577.9498	3
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	17	866.4265	2
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	18	577.9541	3
⁽¹²⁴⁾ VVVEWELTDDKNQR ⁽¹³⁷⁾	58	866.4318	2

Inhibitor of carbonic anhydrase-like isoform X1

74.44/6.2	803005632	83	1	⁽²⁶⁷⁾ DLLFTDAAIGFLR ⁽²⁷⁹⁾	83	726.4005	2
-----------	-----------	----	---	---	----	----------	---

Inactive ribonuclease-like protein 9

25.98/7.53	803090389	238	31	(⁹⁹)VIIDSEMPLTDR(¹¹⁰)	68	694.8538	2
				(⁹⁹)VIIDSEMPLTDR(¹¹⁰)	104	702.8493	2
				(¹¹¹)EYCNLEMK(¹¹⁸)	25	543.7273	2
				(¹¹¹)EYCNLEMK(¹¹⁸)	16	551.7260	2
				(¹¹¹)EYCNLEMK(¹¹⁸)	23	551.7268	2
				(¹¹¹)EYCNLEMK(¹¹⁸)	16	552.2182	2
				(¹³¹)EHFFLQASYDDIQK(¹⁴⁴)	39	580.9363	3
				(¹³¹)EHFFLQASYDDIQK(¹⁴⁴)	20	580.9365	3
				(¹³¹)EHFFLQASYDDIQK(¹⁴⁴)	22	870.9070	2
				(¹³¹)EHFFLQASYDDIQK(¹⁴⁴)	26	870.9127	2
				(¹³¹)EHFFLQASYDDIQK(¹⁴⁴)	22	871.4116	2
				(¹³¹)EHFFLQASYDDIQK(¹⁴⁴)	26	871.4127	2
				(¹⁴⁵)ICHNMFVQCK(¹⁵⁴)	16	446.1952	3
				(¹⁴⁵)ICHNMFVQCK(¹⁵⁴)	16	446.5277	3
				(¹⁴⁵)ICHNMFVQCK(¹⁵⁴)	13	451.5285	3
				(¹⁴⁵)ICHNMFVQCK(¹⁵⁴)	13	451.8578	3
				(¹⁴⁵)ICHNMFVQCK(¹⁵⁴)	7	677.2906	2
				(¹¹⁶)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK(¹⁹⁰)	38	960.1221	3

(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	38	960.4484	3
(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	44	965.4516	3
(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	54	965.4533	3
(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	44	965.7861	3
(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	44	965.7887	3
(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	53	970.7872	3
(116)IISGVHCVLTSGVMMPFCEYISSYK ⁽¹⁹⁰⁾	44	971.1166	3

Beta-actin-like protein 2

42.23/5.29	803167241	235	26	(41)HQQVMVGMGQK ⁽⁵¹⁾	18	401.8509	3
				(41)HQQVMVGMGQK ⁽⁵¹⁾	18	402.1843	3
				(97)VAPDEHPILLTEAPLNPK ⁽¹¹⁴⁾	25	652.0234	3
				(149)TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR ⁽¹⁷⁸⁾	26	800.6487	4
				(185)DLTDYLMK ⁽¹⁹²⁾	30	507.7387	2
				(185)DLTDYLMK ⁽¹⁹²⁾	31	507.7403	2
				(198)GYSFTTTAER ⁽²⁰⁷⁾	46	566.7623	2
				(240)SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵⁵⁾	45	895.9457	2
				(240)SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵⁵⁾	33	895.9484	2

(240)SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵⁵⁾	45	896.4431	2
(240)SYELPDGQVITIGNER ⁽²⁵⁵⁾	33	896.4457	2
(330)IIAPPER ⁽³³⁶⁾	42	398.2347	2

