

JULIO CESAR OLIVEIRA DIAS

**AVALIAÇÃO SAZONAL DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE REPRODUTORES
CAPRINOS DA RAÇA ALPINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D541a Dias, Julio Cesar Oliveira, 1982-
2014 Avaliação sazonal de parâmetros fisiológicos de
reprodutores caprinos da raça Alpina / Julio Cesar Oliveira Dias.
– Viçosa, MG, 2014.
xv, 145f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cristina Mattos Veloso.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Caprinos - Reprodução. 2. Bioclimatologia. 3. Sêmen.
4. Bode. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.391

JULIO CESAR OLIVEIRA DIAS

**AVALIAÇÃO SAZONAL DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE REPRODUTORES
CAPRINOS DA RAÇA ALPINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

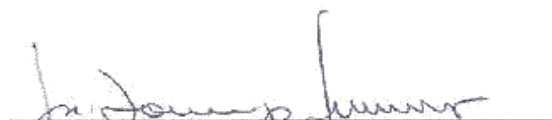
APROVADA: 20 de março de 2014.



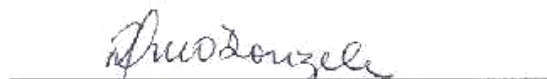
Cláudio José Borela Espescht



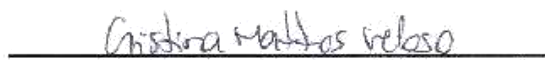
Giancarlo Magalhães dos Santos



José Domingos Guimarães



Rita Flávia M. de Oliveira Donzele
(Coorientadora)



Cristina Mattos Veloso
(Orientadora)

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

“ASSIM MESMO”

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Seja gentil, assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja Feliz assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja que, no final das contas, é entre você e DEUS.

Nunca foi entre você e as outras pessoas.”

Bem Aventurada Madre Teresa de Calcutá

*Aos meus pais e irmãos, pelo amor, apoio
e por me darem tudo aquilo que muitas
vezes lhes faltaram...*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Bom Deus, princípio e fim de todas as coisas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa.

Aos meus pais, Tarquinio e Maria Serrat, e irmãos, Quiqui e Dé, pelas orações, incentivos e força, imprescindíveis, para realizar este trabalho e etapa.

Aos meus cunhados e também irmãos, Vitorino e Livia que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Aos meus sobrinhos e afilhados Carol e Pedrinho, que são grandes e valiosos presentes que Deus me deu e dos quais eu tenho muito orgulho e carinho.

À minha noiva, Tatiane, que eu amo e é para mim um grande Dom de Deus. Uma companheira, uma amiga, um valioso tesouro que o Bom Deus decidiu me dar para cuidar.

À minha tia e madrinha Graça, pela torcida, incentivos e orações.

Aos meus sogros, Magali, Boi e Antônio e toda família Miranda que além de acolherem com muita atenção e carinho, me confiaram um dos seus mais preciosos bens.

À professora e orientadora, Cristina Mattos Veloso, pela amizade, formação acadêmica e científica, confiança, disponibilidade e paciência. Muito obrigado Cris.

À professora e coorientadora, Rita Flávia Miranda de Oliveira Donzele, pela amizade formação acadêmica, científica e didática, e por me lembrar da bondade e o cuidado de Deus em minha vida.

Ao professor Cláudio Borela pela atenção, disponibilidade, conversas, convivência e orientação científica.

Ao professor José Domingos Guimarães, pela amizade, formação acadêmica, orientações na criação e início do projeto.

Ao professor Giancarlo Magalhães dos Santos, pela amizade, confiança no meu trabalho e disponibilidade.

Ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela oportunidade que me foi concedida de realizar este experimento no setor de Caprinocultura.

À Fernanda e Mariana, secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, pela paciência e dedicação, até mesmo quando esquecemos os prazos e datas importantes.

Aos amigos, companheiros e também coexecutores deste Projeto de Pesquisa Madriano, Carlos, Camila Silveira, Paula, Érick, Letícia Sanglard e Charles. A ajuda e dedicação de vocês foram fundamentais para que eu pudesse realizar este trabalho que também é de vocês.

Aos estagiários e companheiros de trabalho Ronaldo Silveira, Letícia Ferreira, Izabele, Izabela, Otávio, Laura, Danilo, Tainá e Danilo.

A todos os amigos da Pós-Graduação pelo convívio, amizade e ajuda: Jura, Dyego, Áthina, Bruna, Giselle, Alberto, Monique, Ana Estela, Mococa, Luquinha, Camila Cunha, Tathy Ramalho, Marcos, Tadeu, Lina, Vivian, Luciana, Damares, Flavia Alvin, Faider, Breno, Lincon, Denise, Carol, Erly, Manú, Daniel, Renan, Fabrício, Mariana Fausto, Gláucia, Polyana Galvão, Ludmila Fernandes, Ana Paula Gomide, Diogo Vivácqua e Flávia Reis.

Aos grandes amigos e irmãos de longe: Diogo (Clóvis), Rogério (Bananinha), Nathália Thaís, Cida, Fabiano (Bim), Vânia e Angélica, pelo companheirismo, carinho e risos (muitos) por telefone, email e Facebook. Com vocês foi muito mais fácil passar pelos momentos difíceis e vivenciar os bons!!!

À Déia e companheiros de República, Marcelo, Jeferson, Luciano, Ivan, Heider e Eduardo.

Aos amigos da Capela Imaculado Coração de Maria da UFV, do Ministério Universidades Renovadas e da Renovação Carismática Católica (RCC), por todos os momentos vividos, exercidos e experimentados juntamente com vocês no trabalho de evangelização em nossa universidade.

Aos irmãos da Fraternidade Pequena Via, que caminham comigo nesta Via de Amor, Confiança, Abandono e Humildade, e me ensinam a “fazer as coisas ordinárias de forma extraordinária”.

Aos bodes que participaram deste experimento, Pardo Novo, Kiko, Peri e Mono, e todos os outros animais que foram o meio e objetivo da minha formação.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para as minhas formações acadêmica e pessoal, e também para a realização deste trabalho...

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

JULIO CESAR OLIVEIRA DIAS, filho de Tarquinio Lelis Dias e de Maria Serrat Oliveira Dias, nasceu em Três Rios, no estado do Rio de Janeiro, em 28 de janeiro de 1982.

Em Viçosa, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, em março de 2003, graduando-se em janeiro de 2008. Durante esse período, foi Bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Em agosto de 2008, iniciou o curso de Pós-graduação em Zootecnia, Mestrado, área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação do Prof. Dr. Antonio Bento Mancio, concluindo em julho de 2010, com a defesa de dissertação intitulada “Adição de Ringer Lactato, Citrato de Sódio 2,92% e solução TRIS em sêmen caprino descongelado”.

Em agosto de 2010, iniciou o curso de Pós-graduação em Zootecnia, Doutorado, área de concentração Fisiologia e Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Cristina Mattos Veloso, submetendo a defesa da tese em 20 de março de 2014.

CONTEÚDO

	Pg
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
 INTRODUÇÃO GERAL	 1
 ARTIGOS DE REVISÃO DE LITERATURA	 5
 ARTIGO 1: A sazonalidade na reprodução dos mamíferos – uma revisão	 5
1. Introdução	6
2. Fotoperíodo e o ritmo circadiano	7
2.1 Influência do fotoperíodo na sazonalidade reprodutiva	7
2.2 Ritmo circadiano e a reprodução em mamíferos	9
3. Outros fatores que influenciam a sazonalidade reprodutiva	10
4. Síntese da melatonina	11
5. Regulação, excreção, transporte e metabolismo da melatonina	13
6. Local de ação da melatonina no sistema nervoso central	15
7. Receptores de melatonina	16
8. Controle reprodutivo da melatonina	16
8.1 Padrão de secreção do GNRH e gonadotrofinas na estação reprodutiva e no anestro	16
8.2 Interneurônios como aferentes ao GnRH	19
8.3 Secreção de melatonina e liberação de GnRH/LH sob influência de esteroides gonadais na ovelha	20
8.4 A atuação da melatonina nos ovários	21
9. Considerações finais	24
10. Referências bibliográficas	24
 ARTIGO 2: A influência do fotoperíodo na reprodução do macho caprino e ovino	 44
1. Introdução	44
2. Fotoperíodo e avaliação andrológica	46
2.1 Variação do volume testicular e sazonalidade	47
2.2 Tempo de reação e sazonalidade	48
2.3 Síntese de testosterona e sazonalidade	49
2.4 Características seminais e sazonalidade	52
3. A melatonina na reprodução do macho	53
3.1 Melatonina como molécula antioxidante e protetora do DNA celular	54
3.2 Melatonina e conservação do sêmen	57
3.3 Melatonina como redutora de apoptose	58
3.4 Melatonina como indutor da capacitação e hiperativação espermática e reação acrossômica	59
4. O plasma seminal e a sazonalidade	61
5. Considerações finais	65
6. Referências bibliográficas	65

	Pg
ARTIGOS CIENTÍFICOS	80
ARTIGO 1: Parâmetros fisiológicos de machos caprinos criados em condições de clima tropical de altitude	80
1. Introdução	81
2. Material e métodos	82
3. Resultados e discussão	85
4. Conclusão	93
5. Referências bibliográficas	93
ARTIGO 2: Variação sazonal na atividade reprodutiva de caprinos criados em condições de clima tropical de altitude	100
1. Introdução	101
2. Material e métodos	103
3. Resultados e discussão	107
4. Conclusão	119
5. Referências bibliográficas	119
ARTIGO 3: Variações sazonais na composição do plasma seminal caprino	126
1. Introdução	127
2. Material e métodos	129
3. Resultados e discussão	131
4. Conclusão	139
5. Referências bibliográficas	139
CONCLUSÕES GERAIS	145

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Figura 1: desenho esquemático da síntese de melatonina	12
Figura 2: perfis de quarenta e oito horas de melatonina no soro de quatro bezerros que receberam 16E:8L, e 8E:16L	14
Figura 3: modelo do controle da estação reprodutiva na ovelha	17
Figura 1: epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos de hamsters expostos ao fotoperíodo longo (A) ou curto (B)	48
Figura 2: médias mensais dos parâmetros andrológicos em carneiros da raça Chios e Daglic durante o ano	53
Figura 3: ações da melatonina reduzindo radicais livres	55
Figura 1: variações mensais das temperaturas (°C) máximas e mínimas, e luminosidade (h) durante o período experimental (2012-2013) na região de Viçosa, MG – Brasil (20°45'20"S e 42°52'40"W)	104
Figura 2: variações mensais do perímetro escrotal (cm) e volume (mL) testicular de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	110
Figura 3: variações mensais do volume (mL) e concentração (espermatozoide/mL) seminal de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	110
Figura 4: variações mensais dos hormônios FSH (mUI/mL), LH (mUI/mL), e testosterona (ng/mL) de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	115
Figura 5: tempo de reação médio (seg.) durante a estação reprodutiva e não-reprodutiva de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	117
Figura 1: perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos durante doze meses em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 10 e 14 % (SDS-PAGE)	132

LISTA DE TABELAS

	Pg
Tabela 1- Influência da sazonalidade na circunferência testicular, concentração plasmática de testosterona e alterações seminais de ovinos e caprinos	51
Tabela 1 – Médias e erros padrão da média da temperatura ambiente (°C), da umidade relativa do ar (%) e do índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU) nas estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG - Brasil)	84
Tabela 2- Médias e erros padrão da média dos parâmetros fisiológicos de machos caprinos da raça Alpina nas diferentes estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	87
Tabela 3 - Médias e erros padrão da média das concentrações séricas dos hormônios cortisol, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) de machos caprinos da raça Alpina nas diferentes estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	89
Tabela 4 - Médias e erros padrão do hematócrito, proteína total e leucograma de machos caprinos da raça Alpina nas diferentes estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)	91
Tabela 1 - Variações mensais das mensurações escrotal e testiculares de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) (Média ± SE)	109
Tabela 2 - Variações mensais dos parâmetros do sêmen fresco e descongelado, coletado de machos caprinos da raça Alpina (Média ± SE)	109
Tabela 3 - Variações mensais dos hormônios FSH (mUI/mL), LH (mUI/mL), e testosterona (ng/mL) de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) (Média ± SE)	114
Tabela 4 - Frequência dos sinais fisiológicos de comportamento sexual observados durante as coletas de sêmen, nas estações reprodutiva e não-reprodutiva, de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) (Média ± SE)	117
Tabela 1. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos durante doze meses em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 10% (SDS-PAGE)	133
Tabela 2 - Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos durante doze meses em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 14 % (SDS-PAGE)	133
Tabela 3 - Médias e desvio padrão da luminosidade (h), motilidade progressiva (0-100%) dos sêmens fresco e congelado, na região de Viçosa/MG-Brasil (20°45'20"S e 42°52'40" W), durante o período experimental (Médias ± SE)	135
Tabela 4 - Médias mensais dos parâmetros bioquímicos e do perfil proteico do plasma seminal de caprinos da raça Parda Alpina durante doze meses	135

RESUMO

DIAS, Julio Cesar Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Avaliação sazonal de parâmetros fisiológicos de reprodutores caprinos da raça alpina.** Orientadora: Cristina Mattos Veloso. Coorientadora: Rita Flávia Miranda de Oliveira Donzele.