Serum albumin precursor

71.14/5.80	57164373	1044	38	(76)TCVADESHAGCDK ⁽⁸⁸⁾	29	483.8551	3
				(76)TCVADESHAGCDK ⁽⁸⁸⁾	29	484.1884	3
				(89)SLHTLFGDELCK ⁽¹⁰⁰⁾	26	473.8961	3
				(89)SLHTLFGDELCK ⁽¹⁰⁰⁾	23	710.3492	2
				(139)LKPEPDTLCAEFK ⁽¹⁵¹⁾	23	516.5933	3
				(139)LKPEPDTLCAEFK ⁽¹⁵¹⁾	17	774.3927	2
				(139)LKPEPDTLCAEFK ⁽¹⁵¹⁾	17	774.8805	2
				(161)YLYEVAR ⁽¹⁶⁷⁾	28	457.2383	2
				(168)HPYFYAPELLYYANK ⁽¹⁸³⁾	33	682.3413	3
				(168)HPYFYAPELLYYANK ⁽¹⁸³⁾	23	630.3075	3
				(257)IVTDLTK ⁽²⁶³⁾	38	395.2343	2
				(286)YICDHQDALSSK ⁽²⁹⁷⁾	22	479.5456	3
				(286)YICDHQDALSSK ⁽²⁹⁷⁾	28	718.8256	2
				(286)YICDHQDALSSK ⁽²⁹⁷⁾	28	719.3133	2

(298)LKECCDKPVLEK ⁽³⁰⁹⁾	24	506.9215	3
(347)DVFLGSFLYEYSR ⁽³⁵⁹⁾	53	798.3876	2
(347)DVFLGSFLYEYSR ⁽³⁵⁹⁾	71	798.3915	2
(360)RHPEYAVSVLLR ⁽³⁷¹⁾	53	480.6016	3
(361)HPEYAVSVLLR ⁽³⁷¹⁾	49	642.3581	2
(402)HLVDEPQNLIK ⁽⁴¹²⁾	37	653.359	2
(402)HLVDEPQNLIK ⁽⁴¹²⁾	17	653.8509	2
(402)HLVDEPQNLIK ⁽⁴¹²⁾	37	653.856	2
(421)HGEYGFQNALIVR ⁽⁴³³⁾	55	501.9243	3
(421)HGEYGFQNALIVR ⁽⁴³³⁾	115	752.3866	2
(421)HGEYGFQNALIVR ⁽⁴³³⁾	87	752.3866	2
(421)HGEYGFQNALIVR ⁽⁴³³⁾	55	502.2569	3
(437)APQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	51	542.6388	3
(437)APQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	51	813.4641	2
(437)APQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	51	542.9678	3
(437)APQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	51	813.955	2
(438)APQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	25	749.4183	2
(438)APQVSTPTLVEISR ⁽⁴⁵¹⁾	25	749.9121	2

(469)MPCTEDYLSLILNR ⁽⁴⁸²⁾	30	580.9458	3
(469)MPCTEDYLSLILNR ⁽⁴⁸²⁾	70	870.9176	2
(469)MPCTEDYLSLILNR ⁽⁴⁸²⁾	96	870.9199	2
(469)MPCTEDYLSLILNR ⁽⁴⁸²⁾	70	871.4053	2
(483)LCVLHEK ⁽⁴⁸⁹⁾	22	449.7392	2
(508)RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK ⁽⁵²⁸⁾	33	640.0512	4
(508)RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK ⁽⁵²⁸⁾	33	853.075	3
(508)RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK ⁽⁵²⁸⁾	74	853.0782	3
(508)RPCFSDLTLDETYVPKPFDEK ⁽⁵²⁸⁾	33	853.4036	3
(529)FFTFHADICTLPDTEK ⁽⁵⁴⁴⁾	25	647.9682	3
(548)QTALVELLK ⁽⁵⁵⁷⁾	47	571.8583	2
(549)QTALVELLK ⁽⁵⁵⁷⁾	35	508.3031	2
(569)TVMENFVAFVDK ⁽⁵⁸⁰⁾	100	700.3478	2
(569)TVMENFVAFVDK ⁽⁵⁸⁰⁾	64	708.3442	2
(569)TVMENFVAFVDK ⁽⁵⁸⁰⁾	83	708.3456	2