Esse trabalho avaliou durante doze meses a capacidade adaptativa e as variações dos parâmetros fisiológicos e reprodutivos de quatro machos caprinos da raça Alpina, criados em condições de clima tropical de altitude. A temperatura ambiente, a umidade relativa do ar e a temperatura do globo negro, para o cálculo do ITGU, foram coletadas em cinco momentos do dia, três vezes por semana, durante as quatro estações climáticas anuais. A temperatura ambiente máxima e mínima, e a luminosidade foram registradas diariamente, enquanto as avaliações seminais, hormonais, sanguíneas, comportamentais, as frequências respiratória e cardíaca, e as temperaturas retal e superficial foram realizadas quinzenalmente. Houve diferença entre os valores médios da temperatura superficial, da frequência respiratória, dos hormônios e de alguns parâmetros hematológicos (proteína total e monócitos) entre as estações climáticas ($P < 0,05$). No entanto, não foram observadas situações de estresse térmico, com base nos parâmetros fisiológicos que ficaram dentro da normalidade e do esperado para espécie caprina. Houve diferença ($P < 0,05$) entre os valores médios mensais do perímetro escrotal, volume testicular, volume e concentração do sêmen fresco, vigor espermático do sêmen descongelado, níveis séricos de testosterona, FSH e LH e alguns comportamentos sexuais de cortejo e cópula. As variações anuais dos parâmetros testicular e seminal podem ter sido determinadas pelas estações reprodutiva e não-reprodutiva, principalmente, pela frequência de utilização dos machos reprodutores. Os parâmetros seminais durante todo o período experimental ficaram próximos ou superiores aos valores recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), não sendo observadas diferenças durante o ano na motilidade progressiva e funcionalidade da membrana (teste hiposmótico) para o sêmen descongelado ($P > 0,05$), permitindo inferir que o ambiente não levou a alterações nas membranas plasmáticas espermáticas e diminuição da qualidade seminal. No gel de poliacrilamida de 10% foram identificadas 22 bandas proteicas com pesos moleculares de 25 a 181 kDa, enquanto no gel de 14%, foram identificados 16 bandas proteicas com pesos moleculares de 5,7-165 kDa. Somente as frações proteicas de 5,7 e 34,3-34,5 kDa apresentaram um perfil variável com a sazonalidade reprodutiva da espécie caprina, com aumento da produção durante o período da estação reprodutiva. Nas análises

dos parâmetros bioquímicos, foi observado que as concentrações do cálcio, fósforo e colesterol também apresentaram variação sazonal durante o período experimental. No entanto, as análises da motilidade progressiva do semen fresco e descongelado, assim como do teste hiposmótico no semen descongelado não apresentaram variação durante o período experimental ($P>0,05$). Assim, conclui-se que os machos caprinos da raça Alpina, criados de forma intensiva, mantêm a homeotermia e grande adaptabilidade às condições do clima tropical de altitude. Além disso, as variações que ocorreram na quantidade e qualidade seminal, no perfil hormonal e em alguns comportamentos sexuais, não devem ser consideradas como um impedimento para utilização dos machos caprinos da raça Alpina em regiões de clima tropical de altitude durante todo o ano. Essas variações estão relacionadas à frequência de cobertura das fêmeas e, ou, influência do fotoperíodo, e não levam a alterações no sêmen que possam comprometer a capacidade de fertilização desses animais.

ABSTRACT

DIAS, Julio Cesar Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2014. **Seasonal evaluation of physiological parameters of Alpine goats breeding.** Adviser: Cristina Mattos Veloso. Co-adviser: Rita Flávia Miranda de Oliveira Donzele.

This study evaluated twelve months the adaptive capacity and variations in physiological and reproductive parameters four Alpine male goats raised in tropical climate of altitude. The ambient temperature, relative humidity and black globe temperature, to calculate the BGHI, were collected at five times of the day, three times for week, during the four annual seasons. The maximum and minimum temperature and luminosity were recorded daily, while seminal, hormonal, blood, behavioral assessments, respiratory and heart rates, and rectal and surface temperatures were carried out fortnightly. There was difference between the mean values of surface temperature, respiratory rate, hormones and some hematological parameters (total protein and monocytes) between the seasons ($P < 0,05$). However, no were observed cases of heat stress, based on physiological parameters were within normal and expected for goats. There was difference ($P < 0,05$) between the monthly average scrotal circumference, testicular volume, volume and concentration of fresh semen, sperm vigor of the thawed semen, serum levels of testosterone, FSH and LH and some sexual behaviors of courtship and copulation. Annual variations in testicular and seminal parameters may have been determined by the reproductive and non-reproductive seasons, mainly by the frequency of use of breeding males. The seminal parameters throughout the experimental period were near or above those values recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA), and no differences were observed during the progressive motility and functionality of the membrane (hyposmotic test) for thawed semen ($P > 0,05$), it can be inferred that the environment has not led to changes in sperm plasma membranes and decreased semen quality. At a 10% polyacrylamide gel were identified 22 protein bands with molecular weights of 25-181 kDa, while the 14% gel were identified 16 protein bands with molecular weights of 5.7 to 165 kDa. Just the protein fractions of 5.7 and 34.3 to 34.5 kDa showed a varying profile with the reproductive seasonality of goats, with increased production during the breeding season. In the analysis of biochemical parameters was observed that the concentrations of calcium, phosphorus and cholesterol also showed seasonal variation during the experimental period. However, analysis of the progressive motility of fresh and thawed semen, as well as the hyposmotic test in thawed semen showed

no change during the experimental period ($P>0,05$). Thus, it is concluded that the male goats of the Alpine, reared intensively, keep homeothermy and great adaptability to the conditions of the tropical climate of altitude. Furthermore, the changes that occurred in the quantity and quality sperm, in the hormonal profile and some sexual behaviors, should not be regarded as an impediment to the use of Alpine male goats in tropical altitude climate throughout the year. These variations are related to the frequency of coverage of females, or influence of photoperiod, and not lead to changes in the semen that may compromise the fertilizing capacity of these animals.

INTRODUÇÃO GERAL

A Caprinocultura brasileira, apesar de ser predominante na região nordeste (91,1% do rebanho nacional), tem se expandido por todo território nacional sendo um grande potencial para o desenvolvimento sócio-econômico do país pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele. Dos anos de 2003 a 2011, as regiões centro-oeste, norte e sul aumentaram seus rebanhos, respectivamente, em 10,2 %, 17,7 % e 66,6 % (ANUALPEC, 2013). No entanto, apesar da demanda por produtos lácteos e cárneos ter crescido o rótulo de “atividade de subsistência” ainda é presente em algumas regiões do Brasil. O padrão extensivo de produção e os baixos níveis de tecnologias se somam à falta de organização e integração da cadeia produtiva e, assim, diminuem a produtividade e expressão da caprinocultura no mercado (XIMENES et al., 2009).

Para auxiliar no crescimento da produção e buscar novos mercados para os produtos lácteos e cárneos se faz necessário a utilização de programas eficientes e práticos para a multiplicação do rebanho com mérito genético. Sendo assim, os diversos segmentos da área de Produção Animal buscam encontrar através das Biotecnologias da Reprodução o aumento do número de animais de elevada qualidade produtiva (FONSECA, 2006; PAULA et al., 2008).

Dentre as raças mais utilizadas nos rebanhos leiteiros brasileiros, destacam-se as importadas: Parda Alpina, dos Alpes franceses e suíços, e Saanen, da Suíça. Essas raças, originadas em regiões de clima temperado, possuem estacionalidade reprodutiva controlada pelo fotoperíodo, isto é, pelo número de horas de luz do dia, em ambientes com latitudes maiores que 20° S (Centro-Sul do Brasil) (CORRÊA et al., 2009).

O ciclo anual do fotoperíodo é o principal fator responsável pelas alterações na atividade reprodutiva, enquanto o clima (temperatura, umidade), o estado nutricional (magreza ou obesidade), presença ou ausência de alimento e a interação social têm sido considerados moduladores da sazonalidade reprodutiva (MILCZEWSKI, 2008). As alterações na fisiologia reprodutiva ocorrem devido às mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas com a diminuição da produção de melatonina durante os dias mais longos do ano (primavera-verão), ou com seu aumento nos dias mais curtos (outono-inverno) (SOUSA et al., 2008).

Nas fêmeas, um dos principais entraves na produção é a ausência de ciclicidade durante os períodos de maior luminosidade (primavera-verão), porém já foram criadas alternativas como, hormônio-terapia e programas de luz, que diminuem a “influência negativa” desse fotoperíodo crescente. Entretanto, nos machos, apesar de não ocorrer

ausência de produção espermática em nenhuma época do ano, alguns produtores observam baixa libido nos bodes, assim como, uma baixa qualidade e viabilidade do sêmen caprino para criopreservação por parte dos pesquisadores, nos períodos de contra-estação. Assim, mais estudos devem ser realizados com machos caprinos a fim de se obter maior eficiência reprodutiva e econômica dos rebanhos, com o aumento da produção.

Nos rebanhos em que se utilizam monta controlada com programas de iluminação artificial ou aplicação de hormônios nas fêmeas durante a contra-estação, considera-se a proporção de um macho para cada cinquenta fêmeas. Entretanto, as cabras geralmente são penalizadas caso não fiquem prenhes, desconsiderando-se a possível ineficiência do macho. Assim, independente do tamanho e sistema de produção, a presença de bodes em uma propriedade com alterações no comportamento sexual ou na quantidade e qualidade de sêmen pode levar a diminuição da produção de crias, com consequente impacto econômico ao produtor devido à diminuição da produção de leite e aumento dos custos (energia elétrica, medicamentos, materiais de consumo e mão de obra).

Ainda se deve considerar, as propriedades que utilizam da inseminação artificial (IA) como base de seus programas reprodutivos ou como parte integrante de outras biotecnologias da reprodução (transferência de embrião, FIV, ICSI). Com a utilização da IA, pode-se realizar o melhoramento genético do rebanho com maior rapidez e eficiência, introduzindo genes que elevarão a qualidade ou produtividade. Também pode ser utilizada para preservar a genética de raças nativas sob o risco de extinção, como algumas nordestinas, e de animais que já tenham morrido ou não se encontram mais nas propriedades. Porém, no Brasil e no mundo, a utilização da IA na espécie caprina, ainda não acontece no mesmo nível que os bovinos.

Entre as diversas barreiras que levam a menor utilização da técnica de IA em caprinos, encontram-se, principalmente, as dificuldades no processo de preservação do sêmen. As crioinjúrias causadas nos espermatozoides congelados em nitrogênio líquido, ainda levam a baixa qualidade espermática no descongelamento e resultados insatisfatórios nos índices de concepção (KARATZAS et al., 1997).

No plasma seminal, encontram-se substâncias que têm a função de nutrir, proteger e preparar as células espermáticas para a fecundação. A análise do perfil protéico durante as variações do fotoperíodo pode mostrar a presença de proteínas que auxiliam na criopreservação espermática e que são produzidas somente em determinadas épocas do ano. Algumas dessas proteínas, como as “proteínas de proteção ao choque térmico”

(RSVP14 e RSVP20) relacionadas ao aumento da resistência dos espermatozóides ao congelamento e a preservação da integridade da membrana, já foram encontradas em ovinos (PÉREZ-PÉ et al., 2001; BARRIOS et al., 2005), porém necessita-se ainda de muitas pesquisas com machos caprinos. Essas moléculas poderiam ser, posteriormente, sintetizadas, natural ou artificialmente, e incluídas em diluentes utilizados no congelamento. Portanto, o conhecimento da composição bioquímica do plasma seminal caprino durante o ano pode permitir o aperfeiçoamento de tecnologias reprodutivas como a criopreservação do sêmen em alta qualidade.

A partir dessas observações percebe-se a necessidade de se investir mais em pesquisas com bodes de aptidão leiteira para que aumentem a eficiência reprodutiva dos rebanhos nacional. Com o conhecimento e análise da influência do fotoperíodo e outras variáveis ambientais na reprodução de machos caprinos leiteiros pode-se compreender melhor a fisiologia do metabolismo e do comportamento sexual dessas raças, e assim, auxiliar na melhoria do manejo reprodutivo, aumentar o número de crias e produção leiteira, e diminuir os custos e descartes de animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC – **Anuário da pecuária brasileira**. Consultoria AgraFNP. São Paulo: Editora FNP, 360p. 2013.

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

CORRÊA, M. N.; RABASSA, V. R.; GONÇALVES, F. M.; DA SILVA, S. J. P.; SCHNEIDER, A. **Série NUPEEC produção animal: caprinocultura**. Pelotas: Ed. Universitária PREC/UFPEL, 2009, 154p.

FONSECA, J. F. Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 (supl.1), p.65-70, 2006.

KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; BRIKAS, P. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v.48, p.1049-1059, 1997.

MILCZEWSKI, V. **Influência sazonal na função testicular de ovinos da raça suffolk em baixa latitude: inter-relações entre circunferência escrotal, parâmetros morfológicos testiculares e testosterona sérica com a produção de sêmen**. 2008. 107 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

PAULA, R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vivo*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32(1), p.21-35, 2008.

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

SOUSA, C. E. C.; CRUZ-MACHADO, S. S; TAMURA, E. K. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.15-20, 2008.

XIMENES, L. J. F.; MARTINS, G. A.; SOBRINHO, J. N.; CARVALHO, J. M. M. **As ações do banco do nordeste do Brasil em P&D na arte da pecuária de caprinos e ovinos no nordeste brasileiro - Série BNB Ciência e Tecnologia nº 03**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 436p., 2009.

A SAZONALIDADE NA REPRODUÇÃO DOS MAMÍFEROS: UMA REVISÃO

Seasonality in mammalian reproduction: a review

Resumo: Alguns fatores relacionados ao ambiente externo influenciam direta ou indiretamente os animais, fazendo com que eles apresentem características específicas em sua fisiologia reprodutiva. Dentre as variáveis ambientais, destaca-se o fotoperíodo diário, que permite classificar as espécies sazonais em animais de dia curto (pequenos ruminantes e bubalinos) e de dia longo (equinos). Assim, nessas espécies o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é modulado pela atuação da melatonina que é liberada em concentrações proporcionais a intensidade luminosa. A melatonina influencia a liberação direta do GnRH e indireta de gonadotrofinas (FSH e LH), assim como, influencia a gametogênese, síntese de hormônios sexuais e os comportamentos sexuais. O objetivo com essa revisão é abordar a influência do fotoperíodo na fisiologia reprodutiva, analisando os efeitos do ritmo circadiano e os aspectos fisiológicos da melatonina na regulação e modulação da reprodução animal.

Palavras-chave: fotoperíodo, gonadotrofinas, melatonina, ritmo circadiano.

Abstract: Some factors related to the external environment directly or indirectly influence the animals, causing them to exhibit specific characteristics in their reproductive physiology. Among the environmental variables, there is the daily photoperiod, which allows classifying the seasonal species in short- day animals (buffaloes and small ruminants) and long-day (horses). Thus, in these species the functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is modulated by the action of melatonin that is released in concentrations proportional to light intensity. Melatonin influences the release direct of GnRH and indirect of gonadotropins (FSH and LH), as well as gametogenesis influence, the synthesis of sex hormones and sexual behavior. The aim of this review is to evaluate the influence of photoperiod on reproductive physiology, analyzing the effects of circadian rhythm and the physiological aspects of melatonin in the regulation and modulation of animal reproduction.

Key-words: circadian rhythm, gonadotropins, melatonin, photoperiod.

1. INTRODUÇÃO

Os mamíferos desenvolveram diferentes estratégias fisiológicas que os permitem manifestar suas estações reprodutivas em períodos específicos do ano, possibilitando o nascimento de seus filhotes em épocas com maior disponibilidade de alimento e melhor adaptação à temperatura (GOLDMAN, 2001; SMITH, 2012). Dessa forma, as espécies que são influenciadas por variações ambientais sazonais apresentam durante o ano períodos que possibilitam, ou não, a reprodução, refletindo na gametogênese e manifestação de comportamentos reprodutivos.

O ciclo anual do fotoperíodo foi identificado como o fator determinante para esse fenômeno fisiológico, porém ele sofre influência de alguns fatores moduladores como, a temperatura ambiental, o estado nutricional dos animais, as interações sociais, a data do parto e o período de lactação (NAGY et al., 2000; ROSA & BRYANT, 2003).

O estímulo fótico captado pela retina permite que, por meio do eixo retina-hipotálamo-pineal, seja ativada ou não a via biossintética do hormônio melatonina (SOUZA et al., 2008). Dentre as várias funções desse neurotransmissor, destaca-se a regulação, ainda não totalmente esclarecida do decapeptídeo, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o qual induz a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (FRUNGIERI et al., 2005; VANECEK, 1998). Os neurônios que sintetizam e liberam o GnRH encontram-se no hipotálamo, porém estudos recentes evidenciam a participação de outras moléculas, como as kisspeptinas, na regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BERLINGUER et al., 2009).

A gametogênese e a síntese de hormônios sexuais que levam ao desenvolvimento de características fenotípicas e as manifestações sexuais secundárias são ativadas pelos hormônios FSH e LH (TENA-SEMPERE & HUHTANIEMI, 2003). As espécies poliétricas sazonais, como os pequenos ruminantes, bubalinos e equinos, são sensíveis ao fotoperíodo e os hormônios sexuais são sintetizados e liberados pela adenohipófise de acordo com as variações de luminosidade durante o ano (BITTMAN et al., 1985; MALPAUX et al., 2001). Por outro lado, as espécies poliétricas contínuas, como os bovinos, não são influenciadas pela luminosidade e a produção e secreção das gonadotrofinas ocorrem constantemente, de acordo com o período do ciclo estral.

Aquelas espécies em que a diminuição do fotoperíodo e o aumento da concentração de melatonina na corrente sanguínea estimulam as suas atividades reprodutivas são classificadas como espécies de dia curto, como as cabras e algumas raças de ovelha e

búfalas. No entanto, espécies como a equina, que têm suas atividades reprodutivas estimuladas com o aumento da intensidade luminosa e, conseqüentemente, diminuição da concentração de melatonina, são chamadas de espécies de dia longo (ROSA & BRYANT, 2003).

Assim, tem-se como objetivo com essa revisão abordar a influência do fotoperíodo na fisiologia reprodutiva, analisando os efeitos do ritmo circadiano e os aspectos fisiológicos da melatonina na regulação e modulação da reprodução animal.

2. FOTOPERÍODO E O RITMO CIRCADIANO

2.1 Influência do fotoperíodo na sazonalidade reprodutiva

Fotoperíodo é representado pelo comprimento de um dia e consiste no período de duração da luz em um determinado local, tendo relação direta com a latitude e estação do ano (ROCHA et al., 2011). Os animais que vivem sob grandes variações de fotoperíodo durante o ano podem apresentar sazonalidade nas suas funções fisiológicas, comportamentais e morfológicas (MALPAUX, 2006).

Essa variação fotoperiódica anual é diretamente proporcional à latitude e altitude da região, e o aumento da sua amplitude influencia diretamente a reprodução dos animais sazonais (ROSA & BRYANT, 2003). Dependendo da espécie e do seu tempo de gestação, os animais apresentam fases de atividade e quiescência reprodutiva, de forma alternada, durante o ano. Assim, quanto mais próximo à Linha do Equador, menor e menos definida será a estação reprodutiva (MALPAUX, 2006).

Dentre outras condições ambientais variáveis que podem influenciar a estacionalidade reprodutiva dos animais, encontram-se a sazonalidade da alimentação e do clima, os quais possuem menores variações durante o ano em regiões com menores latitudes (MALPAUX, 2006). O ciclo anual de chuva influencia diretamente na disponibilidade de alimento para a cria e a mãe lactante, enquanto a temperatura ambiental tem relação com a adaptação e sobrevivência do recém-nascido (ABECIA et al., 2012; VANECEK, 1998; VIVIEN-ROELS & PÉVET, 1983). No entanto, o comprimento da luminosidade diária é o agente sincronizante mais usado pelo organismo animal, pois, diferente das outras variáveis ambientais, ele é constante entre os anos (KARSCH et al., 1984; MALPAUX, 2006).

Os equinos são considerados reprodutores com atividade reprodutiva em “dias longos”, com início da estação reprodutiva na primavera, associada ao aumento da incidência da luz solar, disponibilidade de alimento e temperatura durante os dias (NAGY et

al., 2000). Por outro lado, os caprinos e algumas raças de ovinos e bubalinos são comumente classificados como reprodutores com atividade reprodutiva em “dias curtos”, pois iniciam a atividade sexual em resposta à diminuição da luminosidade diária (final do verão e início do outono) e entram em anestro reprodutivo no final do inverno (VANECEK, 1998; ROCHA et al., 2011; ABECIA et al., 2012). Essas espécies são classificadas como poliéstricas estacionais ou sazonais, pois apresentam ciclos estrais consecutivos somente durante a estação reprodutiva das fêmeas. Da mesma forma, a estacionalidade reprodutiva é também evidente nos machos, os quais apresentam variação na quantidade e qualidade espermática (ORTAVANT et al., 1988), porém sem prejuízos à eficiência reprodutiva durante o ano (AGUIRRE et al., 2007)

Os pequenos ruminantes que possuem suas origens em regiões com latitudes entre 35 °N e 35 °S têm a tendência de se reproduzir em todas as épocas do ano, enquanto aquelas de locais com latitudes superiores a 35 °S/N possuem estação reprodutiva bem definida (DYRMUNDSSON, 1978; AVDI et al., 2004; MALPAUX, 2006). As raças de origem tropical e subtropical são consideradas não sazonais ou poliéstricas contínuas e utilizam as variáveis qualidade e disponibilidade de alimento como os direcionadores principais para a estação reprodutiva (ROSA & BRYANT, 2003; AGUIRRE et al., 2007; ARROYO et al., 2007). Assim, quanto maior a latitude da região, maior a dependência do fotoperíodo e mais restrito o período de atividade reprodutiva.

Durante a estação reprodutiva de cabras e ovelhas, ocorrem mudanças no comportamento sexual, aumento da síntese dos hormônios FSH e LH, e ciclos estrais sucessivos. Nas fêmeas, ocorre a sucessão de intervalos regulares do comportamento estral e ovulação (17 a 21 dias), caso a prenhez não se desenvolva (ROSA & BRYANT, 2003). A transição da fase de anestro para estação reprodutiva é gradual, com a ocorrência de pequenos ciclos reprodutivos, já que o primeiro corpo lúteo (CL) inicia seu regresso, geralmente, de forma prematura (5-6 dias) após sua formação. Algumas discrepâncias podem ocorrer no início e no final da estação sexual quando algumas ovulações não são acompanhadas do comportamento de estro (ORTAVANT et al., 1988).

Convém lembrar que mesmo durante a fase de anestro, ocorrem crescimento e regressão folicular, além da produção dos hormônios hipofisários LH e FSH (GORDON, 1997). No entanto, enquanto não são observados diferenças nas concentrações plasmáticas do FSH entre as estações reprodutivas (WALTON et al., 1977), na fase de anestro, a concentração da Progesterona (P4) permanece praticamente indetectáveis (I'ANSON & LEGAN, 1988). O

mesmo ocorre com a frequência de liberação do LH, que na estação de anestro é menor que na estação reprodutiva (THIÉRY & MARTIN, 1991).

As variações sazonais no comportamento e fisiologia do reprodutor ovino são menos pronunciadas que na ovelha, porém é possível observar alterações na atividade hormonal, espermatogênese e peso testicular (LINCOLN & DAVIDSON, 1977; ORTAVANT et al., 1988). Foi observado em machos da raça Ile-de-France um aumento entre a estação de anestro e a estação reprodutiva de aproximadamente 67 % do peso testicular e de 1×10^9 para $4,8 \times 10^9$ espermatozoides/mL da produção espermática (ORTAVANT et al., 1988). Lincoln & Davidson (1977) trabalhando com reprodutores da raça Soay observaram que o início do aumento das concentrações de LH e FSH acontece 2-4 semanas após a diminuição do fotoperíodo, seguido por aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona e aumento do peso dos testículos.

A atividade sexual no reprodutor ovino é normalmente estimulada pelo fotoperíodo 1-1,5 meses antes que em ovelhas. Assim, quando o período cíclico das fêmeas se inicia, os machos já estabeleceram a atividade sexual. Essa sensibilidade diferenciada ao fotoperíodo é importante, pois enquanto as ovelhas em anestro ovulam dentro de poucos dias após o início da estimulação hormonal, os carneiros necessitam de cerca de 45 dias para estabelecer completamente a espermatogênese (ROSA & BRYANT, 2003).

2.2 Ritmo circadiano e a reprodução em mamíferos

O ritmo circadiano é um ritmo biológico que persiste sob condições ambientes constantes (claro, escuro, temperatura) com um período de duração próximo de 24 h. Dessa forma, a persistência da ritmicidade mesmo em condições que não apresentam variação, demonstra que o ritmo biológico dos organismos é endógeno e geneticamente determinado, de forma independente do ambiente em que se encontram (KENNAWAY, 2005). No entanto, a ritmicidade biológica dos organismos possui grande relação com a ritmicidade do ambiente externo, uma vez que o ritmo circadiano pode ser ajustado pelo ambiente, agindo sincronicamente com o mesmo (SOUSA et al., 2008).

Nos mamíferos, o responsável por constituir os marcapassos geradores da ritmicidade circadiana é uma estrutura hipotalâmica denominada Núcleo Supraquiasmático (NSQ). Este relógio central ou biológico é uma concentração de neurônios pareados e células da glia no hipotálamo anterior, adjacentes ao quiasma óptico e divididos pelo terceiro ventrículo (RICHTER et al., 2004; KENNAWAY, 2005).

Por meio do NSQ o ritmo circadiano regula vários processos biológicos e psicológicos do organismo, como digestão (GAUCHE et al., 2006), estado de vigília e sono (FERNANDES, 2006), renovação celular (WARDIL, 2008), controle da temperatura (FERNANDES, 2006), locomoção, ingestão de água (STEPHAN & ZUCKER, 1972), liberação de corticosterona (MOORE & EICHLER, 1972) e reprodução (ABECIA et al., 2012).

De acordo com o ciclo luz-escuro, a glândula pineal recebe sinais do sistema nervoso para sintetizar e liberar a melatonina (CLARKE et al., 2009), e assim, prepara os organismos, de forma fisiológica ou comportamental, para as mudanças ambientais externas que ocorrem ciclicamente (ARENDT, 1995; MARQUES & MENNA-BARRETO, 2003). Dentre as várias funções deste transdutor fotobiológico está a modulação, nas espécies sazonais, do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (VANECEK, 1998; ROCHA et al., 2011), ou seja, a regulação da fisiologia reprodutiva desses animais. Assim, a retirada ou denervação da glândula pineal provocam a perda da capacidade de responder às funções sazonais, embora as respostas aos ritmos circadianos continuem (ARENDT, 1998; VANECEK, 1998).

Os mecanismos de ação da melatonina na reprodução de mamíferos ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, sabe-se da sua influência na secreção de gonadotrofinas (FSH e LH), na atividade das gônadas (gametogênese e síntese de esteroides) e no comportamento sexual (MALPAUX et al., 2001; CLARKE et al., 2009).

3. OUTROS FATORES QUE INFLUENCIAM A SAZONALIDADE REPRODUTIVA

Além do fotoperíodo existem alguns fatores ambientais como, temperatura, nutrição, e interações sociais, que podem modular a estação reprodutiva dos animais (NAGY et al., 2000; ROSA & BRYANT, 2002).

As temperaturas ambientais máxima e mínima podem estar relacionadas com o início da atividade reprodutiva em éguas, como demonstrado por Guerin & Wang (1994), que observaram durante anos que a primeira ovulação acontecia imediatamente após as mesmas sequências de temperaturas máxima e mínima. Também foi observado que ovelhas mantidas sob baixas temperaturas durante o verão iniciaram a atividade reprodutiva mais cedo que aquelas mantidas em temperaturas ambientais típicas da estação (GODLEY et al., 1966). Assim, em condições de mesmo fotoperíodo, nutrição e manejo, a temperatura ambiental tem um papel de inicializador do ritmo circadiano reprodutivo (NAGY, et al., 2000).

Enquanto nas regiões temperadas a estação reprodutiva tem como fator

determinante o fotoperíodo e os outros fatores ambientais somente influenciam o início e a duração da estação reprodutiva, nas regiões tropicais a condição nutricional pode ser responsável por alguma aciclicidade sazonal (ROSA & BRYANT, 2003). Independente se a espécie sofre influência do fotoperíodo ou não, a nutrição é um dos principais fatores que interfere diretamente ou indiretamente nas várias áreas da reprodução como, puberdade, gametogênese, esteroidogênese, taxa de ovulação, parto, intervalo de partos e sobrevivência embrionária (ROBINSON, 1996).

Nas espécies sazonais, de acordo com o período de gestação, a regulação da estação reprodutiva por meios da nutrição se faz com o objetivo dos seus filhotes nascerem em épocas do ano com boa disponibilidade de alimento para eles e para suas mães que estarão em lactação. Porém, o importante não é somente a ingestão de energia, mas também a qualidade da proteína da dieta disponível (VAN NIEKERK & VAN NIEKERK, 1997). Assim, é possível que as datas de nascimentos de algumas espécies sofram variações naquelas regiões em que a precipitação pluvial é muito variável (THIMONIER et al., 1986).

Além desses fatores, podem-se destacar ainda a lactação e a baixa condição corporal da mãe que influencia negativamente o retorno da ciclicidade ovariana e o momento da primeira ovulação após anestro sazonal (MALLAMPATI et al., 1971; BOUR et al., 1985), e as relações de hierarquia e submissão entre e dentro do mesmo sexo no rebanho que podem influenciar as variáveis reprodutivas dos machos e fêmeas (ROSA & BRYANT, 2002).