Carboxypeptidase Q isoform X1

52.82/5.73	803106165	412	19	(43)TLQEVKEEIAR ⁽⁵³⁾	28	439.5672	3
				(60)SIINLSVYGK ⁽⁶⁹⁾	50	547.3189	2

(78)LALLVDTVGPR ⁽⁸⁸⁾	78	577.3479	2
(78)LALLVDTVGPR ⁽⁸⁸⁾	30	577.3646	2
(108)GDGLENVHLEPVK ⁽¹²⁰⁾	35	469.5743	3
(127)GEESAVMLEPR ⁽¹³⁷⁾	84	609.2919	2
(199)MEGAVEAAK ⁽²⁰⁷⁾	30	453.2190	2
(208)VGALASLIR ⁽²¹⁶⁾	21	450.2865	2
(208)VGALASLIR ⁽²¹⁶⁾	64	450.2865	2
(273)SYPDADSFNTVAEITGSK ⁽²⁹⁰⁾	44	951.4457	2

Mammaglobin-A

10.88/4.58	426251874	208	43	(33)AVDPTVSK ⁽⁴⁰⁾	18	408.7219	2
				(33)AVDPTVSKDEYR ⁽⁴⁴⁾	85	690.3431	2
				(49)DFLQTENEGNAIDELK ⁽⁶⁴⁾	60	918.4236	2
				(49)DFLQTENEGNAIDELK ⁽⁶⁴⁾	70	918.4335	2
				(49)DFLQTENEGNAIDELK ⁽⁶⁴⁾	70	918.9101	2
				(49)DFLQTENEGNAIDELK ⁽⁶⁴⁾	60	918.9185	2
				(80)QMLEVMYNSIYCK ⁽⁹²⁾	32	847.884	2
				(80)QMLEVMYNSIYCK ⁽⁹²⁾	32	848.3819	2
				(80)QMLEVMYNSIYCK ⁽⁹²⁾	35	855.8789	2

(80)QMLEVMYNSIYCK ⁽⁹²⁾	13	856.3758	2
(80)QMLEVMYNSIYCK ⁽⁹²⁾	35	856.3758	2

Spermadhesin Z13-like isoform X2

15.60/5.49	965785567	85	26	(79)ESLEIIDGPPESSSSLK ⁽⁹⁵⁾	59	894.4504	2
				(96)FCDKPYLEYASCTNTMIVK ⁽¹¹⁴⁾	10	786.0199	3
				(96)FCDKPYLEYASCTNTMIVK ⁽¹¹⁴⁾	26	786.0218	3

EGF LIKE and discoidin I-like domain-containing protein 3

53.81/6.87	803079535	237	19	(86)GDTFIGYVCK ⁽⁹⁵⁾	24	580.2773	2
				(86)GDTFIGYVCK ⁽⁹⁵⁾	22	580.2839	2
				(178)WYPYYAR ⁽¹⁸⁴⁾	15	509.7386	2
				(189)GLINAWTAAENDR ⁽²⁰¹⁾	18	715.8552	2
				(215)VTGVITQGAK ⁽²²⁴⁾	24	487.2829	2
				(215)VTGVITQGAK ⁽²²⁴⁾	31	487.2836	2
				(215)VTGVITQGAK ⁽²²⁴⁾	31	487.7757	2
				(226)IGSPEYIK ⁽²³³⁾	15	453.7456	2
				(332)TLNMDMFTWEPR ⁽³⁴³⁾	56	786.8445	2
				(377)VTGIITQGAK ⁽³⁸⁶⁾	49	494.2923	2

(387)DFGHVQFVGSYK ⁽³⁹⁸⁾	16	461.8906	3
(447)ILPWSWYGR ⁽⁴⁵⁵⁾	14	589.3356	2

Binder of sperm 5

18.13/5.20	148225308	101	19	(85)EWCSLDEDYVGR ⁽⁹⁶⁾	73	764.8244	2
				(108)CHFPIYR ⁽¹¹⁵⁾	12	570.7657	2
				(143)EYAWQYCDRY ⁽¹⁵²⁾	15	727.2986	2
				(143)EYAWQYCDRY ⁽¹⁵²⁾	15	727.7839	2

C-reactive protein

25.49/6.32	426216911	364	37	(33)ETENSYVSLK ⁽⁴²⁾	63	585.2839	2
				(43)TQLETPLK ⁽⁵⁰⁾	40	465.2605	2
				(43)TQLETPLK ⁽⁵⁰⁾	40	465.7524	2
				(67)SYSIFS YATR ⁽⁷⁶⁾	42	597.7898	2
				(77)QQPNEILIFWSK ⁽⁸⁸⁾	53	751.8988	2
				(77)QQPNEILIFWSK ⁽⁸⁸⁾	64	752.3927	2
				(77)QQPNEILIFWSK ⁽⁸⁸⁾	53	752.3969	2
				(91)GYTFGVH GK ⁽⁹⁹⁾	24	483.2445	2
				(149)DASIILGQEQDAFAGGFDR ⁽¹⁶⁷⁾	45	1005.4804	2

(149)DASIILGQEQDAFAGGFDR ⁽¹⁶⁷⁾	100	1005.4826	2
(149)DASIILGQEQDAFAGGFDR ⁽¹⁶⁷⁾	45	1005.9706	2
(208)ALNYEAK ⁽²¹⁴⁾	11	404.7068	2
(208)ALNYEAK ⁽²¹⁴⁾	13	404.711	2
(208)ALNYEAK ⁽²¹⁴⁾	11	405.2051	2
(215)GEVFIKPQLW ⁽²²⁴⁾	12	608.8363	2
(215)GEVFIKPQLW ⁽²²⁴⁾	19	608.837	2
(215)GEVFIKPQLW ⁽²²⁴⁾	13	609.3287	2

Polymeric immunoglobulin receptor isoform X2

83.67/5.67	426239425	272	12	(147)TVTINCPFTSANSQK ⁽¹⁶¹⁾	25	834.4086	2
				(147)TVTINCPFTSANSQK ⁽¹⁶¹⁾	21	834.8923	2
				(147)TVTINCPFTSANSQK ⁽¹⁶¹⁾	25	834.9022	2
				(251)SSVTFDCSLGPEVADTAK ⁽²⁶⁸⁾	61	942.4359	2
				(251)SSVTFDCSLGPEVADTAK ⁽²⁶⁸⁾	54	942.4366	2
				(303)DNGVFSVHIASLR ⁽³¹⁵⁾	66	707.8768	2
				(363)GGSVTVSCPYNPK ⁽³⁷⁵⁾	37	683.3252	2
				(363)GGSVTVSCPYNPK ⁽³⁷⁵⁾	52	683.3259	2
				(363)GGSVTVSCPYNPK ⁽³⁷⁵⁾	38	683.8212	2