4. SÍNTESE DA MELATONINA

A melatonina, uma indolamina (N-acetil-5-metoxitriptamina) também conhecida como hormônio marcador de escuro, é sintetizada, principalmente, pela glândula pineal na ausência de sinais luminosos (SOUSA et al., 2008). Também pode ser sintetizada de forma rítmica diariamente pela retina (TOSINI & FUKUHARA, 2002), trato gastrointestinal (MESSNER et al., 2001), células imunocompetentes (PONTES et al., 2006), e ovário (ITOH et al., 1999). No entanto, a produção extra-pineal tem ação autócrina ou parácrina, enquanto a maior concentração plasmática do hormônio se deve a síntese pela glândula pineal (STEFULI et al., 2001).

No hipotálamo está localizado o Núcleo Supraquiasmático (NSQ), que recebe de forma rítmica e por meio dos neurotransmissores glutamato (DING et al., 1997) e PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) (HANNIBAL et al., 1997) os sinais captados pelos fotorreceptores da retina (RICHTER et al., 2004). O sinal é primeiro convertido no

núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo (Figura 1), segue para a parte torácica da medula espinhal e volta para o gânglio cervical superior (GCS) (RICHTER et al., 2004). Assim, pode-se concluir que lesões no NSQ ocasionam o desaparecimento da maior parte da melatonina circulante no organismo.

Durante a fase de escuro, as fibras pós-ganglionares simpáticas do GCS liberam noradrenalina (NA) que interage com os receptores α_1 e β -adrenérgicos nas membranas celulares dos pinealócitos da glândula pineal, ativando a expressão gênica de enzimas e a via biossintética de melatonina (Figura 1) (KLEIN et al., 1997; SOUSA et al., 2008). Esse hormônio é liberado em grandes quantidades no início da fase escura, sendo 100 vezes mais elevada do que durante o dia (DRIJFHOUT et al., 1996).

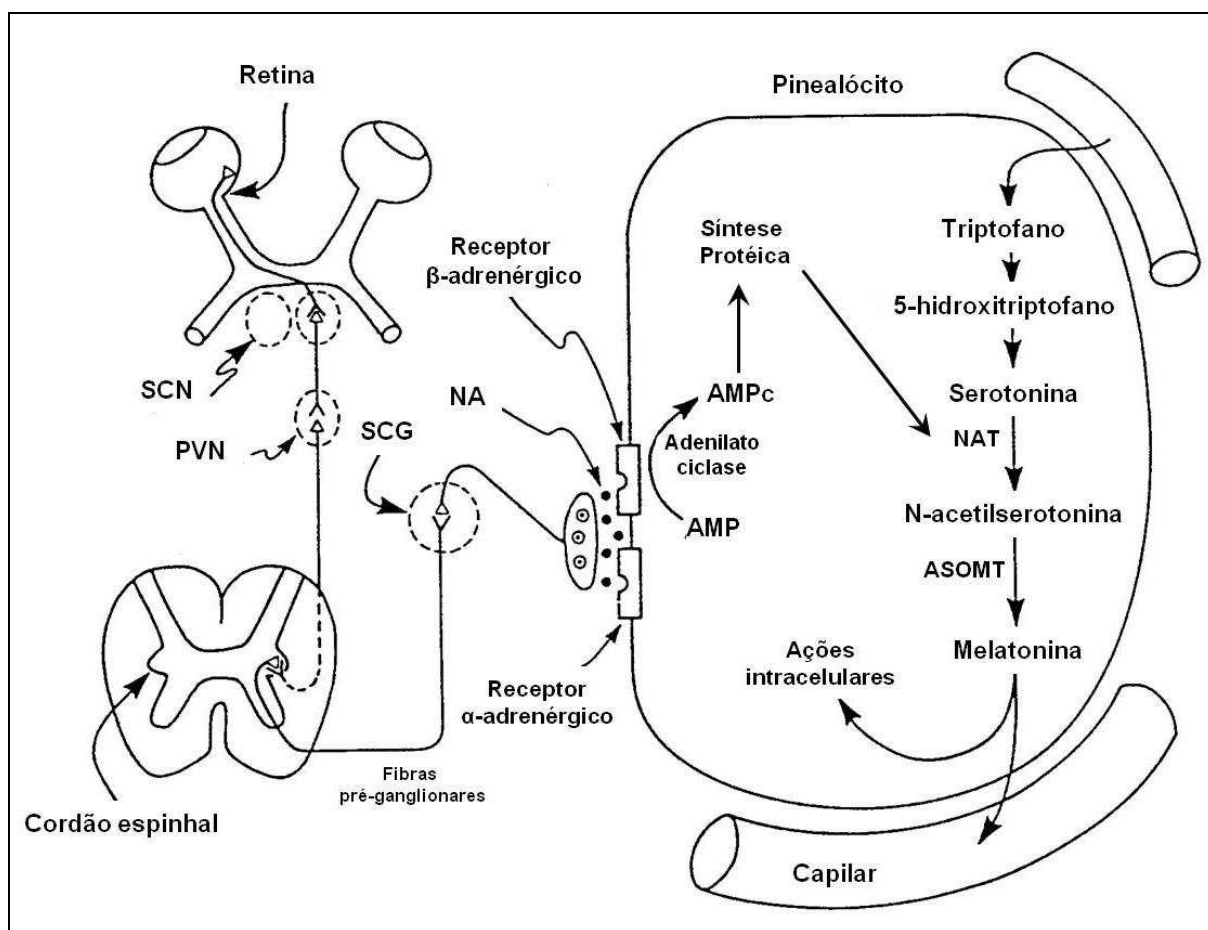


Figura 1: desenho esquemático da síntese de melatonina. SCN: núcleo hipotalâmico supraquiasmático; PVN: núcleo hipotalâmico paraventricular; SCG: gânglio cervical superior; NA: noradrenalina; NAT (ou AANAT): arilalkilamina-N-acetiltransferase; ASOMT: acetilserotonina O-metiltransferase. Fonte: adaptado de Reiter (1994).

O aminoácido essencial triptofano é capturado na corrente sanguínea e por uma via bioquímica é transformado em melatonina. Primeiramente ele é hidroxilado pela triptofano-

5-hidroxilase (T-5-H) a 5 hidroxitriptofano, descarboxilado pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HDT) a 5-hidroxitriptamina (serotonina), acetilado pela arilalkilamina-N-acetiltransferase (AANAT ou NAT) a N-acetilserotonina e metilado a melatonina pela enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), atualmente chamada acetilserotonina O-metiltransferase (ASOMT) (Figura 1) (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003; REITER et al., 2009).

5. REGULAÇÃO, EXCREÇÃO, TRANSPORTE E METABOLISMO DA MELATONINA

A transformação de triptofano em serotonina ocorre tanto durante o dia quanto a noite. No entanto, são encontradas maiores concentrações de serotonina na glândula pineal durante o dia que durante a noite, devido a alta transformação noturna da serotonina em melatonina (MALPAUX, 2006). Essa biotransformação e, conseqüentemente, aumento da melatonina noturna é extinto ou substancialmente reduzido em animais mantidos em constante luz (ARENDR, 1998; VANECEK, 1998).

A NA age nos receptores α_1 e β -adrenérgicos na membrana plasmática dos pinealócitos (Figura 1) (KLEIN, 1985), porém a ativação dos receptores β -adrenérgicos parece ser o principal caminho pelo qual a NA estimula a biossíntese de melatonina durante a fase escura (MALPAUX, 2006). Os efeitos da NA nos receptores β -adrenérgicos são mediados via a proteína G_s ligada ao GTP, levando a uma ativação da adenilato ciclase (AC), a qual aumenta até 10 vezes as concentrações do AMP cíclico (AMPC) (STRADA et al., 1972). O máximo aumento no AMPC é alcançado quando os receptores α_1 -adrenérgico são ativados no mesmo momento (VANECEK et al., 1985). Estimulação dos receptores α_1 -adrenérgico sozinhos não tem efeito no acúmulo de AMPC, mas causa grande aumento na concentração intracelular de íons cálcio livre, Ca^{2+} , e ativação da proteína quinase C (SCHOMERUS et al., 1995).

Nos roedores, o AMPC ativa a proteína quinase dependente de AMPC, que se liga ao DNA para ativar a sua transcrição (BALER et al., 1999), e induzir um grande aumento na expressão do mRNA AANAT (GAUER et al., 1999). Na segunda metade da noite um mecanismo de feedback negativo é responsável pela diminuição na expressão do mRNA AANAT. Isso ocorre por meio da ativação, via AMPC, de elementos que desligam a transcrição de gene AANAT (DIAZ et al., 2003), e também, de mecanismos pós-transcrição de proteólise proteossomal que degradam a proteína AANAT (GASTEL et al., 1998). No entanto, essa proteólise permite uma mudança mais rápida da quantidade de proteína AANAT do que os processos de transcrição. Como consequência da exposição à luz, a síntese de melatonina

diminui muito rapidamente porque a enzima é degradada com um intervalo de 3,5 minutos (STEHLÉ et al., 2001).

A natureza considerada cíclica da melatonina (Figura 2) com concentrações plasmáticas de melatonina baixas durante o dia e altas durante a noite (ILLNEROVA et al., 1984) e a ritmicidade da sua síntese são direcionadas, então, principalmente, pela atividade da enzima AANAT. A expressão gênica dessa enzima varia durante o dia, podendo aumentar de 30 a 70 vezes à noite, assim como sua atividade noturna (mais de 100 vezes), enquanto a enzima HIOMT aumenta somente 50% durante a noite. Assim, a enzima AANAT pode ser considerada um limitante ou regulador da velocidade de síntese da melatonina na glândula pineal (KLEIN et al., 1997; MALPAUX, 2006). No entanto, a atividade da enzima HIOMT também é regulada para auxiliar na modulação da secreção de melatonina, porém, diferentemente da AANAT, é em longo prazo (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003). Esta regulação mais demorada é devido em parte pela alta estabilidade da proteína (meia vida > 24 horas) (SUGDEN et al., 1987).

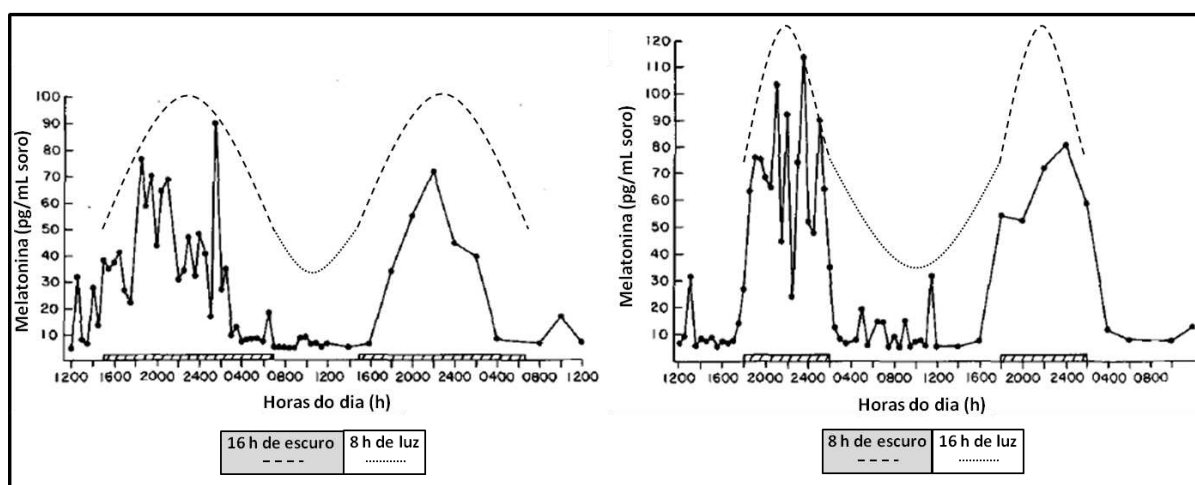


Figura 2: perfis de quarenta e oito horas de melatonina no soro de quatro bezerros que receberam 16E:8L, e 8E:16L.

Fonte: adaptado de Stanisiewski et al. (1988).

Contudo é importante destacar que o perfil de secreção noturno entre as espécies é diferente (MALPAUX, 2006). Nas ovelhas, por exemplo, as concentrações de melatonina alcançam um platô logo após o início da noite (10 a 30 minutos), permanecendo elevado durante toda a noite, e diminui logo antes ou próximo do início da luz do dia (RAVAULT & CHESNEAU, 1999). Ainda é possível a variabilidade da secreção entre animais da mesma espécie, e isto está relacionado ao tamanho da pineal e ao número de pinealócitos que a

glândula contém, e não à atividade de suas enzimas nas vias biossintéticas (GÓMEZ-BRUNET et al., 2002).

Devido à sua natureza lipofílica, a melatonina não é estocada e, logo após a síntese nos pinealócitos, é liberada sem nenhum mecanismo específico, podendo se difundir livremente pelas membranas celulares e atravessar facilmente a barreira hematocefálica (VANECEK, 1998; MALPAUX, 2006). Além disso, a maior parte da melatonina (60-80%) que circula na corrente sanguínea está ligada às proteínas plasmáticas albumina e α 1-glicoproteína ácida (KENNAWAY & VOULTSIOS, 2000). No entanto, a melatonina possui uma meia-vida curta (20 minutos na ovelha) (ZARAZAGA et al., 1998), sendo metabolizada principalmente, pela enzima hepática melatonina 6-hidroxilase (SKENE et al., 2001).

6. LOCAL DE AÇÃO DA MELATONINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A localização de todos os sítios de ação da melatonina é difícil, pois este hormônio influencia muitas funções fisiológicas (ARENDT, 1995), além de existirem receptores de melatonina de alta afinidade em uma grande variedade de tecidos no corpo (BITTMAN, 1993).

O desenvolvimento da sonda 2-(125 I)-iodomelatonina (125 I-melatonina), um agonista de alta afinidade, permitiu a identificação de possíveis alvos da melatonina dentro do eixo-hipotálamo-gonadal (HHG) (BITTMAN, 1993; MORGAN et al., 1994; MASSON-PEVET et al., 1994). Entretanto, o número e a natureza das estruturas identificadas variam consideravelmente entre as espécies, e somente duas estruturas, a *pars tuberalis* (PT) da hipófise e, em menor grau, o NSQ, parecem apresentar receptores para melatonina em quase todas as espécies (MALPAUX, 2006).

Todos os vasos sanguíneos que transportam hormônios, como por exemplo, o GnRH, do hipotálamo para a adenohipófise passam pela PT. Assim, como a PT está em uma posição anatômica primordial, ela poderia influenciar a função hipotalâmica-hipofisal, influenciando, por exemplo, na liberação de LH (NAKAZAWA et al., 1991). No entanto, em ovelhas a liberação de melatonina diretamente na PT não modificou a secreção de LH, porém microimplantes de melatonina colocados no hipotálamo médio basal ou terceiro ventrículo estimulou a liberação de LH (MALPAUX et al., 1993 e 1997). Assim, o hipotálamo pode ser considerado um importante alvo para a transdução dos efeitos da melatonina no eixo neuroendócrino reprodutivo (MALPAUX, 2006), ocorrendo na hipófise somente um efeito indireto.

7. RECEPTORES DE MELATONINA

A utilização da sonda ^{125}I -melatonina permitiu identificar não só os locais de ação da melatonina, mas também seus receptores. Inicialmente eles foram identificados como ML-1 e ML-2, baseando-se nas suas propriedades cinéticas e farmacológicas (DUBOCOVICH, 1995).

O sítio ligante ML-1 representa os receptores de melatonina de alta afinidade e foi identificado como receptor acoplado à proteína G (G_i e G_q) (MORGAN et al., 1994). Posteriormente, foram identificados alguns subtipos dessa classe, mas somente dois, chamados de MT1 e MT2, foram encontrados em mamíferos (MALPAUX, 2006), sendo o primeiro mais comum no hipotálamo e o segundo, na retina. Já o ligante ML-2 apresenta baixa afinidade pela melatonina (DUBOCOVICH, 1988), e atualmente é denominado receptor de melatonina MT3, participando da proteção da célula contra estresse oxidativo (NOSJEAN et al., 2001).

Os receptores de alta afinidade (subtipos MT1 e MT2) estão acoplados às proteínas G PTX-sensível (G_i) e PTX-insensíveis (G_q), e participam de diferentes ações de ativação e bloqueio celulares ainda não totalmente compreendidas (BRYDON et al., 1999). Ambos receptores estão acoplados à proteína $G_{\alpha i}$, a qual inibe a atividade da adenilato ciclase (AC), reduz a produção de AMPc e a ativação da proteína quinase A (PKA), e assim, diminui a resposta celular. Já a proteína $G_{\alpha q}$ e a subunidade $\beta\gamma$ da proteína $G_{\alpha i}$ são capazes de ativar a fosfolipase C (PLC), levando a um aumento de cálcio e de diacilglicerol (DAG), os quais desencadeiam respostas intracelulares como ativação de proteínas. A ativação dos receptores MT2 podem ainda, modular a concentração de monofosfato de guanosina (GMPc), e aumentar a atividade da proteína quinase C (PKC) por meio da possível estimulação da via PLC e DAG (MASANA & DUBOCOVICH, 2001).

Muitos fatores podem influenciar a regulação dos receptores de melatonina, entre eles, o estágio de desenvolvimento do animal, o período do ano e a própria presença da melatonina (MALPAUX, 2006). No entanto, em ovelhas acredita-se que ocorra somente a expressão do receptor MT1, sugerindo que este subtipo é o principal responsável pelo efeito sazonal da melatonina na reprodução nesta espécie (MIGAUD et al., 2005).

8. CONTROLE REPRODUTIVO DA MELATONINA

8.1 Padrão de secreção do GnRH e gonadotrofinas na estação reprodutiva e no anestro

A fertilidade em mamíferos se inicia na puberdade e é regulada por meio de comunicações neurais e hormonais entre o cérebro, hipófise e gônadas. O hormônio GnRH,

liberado pelo hipotálamo de forma pulsátil nas terminações nervosas da eminência média, chega à glândula hipofisária pelo do sistema porta hipofisário. Posteriormente, a adenohipófise direciona a síntese e secreção das gonadotrofinas, LH e FSH, que nas gônadas estimularão a esteroidogênese e gametogênese (SMITH et al., 2009; TASSIGNY & COLLEDGE, 2010; SMITH, 2012).

O padrão pulsátil da secreção de GnRH do cérebro determina o padrão de secreção de LH na hipófise, embora exista algum efeito modulatório dos esteroides sexuais promovendo maior controle nos gonadotrofos (CLARKE & CUMMINS, 1984). A síntese e secreção de GnRH atinge o seu máximo no momento do feedback positivo do estrógeno que antecede o pico pré-ovulatório de LH durante a estação reprodutiva (Figura 3) (CLARKE, 1993). Assim, a frequência dos pulsos de GnRH/LH é determinante na fisiologia reprodutiva, pois regula todo o desenvolvimento folicular no ciclo ovariano e condiciona várias características comportamentais.

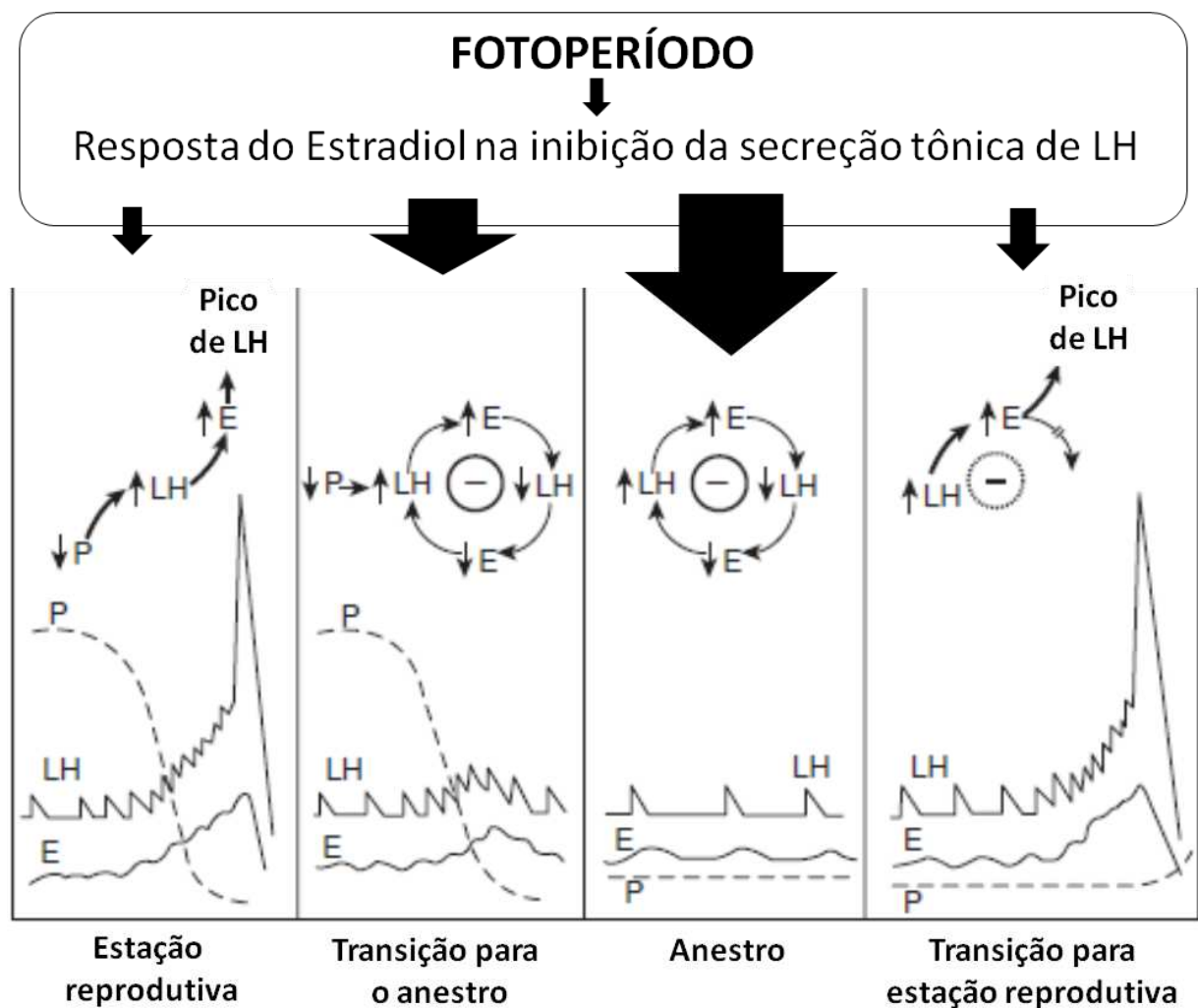


Figura 3: modelo do controle da estação reprodutiva na ovelha. E: estradiol; LH: hormônio luteinizante; P: progesterona.

Fonte: adaptado de Karsch et al. (1980).

A mudança da “estação de reprodução” para a “estação de anestro” está associada à uma forte mudança no sistema de neurosecreção hormonal, com a interrupção da secreção pulsátil de GnRH (BARRELL et al., 1992; ROBINSON et al., 1985). As secreções de gonadotrofinas continuam ocorrendo, e, portanto, as ondas foliculares não são interrompidas apresentando períodos de crescimento e regressão folicular nos ovários (SOUZA et al., 1997). No entanto, a baixa frequência de pulsos de GnRH e LH não é capaz de manter o desenvolvimento folicular final e produzir a concentração de estrógeno necessária que induza a onda preovulatória de LH. Esse mecanismo é induzido pelo período de feedback negativo do estrógeno (Figura 3) (LEGAN et al., 1977; KARSCH et al., 1980), podendo ser observado concentrações reduzidas de progesterona (P_4), uma vez que não há ovulação e formação de corpo lúteo (SOUZA et al., 1997).

Durante a fase de estação reprodutiva, a P_4 é o principal inibidor da frequência pulsátil de GnRH, sendo por isso que na sua ausência é possível ocorrer a onda preovulatória de LH. Na transição para o anestro, a ativação do sistema neural inibitório pelos longos dias do fotoperíodo permite que o estradiol se torne o principal esteroide que faz feedback negativo, controlando a frequência pulsátil de GnRH. Após a regressão do último corpo lúteo da estação reprodutiva, a frequência pulsátil de GnRH e LH não ocorre. Sem o aumento da secreção de LH, não há o crescimento final dos folículos das ondas foliculares, e assim, também não há o aumento do estradiol pré-ovulatório que iria induzir o pico de LH e comportamento de estro (Figura 3) (GOODMAN & INSKEEP, 2006).

No outono, com a diminuição do fotoperíodo e aumento da síntese de melatonina a atividade do sistema neural inibitório diminui. Desse modo, na ausência de P_4 , a secreção pulsátil de LH aumenta e estimula um aumento do estradiol, o qual desencadeia o pico de LH, e a primeira ovulação da estação reprodutiva acontece (Figura 3) (GOODMAN & INSKEEP, 2006)

Assim, a ação negativa do estradiol na secreção de LH ocorre por meio da redução na secreção pulsátil de GnRH ao invés de uma maior diminuição da resposta da hipófise ao GnRH (KARSCH et al., 1987, 1993; BARREL et al., 1992). No entanto, os mecanismos nas diferentes espécies sazonais pelos quais as mudanças no fotoperíodo induzem diferentes respostas no sistema de neurosecreção do GnRH com o mesmo padrão de secreção de estradiol continuam a ser estudados (ROSA & BRYANT, 2003).

8.2 Interneurônios como aferentes ao GnRH

Os neurônios de mamíferos que sintetizam GnRH parecem não ter receptores para esteroides (HERBISON, 1995), mas sabe-se que existem vários neurônios aferentes para os neurônios GnRH que têm o potencial de receber e transmitir os sinais dos esteroides (TILBROOK & CLARKE, 2001). Dessa forma, a sazonalidade reprodutiva pode não ser devido a ações e alterações diretas nos neurônios de GnRH, apesar dos estudos de Xiong et al. (1997) terem evidenciado que o fotoperíodo pode induzir alterações morfológicas nos corpos celulares dos neurônios de GnRH.

Os efeitos fotoperiódicos da melatonina na síntese de GnRH são modulados pelo feedback esteroidal e mediados por uma rede hipotalâmica que possui diferentes neurotransmissores, os quais fazem sinapse e regulam os neurônios que sintetizam o GnRH (MALPAUX, 2006).

Esses interneurônios que sintetizam neurotransmissores estão localizados em diferentes núcleos hipotalâmicos por motivos e funções ainda não totalmente esclarecidas. Na ovelha, foi descrito a presença de mRNA de MT1 na área pré-mamilar, onde se localizam o núcleo arqueado caudal, a divisão ventral do núcleo pré-mamilar e o núcleo ventral tuberomamilar (SLIWOWSKA et al., 2004).

Os interneurônios dopaminérgicos (DA) estão envolvidos em efeitos inibitórios da liberação de GnRH durante a fase de anestro em ovelhas (THIÉRY et al., 1995). O neurotransmissor “dopamina” é derivado da tirosina pela ação das enzimas tirosina hidroxilase (TH) e L-aminoácido aromático descarboxilase (STANDAERT & GALANTER, 2009). A eminência média apresenta grande quantidade de terminais DA, os quais formam contatos sinápticos com os neurônios que secretam GnRH (TILLET, 1995). Nesses terminais, a melatonina inibe a atividade da TH, diminuindo a concentração desse neurotransmissor inibitório (VIGUIÉ et al., 1996). Assim, a estimulação da secreção de LH pela administração de melatonina causa uma redução paralela na atividade da TH, o que sugere fortemente que o efeito do fotoperíodo na atividade dessa enzima é mediado pela melatonina (VIGUIÉ et al., 1997).

A serotonina é outro neurotransmissor que também está envolvido na inibição da secreção do LH em ovelhas (MALPAUX, 2006), porém, tem uma função particular na refratariedade à dias curtos (WHISNANT & GOODMAN, 1990). Esse fenômeno ocorre em ovelhas que tenham sido expostas continuamente à dias curtos por no mínimo 150 dias, mostrando uma diminuição na secreção de LH, embora elas ainda estejam expostas ao

comprimento de dia estimulatório. Assim, inicia-se o *timing* para cessar a estação reprodutiva, em fotoperíodo natural (ROBINSON & KARSCH, 1984).