(456)VVEGEP ⁽⁴⁶⁴⁾ SLK	35	479.2631	2
(536)EDEGWYWC ⁽⁵⁴⁶⁾ GVK	20	714.803	2
(551)YGETAAVYVAVES ⁽⁵⁶⁴⁾ R	13	757.8725	2

Aldose reductase

36.29/5.95	426228047	290	24	(13)MPILGLGTW ⁽²²⁾ K	6	566.3122	2
				(13)MPILGLGTW ⁽²²⁾ K	37	566.3134	2
				(34)VAIDLGY ⁽⁴¹⁾ R	59	453.7535	2
				(70)REDLFIV ⁽⁷⁸⁾ SK	34	553.8125	2
				(70)REDLFIV ⁽⁷⁸⁾ SK	30	553.8136	2
				(70)REDLFIV ⁽⁷⁸⁾ SK	42	553.8142	2
				(156)AIGVSNFNHLQVE ⁽¹⁶⁹⁾ K	10	519.273	3
				(170)ILNKPGL ⁽¹⁷⁷⁾ K	22	441.792	2
				(196)LIQYCNS ⁽²⁰³⁾ K	17	513.2559	2
				(196)LIQYCNS ⁽²⁰³⁾ K	17	513.7546	2
				(244)TTAQVLIR ⁽²⁵¹⁾	35	451.2736	2
				(244)TTAQVLIR ⁽²⁵¹⁾	49	451.2739	2
				(244)TTAQVLIR ⁽²⁵¹⁾	37	451.7669	2
				(298)ACALVSCASHR ⁽³⁰⁸⁾	52	411.1858	3

ANEXO B - DESCRIÇÃO DA ONTOLOGIA GÊNICA DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE CARNEIROS MORADA NOVA VARIEDADE BRANCA, EXPRESSADAS DIFERENCIALMENTE EM FUNÇÃO DA INSULAÇÃO ESCROTAL, DE ACORDO COM O BANCO DE DADOS EBI-GOA.

Proteína	UNIPROT ID	Ontologia Gênica	Descrição da ontologia gênica	ID da ontologia gênica
Superoxide dismutase [CuZn]	P09670	Biological Process		
		Cellular Process	Reactive oxygen species metabolic process	GO:0072593
			Removal of superoxide radicals	GO:0019430
		Cellular Component		
		Intracellular	Nucleus	GO:0005634
			Cytoplasm	GO:0005737
		Molecular Function		
Binding	Metal ion binding	GO:0046872		
Antioxidant activity	Superoxide dismutase activity	GO:0004784		
Epididymal secretory protein E1	W5NSH8	Biological Process		
		Localization	Cholesterol efflux	GO:0033344
			Intracellular cholesterol transport	GO:0032367
	Regulation	Cholesterol homeostasis	GO:0042632	

Response to stimulus

Response to virus

GO:0009615

Cellular Component

Extracellular

Extracellular exosome

GO:0070062

Extracellular space

GO:0005615

Intracellular

Lysosome

GO:0005764

Molecular Function

Binding

Cholesterol binding

GO:0015485

Enzyme binding

GO:0019899

Biological Process

Regulation

Negative regulation of catalytic activity

GO:0043086

Cellular Component

Extracellular

Extracellular region

GO:0005576

Extracellular space

GO:0005615

Molecular Function

Molecular function regulator

Enzyme inhibitor activity

GO:0004857

**Inhibitor of carbonic
anhydrase-like isoform
X1**

Q9DBD0

Inactive ribonuclease-like protein 9	W5QEP3	Biological Process		
		Regulation	Positive regulation of flagellated sperm motility involved in capacitation	GO:0060474
		Molecular Function		
		Binding	Nucleic acid binding	GO:0003676
Beta-actin-like protein 2	P63258	Biological Process		
		Interação com células e organismos	Platelet aggregation	GO:0070527
		Regulation	Retina homeostasis	GO:0001895
		Biogenesis	Sarcomere organization	GO:0045214
		Cellular Component		
		Intracellular	Cytoskeleton	GO:0005856
			Filamentous actin	GO:0031941
			Dense body	GO:0097433
			Myofibril	GO:0030016
		Extracellular	Extracellular exosome	GO:0070062
	Extracellular matrix	GO:0031012		
	Blood microparticle	GO:0072562		