Ainda existem outros neurotransmissores que podem ser reguladores da secreção de GnRH, como os peptídeos opióides endógenos (TORTONESE, 1999) e os neuropeptídeos Y (DOBBINS et al., 2004). Por outro lado, o glutamato e o aspartato são considerados aminoácidos excitatórios, ou seja, induzem a liberação de GnRH/LH (BRANN & MARESH, 1994).

O momento da secreção e a concentração dos neurotransmissores excitatórios ou inibitórios são regulados internamente pelo fotoperíodo e substâncias endógenas, como os hormônios sexuais. Desta forma, a presença ou ausência da melatonina poderia acarretar na utilização de vários fenótipos neuronais pelo organismo, determinando o perfil secretório dos neurônios sintetizadores de GnRH (MALPAUX, 2006).

8.3 Secreção de melatonina e liberação de GnRH/LH sob influência de esteroides gonadais na ovelha

Uma importante função dos esteroides gonadais é a sua interação com a melatonina e a regulação da estação reprodutiva nos animais sazonais. Existem fortes evidências que a melatonina atua na área pré-mamilar para controlar mudanças no feedback negativo do estradiol na transição da estação de anestro para estro (MALPAUX et al., 1998). Porém o mecanismo exato pelo qual esses hormônios alteram a função hipotalâmica e sexual dos animais, com o circuito neural sendo ligado (fase de estro) e desligado (fase de anestro), periodicamente, ainda não está esclarecido (GOODMAN & INSKEEP, 2006).

O modelo proposto para explicar esse mecanismo fisiológico é baseado na observação dos efeitos causados pelo anestésico pentobarbital, o qual aumenta a frequência de pulsos de LH durante o anestro, mas não durante a estação reprodutiva (GOODMAN & MEYER, 1984). Essa substância diminui a atividade neuronal (BARKER & RANSOM, 1978), sugerindo que durante o anestro, a frequência pulsátil de LH é realizada sob controle de uma série de neurônios inibitórios. Logo, ao diminuir a atividade desses neurônios, o pentobarbital permite o aumento da secreção pulsátil de LH (GOODMAN & INSKEEP, 2006).

A partir dessa observação foi criada a proposta de que os longos dias no anestro pode ativar uma série de neurônios sensitivos ao estradiol, os quais inibem a geração de pulsos de GnRH. Assim, o estradiol suprime a frequência de pulsos de GnRH pelo aumento da atividade desses neurônios. No entanto, a ação do estradiol é possível somente na fase

de anestro, quando os neurônios sensitivos estão ativos. Durante a estação reprodutiva, o sistema está inativo para que o estradiol não possa inibir a frequência pulsátil de GnRH, e a progesterona se torna o principal regulador da secreção pulsátil de GnRH (GOODMAN & INSKEEP, 2006).

O grupo de neurônios DA (A15) agrupados na base do cérebro, posterior ao quiasma óptico, é estimulado pelo estradiol (GAYRARD et al., 1994; LEHMAN et al., 1996) e necessário para o feedback negativo deste hormônio sexual durante o anestro (HAVERN et al., 1994). Existem evidências tanto anatômicas (GAYRARD et al., 1995) quanto farmacológicas (BERTRAND et al., 1998) que os neurônios A15 projetam-se caudalmente para o hipotálamo mediobasal e a eminência média (THIÉRY & MARTIN, 1991), onde eles inibem a frequência pulsátil de GnRH (GOODMAN & INSKEEP, 2006). No entanto, os neurônios A15 não possuem receptores para estradiol (ER α ou ER β) (LEHMAN & KARSCH, 1993), e, portanto, sugere-se que tenham neurônios aferentes responsivos ao estradiol (GOODMAN & INSKEEP, 2006).

Alguns trabalhos mostraram possíveis neurônios sensíveis ao estradiol nas áreas pré-óptica ventromedial (VmPOA) (STEFANOVIC et al., 2000) e retroquiasmática (GALLEGOS-SÁNCHEZ et al., 1997), contendo ER α e projetando prolongamentos neuronais para os A15. A administração local de estradiol em ambas as áreas inibe a frequência pulsátil de LH via um sistema DA no anestro, porém não na estação reprodutiva (GALLEGOS-SÁNCHEZ et al., 1997; HARDY et al., 2003). Os tipos de neurotransmissores que participam dessa sinapse inibitória ainda precisam ser investigados, mas há dados preliminares que fazem supor serem o óxido nítrico (McMANUS et al., 2004) e o GABA (BOGUSZ et al., 2008).

8.4 A atuação da melatonina nos ovários

A ação da melatonina na fisiologia ovariana pode ser analisada por dois aspectos. De forma indireta, a melatonina influencia na secreção de GnRH/FSH/LH, os quais terão a função de regular a esteroidogênese e gametogênese (SMITH et al., 2009; TASSIGNY & COLLEDGE, 2010; SMITH, 2012). No entanto, esse hormônio também pode atuar diretamente nas células ovarianas regulando o crescimento e a atresia folicular, além da esteroidogênese, maturação celular, ovulação e desenvolvimento embrionário (NAKAMURA et al., 2003; SOARES JUNIOR et al., 2003; TANAVDE & MAITRA, 2003; KANG et al., 2009). Isso foi confirmado por trabalhos que relataram a presença de receptores para melatonina nos folículos ovarianos (LEE et al., 2001; SOARES JUNIOR et al., 2003).

A utilização de melatonina exógena em camundongas permitiu maior proteção

contra atresia folicular em estágios iniciais de desenvolvimento diante da radiação (KIM & LEE, 2000). Já nos folículos que apresentam antro, foi observada a presença de melatonina no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios em concentrações superiores às concentrações séricas (RÖNNBERG et al., 1990). Quando as concentrações de melatonina no fluido folicular foram comparados a partir de amostras coletadas durante período de luz (verão) e período de escuro (inverno), foi observado um ligeiro aumento nas amostras do período de escuro. No entanto, não houve correlação entre as concentrações de melatonina e o volume de líquido folicular, nem entre concentração de melatonina e de estradiol, progesterona, testosterona e prolactina plasmática (BRZEZINSKI et al., 1987; RÖNNBERG et al., 1990).

Acreditava-se que a origem da melatonina no fluido folicular era exclusivamente resultado da sua absorção da circulação sanguínea (TAMURA et al., 2009), porém, atualmente, sabe-se que o próprio ovário auxilia na síntese da melatonina (ROCHA et al., 2011). Como a enzima considerada limitante na síntese de melatonina (JOHNSTON et al., 2004; LIU & BORJIGIN, 2005), ASOMT, foi identificada nas células do *cumulus* dos folículos bovino, sugere-se que essas células são capazes de produzir melatonina (SALHAB et al., 2013), sendo pouco provável que isto seja uma característica unicamente desta espécie. Isso auxilia, na confirmação de que a melatonina do fluido folicular é derivada de mais de um único local (local e sistêmico) (REITER et al., 2013).

Como em outros órgãos, algumas ações da melatonina no ovário dependem dos receptores convencionais de membrana (MT1 e MT2) e, possivelmente, de receptores nucleares da superfamília RZR/ROR, embora os dados sejam escassos. Esses receptores de membrana foram especificamente localizados na granulosa e células luteais no ser humano (NILES et al., 1999; EKMEKCIOGLU, 2006) e nas células foliculares antrais e do corpo lúteo do rato (SOARES JUNIOR et al., 2003). Além dessas ações mediadas por receptores, a melatonina influencia a fisiologia ovariana pela estimulação de enzimas antioxidantes que eliminam radicais livres (TAN et al., 2007; REITER et al., 2009; TAMURA et al., 2012).

Analisando o fluido folicular em seres humanos, as concentrações de melatonina foram duas vezes maiores em grandes folículos imediatamente antes da ovulação, em comparação com aqueles em folículos antrais pequenos, imaturos (NAKAMURA et al., 2003). Os autores sugeriram que as elevadas concentrações de melatonina e seus metabólitos poderiam agir como antioxidantes potentes no fluido folicular no momento da ovulação. Isto é porque o processo ovulatório tem sido comparado com a inflamação, que está associada

com a produção elevada de radicais livres (ESPEY, 1994).

Os processos inflamatórios, como identificados no ovário no momento da ovulação, incluem o aumento da síntese de prostaglandinas e citocinas, aumento da ativação de enzimas proteolíticas e elevada permeabilidade capilar, características que estão associados com uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio prejudiciais (ROS) (BRANNSTROM & ENSKOG, 2002; RICHARDS, 2005). Além disso, os macrófagos, leucócitos e células endoteliais vasculares, os quais estão na vizinhança de folículos grandes (BRANNSTROM & NORMAN, 1993) contribuem para a síntese de radicais livres, no momento da ruptura do folículo. Assim, nas células da teca, células da granulosa e no fluido folicular, a melatonina estimularia enzimas, como, a superóxido dismutase (SOD), glutatona-peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que metabolizam os radicais livres para produtos menos tóxicos. Desse modo, a melatonina protegeria o oócito do dano oxidativo durante a sua liberação do ovário, assegurando assim um embrião e feto saudáveis (ROCHA et al., 2011; REITER et al., 2013; TAMURA et al., 2013).

A influência da melatonina na esteroidogênese é relatada, principalmente, na produção de Progesterona (P_4) nas células da granulosa de ratas (FISKE et al., 1984), vacas (WEBLEY & LUCK, 1986) e ovelhas (BARATTA & TAMANINI, 1992), e também de outros esteroides sexuais. O aumento da concentração de P_4 no folículo pré-ovulatório pode estar envolvido no processo de ovulação e luteinização folicular (NAKAMURA et al., 2003). Além disso, em humanos já foi relatado que a melatonina pode agir na produção de P_4 em células luteínicas (YIE et al., 1995), por meio do aumento da expressão de receptores para LH nestas células (WOO et al., 2001).

A melatonina pode levar as células da granulosa a expressarem mRNA de receptores para LH nessas células, influenciando na resposta folicular à esse hormônio (WOO et al., 2001). Também podem estimular essas células a sintetizar o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β), que são fatores de crescimento mitógeno, e assim, aumentar o desenvolvimento folicular (SCHAEFFER & SIROTKIN, 1997). Ela também possui ações antiapoptóticas, aumentando a expressão dos membros da família Bcl2 que são importantes para regular a degradação atresica dos folículos antrais (RATTS et al., 1995; HSU et al., 1996;), e diminuindo a ação das Caspases, como a *Casp3*, que influenciam na atresia folicular (GUHA et al., 2007).

Dentre as funções da melatonina na reprodução, existem ainda a sua possível atuação na maturação oocitária final e no desenvolvimento embrionário. A suplementação

dos meios de produção de embriões *in vitro* (PIV) com melatonina, em suínos, permitiu maior percentual de maturação oocitária (KANG et al., 2009), e em roedores, maior desenvolvimento de embriões (ISHIZUKA et al., 2000). Esse fato pode ocorrer devido a possível aceleração da maturação conduzida pelo hormônio indutor de maturação (MIH) (CHATTORAJ et al., 2005).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fotoperíodo é uma variável ambiental de grande importância na fisiologia reprodutiva e o seu correto controle pode permitir ganhos na produção animal. Outros fatores, como a nutrição, temperaturas e interações sociais são considerados apenas como moduladores da reprodução. Dessa forma, é possível utilizar as espécies sazonais de interesse zootécnico em programas de iluminação artificial, permitindo um manejo reprodutivo que leve a uma produção de produtos de origem animal dessas espécies sem periodicidade anual.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, n.3-4, p.173-179, 2012.

AGUIRRE, V.; ORIHUELA, A.; VAZQUEZ, R. Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair sheep (*Ovis aries*). **Tropical Animal Health and Production**, v.39, n.4, p.271-277, 2007.

ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. 1. ed. London/UK: Chapman & Hall, 1995. 331p.

ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, v.3, n.1, p.13-22, 1998.

ARROYO, L. J.; GALLEGOS-SÁNCHEZ, J.; VILLA-GODOY, A.; BERRUECOS, J. M.; PERERA, G.; VALENCIA, J. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19º north latitude. **Animal Reproduction Science**, v.102, n.1-2, p.24-30, 2007.

AVDI, M.; BANOS, G.; STEFOS, K.; CHEMINEAU, P. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. **Theriogenology**, v.62, n.1-2, p.275–282, 2004.

BALER, R.; COVINGTON, S.; KLEIN, D. C. Rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene: upstream and intronic components of a bipartite promoter. **Biology of the Cell**, v.91, p.699–705, 1999.

BARATTA, M.; TAMANINI, C. Effect of melatonin on the in vitro secretion of progesterone and estradiol 17 β by ovine granulosa cells. **Acta Endocrinologica**, v.127, n.4, p.366–370, 1992.

BARKER, J. L.; RANSOM, B. R. Pentobarbitone pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. **The Journal of Physiology**, v.280, p.355–372, 1978.

BARRELL, G. K.; MOENTER, S. M.; CARATY, A.; KARSCH, F. J. Seasonal changes of gonadotrophin-releasing hormone secretion in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.46, 1130–1135, 1992.

BERLINGUER, F.; LEONI, G. G.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; MADEDDU, M.; SATTA, V.; BEBBERE, D.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GONZALEZ-BULNES, A.; NAITANA, S. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**, v.46, n.4, p.383–391, 2009.

BERTRAND, F.; VIGUIÉ, C.; PICARD, S.; MALPAUX, B. Median eminence dopaminergic activation is critical for the early long-day inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. **Endocrinology**, v.139, n.12, p.5094–5102, 1998.

BITTMAN, E. L.; KAYNARD, A. H.; OLSTER, D. H.; ROBINSON, J. E.; YELLON, S. M.; KARSCH, F. J. Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. **Neuroendocrinology**, v.40, p.409–418, 1985.

BITTMAN, E. L. The sites and consequences of melatonin binding in mammals. **American Zoologist**, v.33, p.200–211, 1993.

BOGUSZ, A. L.; HARDY, S. L.; LEHMAN, M. N.; CONNORS, J. M.; HILEMAN, S. M.; SLIWOWSKA, J. H.; BILLINGS, H. J.; McMANUS, C. J.; VALENT, M.; SINGH, S. R.; NESTOR, C. C.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Evidence that γ -aminobutyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. **Endocrinology**, v.149, n.6, p.2762-2772, 2008.

BOUR, B.; PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Stimulation of ovarian activity in the pony mare during winter anoestrus. In: ELLENDORFF, F. & ELSAESSER, F. (Org.). **Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publisher, 1985, p.85–97.

BRANN, D. W.; MARESH, V. B. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.15, n.1, p.3–49, 1994.

BRANNSTROM, M.; ENSKOG, A. Leukocyte networks and ovulation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.57, p.47-60, 2002.

BRANNSTROM, M.; NORMAN, R. J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. **Human Reproduction**, v.8, n.10, p.1762-1775, 1993.

BRZEZINSKI, A.; SEIBEL, M. M.; LYNCH, H. J.; DENG, M. H.; WURTMAN, R. J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.64, p.865–867, 1987.

BRYDON, L.; ROKA, F.; PETIT, L.; COPPET, P.; TISSOT, M.; BARRETT, P.; MORGAN, P. J.; NANOFF, C.; STROSBURG, A. D.; JOCKERS, R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G_{i2} , G_{i3} , and $G_{q/11}$ Proteins. **Molecular Endocrinology**, v.13, n.12, p.2025–2038, 1999.

CHATTORAJ, A.; BHATTACHARYYA, S.; BASU, D.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S.; MAITRA, S. K. Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. **General and Comparative Endocrinology**, v.140, p.145–55, 2005.

CLARKE, I. J.; CUMMINS, J. T. Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. **Neuroendocrinology**, v.39, n.3, p.267-274, 1984.

CLARKE, I. J. Variable patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion during the estrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes. **Endocrinology**, v.133, n.4, p.1624-1632, 1993.

CLARKE, I. J.; SMITH, J. T.; CARATY, A.; GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N. Kisspetin and seasonality in sheep. **Peptides**, v.30, p.154-163, 2009.

DIAZ, E.; GARIDOU, M. L.; DARDENTE, H.; SALINGRE, A.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX, V. Expression and regulation of Icer mRNA in the Syrian hamster pineal gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.112, p.163–169, 2003.

DING, J. M.; FAIMAN, L. E.; HURST, W. J.; KURIASHKINA, L. R.; GILLETTE, M. U. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.2, p.667–675, 1997.

DOBBINS, A.; LUBBERS, L. S.; JACKSON, G. L.; KUEHL, D. E.; HILEMAN, S. M. Neuropeptide Y gene expression in male sheep: influence of photoperiod and testosterone. **Neuroendocrinology**, v.79, p.82–89, 2004.

DRIJFHOUT, W. J.; VAN DER LINDE, A. G.; KOOL, S. E.; GROL, C. J.; WESTERINK, B. H. C. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.66, p.748–755, 1996.

DUBOCOVICH, M. L. Pharmacology and function of melatonin receptors. **The FASEB Journal**, v.2, p.2765–2773, 1988.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.16, p.50–56, 1995.

DYRMUNDSSON, Ó. R. Studies on the breeding season of Icelandic ewes and ewes lambs. **Journal of Agricultural Science**, v.90, p.275-281, 1978.

EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical relevance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.60, p.97–108, 2006.

ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biology of Reproduction**, v.50, p.233–238, 1994.

FERNANDES, R. M. F. O sono normal. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.39, n.2, p.157-168, 2006.

FISKE, V. M.; PARKER, K. L.; ULMER, R. A.; OW, C. H.; AZIZ, N. Effect of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the in vitro secretion of estrogens or progesterone by granulosa cells of rats. **Endocrinology**, v.114, n.2, p.407–410, 1984.

FRUNGIERI, M. B.; MAYERHOFER, A.; ZITTA, K.; PIGATARO, O. P.; CALANDRA, R. S.; GONZALEZ-CALVAR, S. I. Direct Effect of Melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. **Endocrinology**, v.146, n.3, p.1541–1552, 2005.

GALLEGOS-SÁNCHEZ, J.; DELALEU, B.; CARATY, A.; MALPAUX, B.; THIERY, J. C. Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing-hormone release in the female sheep during anestrus. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1544–1549, 1997.

GASTEL, J. A.; ROSEBOOM, P. H.; RINALDI, P. A.; WELLER, J. L. KLEIN, D. C. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. **Science**, v.279, p.1358–1360, 1998.

GAUCHE, H.; CALVO, M. C. M.; ASSIS, M. A. A. DE Ritmos circadianos de consumo alimentar nos lanches e refeições de adultos: aplicação do semanário alimentar. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.19, n.2, p.177-185, 2006.

GAUER, F.; POIREL, V. J.; GARIDOU, M. L.; SIMONNEAUX, V.; PEVET, P. Molecular cloning of the arylalkylamine- N -acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. **Molecular Brain Research**, v.7, p.87–95, 1999.

GAYRARD, V.; MALPAUX, B.; TILLET, Y.; THIERY, J. C. Estradiol increases tyrosine hydroxylase activity of the A15 nucleus dopaminergic neurons during long days in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.50, p.1168–1177, 1994.

GAYRARD, V.; THIÉRY, J. C.; THIBAUT, J.; TILLET, Y. Efferent projections from the retrochiasmatic area to the median eminence and to the pars nervosa of the hypophysis with special reference to the A15 dopaminergic cell group in the sheep. **Cell and Tissue Research**, v.281, p.561–567, 1995.

GODLEY, W. C; WILSON, R. L.; HURS, V. Effect of Controlled Environment on the Reproductive Performance of Ewes. **Journal of Animal Science**, v.25, n.1, p.212-216, 1966.

GOLDMAN, B. D. Mammalian Photoperiodic System: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, n.4, p.283–301, 2001.

GÓMEZ-BRUNET, A. G.; MALPAUX, B.; DAVEAU, A.; TARAGNAT, C.; CHEMINEAU P. Genetic variability in melatonin secretion originates in the number of pinealocytes in sheep. **Journal of Endocrinology**, v.172, n.2, p.397–404, 2002.

GOODMAN, R. L.; MEYER, S. L. Effects of pentobarbital secretion luteinizing anesthesia evidence hormone on tonic for active luteinizing inhibition hormone of in the ewe: in anestrus. **Biology of Reproduction**, v.30, p.374–381, 1984.

GOODMAN, R. L.; INSKEEP, E. K. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. In: NEILL, J. D. & KNOBIL, E. (Org.). **Physiology of Reproduction**. 3. ed. London: Elsevier, 2006. Cap. 44, p. 2389–2428.

GORDON, I. **Controlled Reproduction in Sheep and Goats**. Wallingford/UK: CABI Publishing,

1997. 272p.

GUERIN, M. V.; WANG, X. J. Environmental temperature has an influence on timing of the first ovulation of seasonal estrus in the mare. **Theriogenology**, v.42, n.6, p.1053-1060, 1994.

GUHA, M.; MAITY, P.; CHOUBEY, V.; MITRA, K.; REITER, R. J.; BANDYOPADHYAY, U. Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.372–381, 2007.

HANNIBAL, J.; DING, J. M.; CHEN, D.; FAHRENKRUG, J.; LARSEN, P. J.; GILLETTE, U. M.; MIKKELSEN, J. D. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.7, p.2637–2644, 1997.

HARDY, S. L.; ANDERSON, G. M.; VALENT, M.; CONNORS, J. M.; GOODMAN, R. L. Evidence that estrogen receptor alpha, but not beta, mediates seasonal changes in the response of the ovine retrochiasmatic area to estradiol. **Biology of Reproduction**, v.68, p.846–852, 2003.

HAVERN, R. L.; WHISNANT, C. S.; GOODMAN, R. L. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. **Endocrinology**, v.134, p. 1905-1914, 1994.

HERBISON, A. E. Neurochemical identity of neurons expressing oestrogen and androgen receptors in sheep hypothalamus. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v.49, p.271-283, 1995.

HSU, S. Y.; LAI, R. J.; FINEGOLD, M.; HSUEH, A. J. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. **Endocrinology**, v.137, p.4837–4843, 1996.

l'ANSON, H.; LEGAN, S. J. Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. **Journal of Reproduction**

and Fertility, v.82, n.1, p.341–351, 1988.

ILLNEROVA, H.; HOFFMANN, K.; VANECEK, J. Adjustment of pineal melatonin and *N*-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. **Neuroendocrinology**, v.38, n.3, p.226–231, 1984.

ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITOH, M. T. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal of Pineal Research**, v.28, n.1, p.48–51, 2000.

ITOH, M. T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v.5, n.5, p.402–408, 1999.

JOHNSTON, J. D.; BASHFORTH, R.; DIACK, A.; ANDERSSON, H.; LINCOLN, G. A.; HAZLERIGG, D. G. Rhythmic melatonin secretion does not correlate with the expression of arylalkylamine *N*-acetyltransferase, inducible cyclic AMP early repressor, period1 or cryptochrome1 mRNA in the sheep pineal. **Neuroscience**, v.124, p.789–795, 2004.

KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK, H. J.; JANG, G.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.22–28, 2009.

KARSCH, F. J.; GOODMAN, R. L.; LEGAN, S. J. Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.58, p.521–535, 1980.

KARSCH, F. J.; BITTMAN, E. L.; FOSTER, D. L.; GOODMAN, R. L.; LEGAN, S. J.; ROBINSON, J. E. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, v.40, p.185–232, 1984.

KARSCH, F. J.; CUMMINS, J. T.; THOMAS, G. B.; CLARKE, I. J. Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.36, n.5, p.1207–1218, 1987.

KARSCH, F. J.; DAHL, G. E.; EVANS, N. P.; MANNING, J. M.; MAYFIELD, K. P.; MOENTER, S. M.; FOSTER, D. L. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. **Biology of Reproduction**, v.49, n.6, p.1377–1383, 1993.

KENNAWAY, D. J.; VOULTSIOS, A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.83, n.3, p.1013–1015, 2000.

KENNAWAY, D. J. The role of circadian rhythmicity in reproduction. **Human Reproduction Update**, v.11, n. 1, p.91-101, 2005.

KIM, J. K.; LEE, C. J. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. **Mutation Research**, v.449, n.1-2, p.33-39, 2000.

KLEIN, D. C. Photoneural Regulation of the Mammalian Pineal Gland. **CIBA Foundation Symposia**, v.117, p.38-56, 1985.

KLEIN, D. C.; COON, S. L.; ROSEBOOM, P. H.; WELLER, J. L.; BERNARD, M.; GASTEL, J. A.; ZATZ, M.; IUZONE, P. M.; RODRIGUEZ, I. R.; BÉGAY, V.; FALCÓN, J.; CAHILL, G. M.; CASSONE, V. M.; BALER, R. The melatonin rhythms generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. **Recent Progress in Hormone Research**, v.52, p.307–357, 1997.

LEE, C. J.; DO, B. R.; LEE, Y. H.; PARK, J. H.; KIM, S. J.; KIM, J. K.; ROH, S. I.; YOON, Y. D.; YOON, H. S. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, n.2, p.126–132, 2001.

LEGAN, S. J., KARSCH, F. J.; FOSTER, D. L. The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: A marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, v.101, p.818-824, 1977.

LEHMAN, M. N.; KARSCH, F. J. Do gonadotropin releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and β -endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label

immunocytochemical study in the Suffolk ewe. **Endocrinology**, v.133, p.887–895, 1993.

LEHMAN, M. N.; DURHAM, D. M.; JANSEN, H. T.; ADRIAN, B.; GOODMAN, R. L. Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in the anestrous ewe. **Endocrinology**, v.137, p.4443–4450, 1996.

LINCOLN, G. A.; DAVIDSON, W. The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, n.2, p.267–276, 1977.

LIU, T.; BORJIGIN, J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. **Journal of Pineal Research**, v.39, p.91–96, 2005.

MALLAMPATI, R. S.; POPE, A. L.; CASIDA, L. E. Effect of suckling on postpartum anestrus in ewes lambing in different seasons of the year. **Journal of Animal Science**, v.32, n.4, p.673–678, 1971.

MALPAUX, B.; DAVEAU, A.; MAURICE, F.; GAYRARD, V.; THIÉRY, J. C. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. **Biology of Reproduction**, v.48, p.752–760, 1993.

MALPAUX, B.; VIGUIÉ, C.; SKINNER, D. C.; THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 431–438, 1997.

MALPAUX, B.; DAVEAU, A.; MAURICE-MANDON, F.; DUARTE, G.; CHEMINEAU, P. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. **Endocrinology**, v.139, n.4, p.1508–1516, 1998.

MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and critical role of pineal gland and melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, p.336–347, 2001.

MALPAUX, B. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: NEILL, J. D. & KNOBIL, E. (Org.). **Physiology of Reproduction**. 3. ed. London: Elsevier, 2006. Cap.41, p.2231–2281.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Editora Fiocruz, 2003. 448p.

MASANA, M. I.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Science STKE**, v.107, pe39, p.1–5, 2001.

MASSON-PEVET, M.; GEORGE, D.; KALSBECK, A.; SABOUREAU, M.; LAKHADAR-GHAZAL, N.; PÉVET, P. An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. **Cell and Tissue Research**, v.278, p.97–106, 1994.

MCMANUS, C. J.; VALENT, M.; CONNORS, J. M.; HILEMAN, S. M.; GOODMAN, R. L. Time of year alters response to nitric oxide synthase inhibition in seasonally anestrous ewes. **Annual Meeting of Society for Neuroscience**, Abstr. 756.23, 2004.

MESSNER, M.; HUETHER, G.; LORF, T.; RAMADORI, G.; SCHWÖRER, H. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. **Life Sciences**, v.69, p.543-551, 2001.

MIGAUD, M.; DAVEAU, A.; MALPAUX, B. MTNR1A melatonin receptors in the ovine pre-mammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. **Biology of Reproduction**, v.72, p.393–398, 2005.

MOORE, R. Y; EICHLER V. B. Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. **Brain Research**, v.42, n.1, p.201-206, 1972.

MORGAN, P. J.; BARRETT, P.; HOWELL, H. E.; HELLIWELL, R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. **Neurochemistry International**, v.24, p.101–146, 1994.

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**,

v.60-61, p.245-262, 2000.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v.80, n.4, p.1012-1016, 2003.

NAKAZAWA, K.; MARUBAYASHI, U.; MCCANN, S. M. Mediation of the short-loop negative feedback of luteinizing hormone (LH) on LH-releasing hormone release by melatonin-induced inhibition of LH release from the pars tuberalis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States**, v.88, p.7576–7579, 1991.

NILES, L. P.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D. K.; YOUNGLAI, E. V. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.156, p.107-110, 1999.

NOSJEAN, O.; NICOLAS, J. P.; KLUPSCH, F.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J. A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical Pharmacology**, v.61, p.1369–1379, 2001.