Plasma membrane GO:0005886

Focal adhesion GO:0005925

Myelin sheath GO:0043209

Nucleus GO:0005634

Molecular Function

Ligation

ATP binding GO:0005524

Identical protein binding GO:0042802

Ubiquitin protein ligase binding GO:0031625

Molecule with structural activity

Structural constituent of cytoskeleton

GO:0005200

Biological Process

Localization

Transport

GO:0006810

**Serum albumin
precursor**

P14639

Cellular Component

Extracellular

Extracellular space

GO:0005615

Molecular Function

Binding

Lipid binding

GO:0008289

Metal ion binding

GO:0046872

Biological Process

Cellular Process

Peptide catabolic process

GO:0043171

Cellular Component

Intracellular

Cytoplasm

GO:0005737

Carboxypeptidase Q

W5P3R8

Extracellular

Extracellular exosome

GO:0070062

Extracellular space

GO:0005615

Molecular Function

Catalytic activity

Metalloprotease activity

GO:0070573

Binding

Protein homodimerization activity

GO:0042803

Biological Process

Interaction with cells and organisms

Single fertilization

GO:0007338

**Spermadhesin Z13-like
isoform X2**

P82292

Cellular Component

Extracellular

Extracellular region

GO:0005576

Biological Process

Interaction with cells and organisms

Cell adhesion

GO:0007155

Positive regulation of cell-substrate adhesion

GO:0010811

Developmental process

Multicellular organism development

GO:0007275

**EGF LIKE and
discoidin I-like
domain-containing
protein 3**

O43854

Cellular Component

Extracellular

Extracellular exosome

GO:0070062

Extracellular matrix

GO:0031012

Extracellular vesicle

GO:1903561

Molecular Function

Binding

Calcium ion binding

GO:0005509

Integrin binding

GO:0005178

Cellular component

Extracellular

Acrosomal vesicle

GO:0001669

Binder of sperm 5**Biological Process**

Fertilization

GO:0009566

Sperm capacitation

GO:0048240

		Biological Process	
		Response to stimulus	Acute-phase response GO:0006953
			Defense response to Gram-positive bacterium GO:0050830
			Inflammatory response GO:0006954
		Regulation	Negative regulation of lipid storage GO:0010888
			Negative regulation of macrophage derived foam cell differentiation GO:0010745
			Positive regulation of gene expression GO:0010628
			Positive regulation of superoxide anion generation GO:0032930
			Regulation of interleukin-8 secretion GO:2000482
		Immune system process	Opsonization GO:0008228
		Cellular Component	
		Extracellular	Extracellular exosome GO:0070062
			Extracellular region GO:0005576
			Extracellular space GO:0005615
C-reactive protein	P02741		

Molecular Function

Binding

Calcium ion binding

GO:0005509

Choline binding

GO:0033265

Complement component C1q binding

GO:0001849

Low-density lipoprotein particle binding

GO:0030169

Low-density lipoprotein particle receptor binding

GO:0050750

Biological Process

Regulation

Epidermal growth factor receptor signaling pathway

GO:0007173

Retina homeostasis

GO:0001895

Interaction with cells and organisms

Detection of chemical stimulus involved in sensory perception of bitter taste

GO:0001580

Immunoglobulin transcytosis in epithelial cells mediated by polymeric immunoglobulin receptor

GO:0002415

Immune system process

Localization

Receptor clustering

GO:0043113

Cellular Component

Extracellular

Extracellular exosome

GO:0070062

Extracellular space

GO:0005615

Polymeric immunoglobulin receptor

W5P9V5

Cellular component

Plasma membrane

GO:0005886

Integral component of membrane

GO:0016021

Macromolecular complex

Receptor complex

GO:0043235

Molecular Function

Molecular transducer activity

Polymeric immunoglobulin receptor activity

GO:0001792

Biological Process

Cellular Process

Oxidation-reduction process

GO:005511

Cellular Component

Intracellular

Cytoplasm

GO:0005737

Aldose reductase

P16116

Molecular Function

Catalytic activity

Oxidoreductase activity

GO:0047006

Oxidoreductase activity

GO:0004032