ORTAVANT, R.; BOCQUIER, F.; PELLETIER, J.; RAVAUULT, J. P.; THIMONIER, J.; VOLLAND-NAIL, P. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.41, n.1, p.69–85, 1988.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; MARKUS, R. P. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of Pineal Research**, v.41, p.136-141, 2006

RATTS, V. S.; FLAWS, J. A.; KOLP, R.; SORENSON, C. M.; TILLY, J. L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. **Endocrinology**, v.136, p.3665–3668, 1995.

RAVAULT, J. P.; CHESNEAU, D. The onset of increased melatonin secretion after the onset of

darkness in sheep depends on the photoperiod. **Journal of Pineal Research**, v.27, n.1, p.1–8, 1999.

REITER, R. J. Melatonin suppression by static and extremely low frequency electromagnetic fields: relationship to the reported increased incidence of cancer. **Reviews on Environmental Health**, v.10, n.3-4, p.171-86, 1994.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and Reproduction Revisited. **Biology of Reproduction**, v.81, n.3, p.445–456, 2009.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Science**, v.14, p.7231-7272, 2013.

RICHARDS, J. S. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.75-79, 2005.

RICHTER, H. G.; TORRES-FARFÁN, C.; ROJAS-GARCIA, P. P.; CAMPINO, C.; TORREALBA, F.; SERÓN-FERRÉ, M. The Circadian Timing System: Making Sense of day/night gene expression. **Biological Research**, v.37, n.1, p.11-28, 2004.

ROBINSON, J. E.; KARSCH, F. J. Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. **Biology of Reproduction**, v.31, p.656–663, 1984.

ROBINSON, J. E. ; RADFORD, H. M.; KARSCH, F. J. Seasonal changes in pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in the ewe: relationship of frequency of LH pulses to day length and response to estradiol negative feedback. **Biology of Reproduction**, v. 33, n. 2, p. 324–334, 1985.

ROBINSON, J. J. Nutrition and Reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1-4, p.25-34, 1996.

ROCHA, R. M. P.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.;

RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.2, p.147-157, 2011.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.71, n.2, p.492–496, 1990.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe: a review. **Small Ruminant Research**, v.45, p.1–16, 2002.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, n.3, p.155-171, 2003.

SALHAB, M.; DHORNE-POLLET, S.; AUCLAIR, S.; GUYADER-JOLY, C.; BRISARD, D.; DALBIES-TRAN, R.; DUPONT, J.; PONSART, C.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. *In vitro* maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.80, p.166–182, 2013.

SCHAEFFER, H. J.; SIROTKIN, A. V. Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v.105, n.2, p.109–112, 1997.

SCHOMERUS, C.; KORF, H. W.; LAEDTKE, E.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Selective Adrenergic/Cyclic AMP-Dependent Switch-Off of Proteasomal Proteolysis Alone Switches on Neural Signal Transduction : An Example from the Pineal Gland. **Journal of Neurochemistry**, v.75, n.2, p.2123–2132, 2000.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological Reviews**, v.55, n.2, p.325-395, 2003.

SKENE, D. J.; PAPAGIANNIDOU, E.; HASHEMI, E.; SNELLING, J.; LEWIS, D. F.; FERNANDEZ, M.;

IONNIDES, C. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. **Journal of Pineal Research**, v.31, p.333–342, 2001.

SLIWOWSKA, J. H.; BILLINGS, H. J.; GOODMAN, R. L.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M. N. The premammillary hypothalamic area of the ewe: anatomical characterization of a melatonin target area mediating seasonal reproduction. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1768–1775, 2004.

SMITH, J. T.; LI, Q.; PEREIRA, A.; CLARKE, I. J. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. **Endocrine Reviews**, v.150, n.12, p.5530–5538, 2009.

SMITH, J. T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v.43, n.2, p.75–84, 2012.

SOARES JUNIOR, J. M. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.306, n.2, p.694–702, 2003.

SOUSA, C. E. C.; CRUZ-MACHADO, S. S.; TAMURA, E. K. Os ritmos circadiano e a reprodução em mamíferos. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1-2, p.15-20, 2008.

SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.56, n.2, p.483–488, 1997.

STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: GOLAN, D. E. et al. (Org.). **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan S.A, 2009. Cap. 12, p. 166–185.

STANISIEWSKI, E. P.; CHAPIN, L. T.; AMES, N. K.; ZINN, S. A.; TUCKER, H. A. Melatonin and

prolactin concentrations in blood of cattle exposed to 8, 16 or 24 hours of daily light. **Journal of Animal Science**, v.66, p.727-734, 1988.

STEFANOVIC, I.; ADRIAN, B.; JANSEN, H. T.; LEHMAN, M. N.; GOODMAN, R. L. The ability of estradiol to induce Fos expression in a subset of estrogen receptor- α -containing neurons in the preoptic area of the ewe depends on reproductive status. **Endocrinology**, v.141, n.1, p.190–196, 2000.

STEFULJ, J.; HÖRTNER, M.; GHOSH, M.; SCHAUENSTEIN, K.; RINNER, I.; WÖLFLE, A.; SEMMLER, J.; LIEBMANN, P. M. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, v.30, n.4, p.243-247, 2001.

STEHLÉ, J. H.; VON GALL, C.; SCHOMERUS, C.; KORF, H. W. Of Rodents and Ungulates and Melatonin: Creating a Uniform Code for Darkness by Different Signaling Mechanisms. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, p.312–325, 2001.

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.69, n.6, p.1583-1586, 1972.

STRADA, S. J.; KLEIN, D. C.; WELLER, J.; WEISS, B. Effect of Norepinephrine on the Concentration of Adenosine 3',5'-Monophosphate of Rat Pineal Gland in Organ Culture. **Endocrinology**, v.90, p.1470-147, 1972.

SUGDEN, D.; CEÑA, V.; KLEIN, D. C. Hydroxyindole *O*-methyltransferase. **Methods in Enzymology**, v.142, p.590-596, 1987.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v.92, n.1, p.328-343, 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an

antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v.5, p.2-9, 2012.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**, v.60, n.1, p.1-13, 2013.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; TAMURA, H.; REITER, R. J. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.317–320, 2007.

TANAVDE V. S.; MAITRA A. In vitro modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. **Endocrine Research**, v.29, n.4, p.399–410, 2003.

TASSIGNY, X. A.; COLLEDGE, W. H. The role of kisspeptin signaling in reproduction. **Physiology**, v.25, n.4, p.207-217, 2010.

TENA-SEMPERE, M.; HUHTANIEMI, I. Gonadotropins and gonadotropin receptors. In: Fauser, B.C.J.M. (Org.) **Reproductive Medicine: Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals**. New York: Parthenon, 2003, p.225–244.

THIÉRY, J. C.; MARTIN, G. B. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep - a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.3, n.3, p.137–173, 1991.

THIÉRY, J. C.; GAYRARD, V.; CORRE, S. L.; VIGUIÉ, C.; MARTIN, G. B.; CHEMINEAU, P.; MALPAUX, B. Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v.49, p.285-96, 1995.

THIMONIER, J.; TERQUI, M.; CHEMINEAU, P. Conduite de la reproduction des petits ruminants dans les différentes parties du monde. In: **Proceedings of an International Symposium on the Use of Nuclear Techniques in Studies of Animal Production and Health**

in Different Environments. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1986, p.135–147.

TILBROOK, A. J.; CLARKE, I. J. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. **Biology of Reproduction**, v.64, n.3, p.735-742, 2001.

TILLET, Y. Distribution of neurotransmitters in the sheep brain. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.49, p.199-220, 1995.

TORTONESE, D. J. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 750-757, 1999.

TOSINI, G.; FUKUHARA, C. The mammalian retina as a clock. **Cell and Tissue Research**, v.309, p.119-126, 2002.

VANECEK, J.; SUGDEN, D.; WELLER, J.; KLEIN, D. C. Atypical Synergistic α_1 - and β -Adrenergic Regulation of Adenosine 3',5'-Monophosphate and Guanosine 3',5'- Monophosphate in Rat Pinealocytes. **Endocrinology**, v.116, p. 2167-217, 1985.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, v.78, n.3, p.687-721, 1998.

VAN NIEKERK, F. E.; VAN NIEKERK, C. H. The effect of dietary protein on reproduction in the mare. III. Ovarian and uterine changes during the anovulatory season, transitional and ovulatory periods in the non-pregnant mare. **Journal of South African Veterinary Association**, v.68, n.3, p.86-92, 1997.

VIGUIÉ, C.; THIBAUT, J.; THIÉRY, J. C.; TILLET, Y.; MALPAUX, B. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. **Endocrinology**, v.138, n.1, p.499–506, 1997.

VIGUIÉ, C.; THIBAUT, J.; THIÉRY, J. C.; TILLET, Y.; MALPAUX, B. Photoperiodic modulation of monoamines and amino-acids involved in the control of prolactin and LH secretion in the ewe: evidence for a regulation of tyrosine hydroxylase activity. **Journal of Neuroendocrinology**, v.8, p.465–474, 1996.

VIVIEN-ROELS, B.; PÉVET, P. The pineal gland and the synchronization of reproductive cycles with variations of the environmental climatic conditions with special reference to temperature. **Pineal Research Reviews**, v.1, p.91-143, 1983.

WALTON, J. S.; McNEILLY, J. R.; McNEILLY, A. S.; CUNNINGHAM, F. J. Changes in concentration of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. **Journal of Endocrinology**, v.75, p.127–136, 1977.

WARDIL, L. L. **Redes em biologia: introdução às redes complexas, estudo dos aspectos estruturais e dinâmicos do ciclo celular e dos ritmos circadianos**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

WEBLEY, G. E.; LUCK, M. R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.711–717, 1986.

WHISNANT, C. S.; GOODMAN, R. L. Further evidence that serotonin mediates the steroid-independent inhibition of luteinizing hormone secretion in anestrous. **Biological research**, v.42, p.656–661, 1990.

WOO, M. M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, P. S.; PANG, S. F.; LEUNG, P. C. K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.86, n.10, p.4789–4797, 2001.

XIONG, J. J.; KARSCH, F. J.; LEHMAN, M. N. Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto

neurons. **Endocrinology**, v.138, n.3, p.1240–1250, 1997.

YIE, S. M.; NILES, L. P; YOUNGLAI, E. V. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.80, n.5, p.1747–1749, 1995.

ZARAZAGA, L. A.; MALPAUX, B.; GUILLAUME, D.; BODIN, L.; CHEMINEAU, P. Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. **American Journal of Physiology**, v.274, p.1086–1090, 1998.

A INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA REPRODUÇÃO DO MACHO CAPRINO E OVINO

The influence of photoperiod on reproduction of male goat and ram

Resumo: Algumas espécies animais apresentam sazonalidade reprodutiva regulada principalmente pelo fotoperíodo diário, podendo ser modulada pelo clima e alimentação. Essa característica fisiológica é bem destacada e conhecida nas fêmeas, onde acontece um período de estação reprodutiva e outro de anestro. No entanto, nos machos de espécies sazonais as variações reprodutivas não são consideradas suficientes para impedir a reprodução ao longo do ano, porém deve-se considerar tais alterações em algumas práticas zootécnicas e tomadas de decisões. O objetivo com essa revisão é abordar a influência do fotoperíodo sobre a reprodução dos machos caprinos e ovinos, e também, possíveis ações da melatonina na conservação espermática de forma direta e indireta.

Palavras-chave: gonadotrofinas, melatonina, ritmo circadiano, sazonalidade, testosterona

Abstract: Some animal species exhibit reproductive seasonality regulated mainly by the daily photoperiod, may be modulated by climate and food. This physiological characteristic is well known and prominent in females, where happens a period of breeding season and other anestrus. However, in males of species seasonal the reproductive variations are not considered sufficient to prevent reproduction throughout the year, but must consider such changes in some husbandry practices and decision making. The aim of this review is to evaluate the influence of photoperiod on reproduction of male goats and sheep, and also, possible actions of melatonin on sperm conservation directly and indirectly.

Key-words: circadian rhythm, gonadotropins, melatonin, seasonality, testosterone.

1. INTRODUÇÃO

As espécies que apresentam um ciclo reprodutivo sazonal desenvolveram alternativas fisiológicas que permitem manifestar os períodos aptos à reprodução em momentos do ano que permitirão o nascimento de suas crias em épocas com melhor disponibilidade de alimento e temperatura (GOLDMAN, 2001; SMITH, 2012). Assim, o

período gestacional e algumas variações ambientais, como o período de chuvas, levam alguns animais alterarem sua fisiologia, refletindo, principalmente, na gametogênese e manifestação de comportamentos reprodutivos.

Muitos trabalhos já foram realizados para analisar o comportamento reprodutivo sazonal de algumas espécies, principalmente nos animais de produção (NAGY et al., 2000; ROSA & BRYANT, 2003; ABECIA et al., 2012). Este fenômeno ocorre, principalmente, pelo fotoperíodo e alterações da duração do dia, e pode ser regulado por diversos fatores, tais como temperatura, nutrição, contato com o outro sexo, tempo e duração do parto e da lactação (ROSA & BRYANT, 2003).

O principal hormônio que regula a sazonalidade na reprodução dos mamíferos é a melatonina, porém os seus mecanismos de ação na fisiologia reprodutiva ainda não estão totalmente esclarecidos (MALPAUX et al., 2001; CLARKE et al., 2009). Sabe-se, no entanto, que a sua síntese é maior durante os períodos de escuro, e assim, naqueles dias do ano onde o fotoperíodo é decrescente, ou seja, o período de luminosidade durante o dia é menor, ocorre maior síntese e liberação deste hormônio na corrente sanguínea pela glândula pineal (MALPAUX, 2006). Além disso, alguns trabalhos já mostraram a síntese desse hormônio em vários outros órgãos, inclusive naqueles relacionados à reprodução, como os ovários (ITOH et al., 1999; TOSINI & FUKUHARA, 2002).

Essa regulação reprodutiva que a melatonina faz no organismo depende da sua concentração na corrente sanguínea e varia entre as espécies sazonais. Aquelas consideradas de “dias curtos”, como os pequenos ruminantes e búfalos, apresentam sua estação reprodutiva no final do verão, outono e inverno, quando o período de escuro durante o dia é maior que o de luz, e assim, ocorre maior síntese de melatonina (ABECIA et al., 2012). Já os equinos, apresentam sua estação reprodutiva durante a primavera e verão, quando a luminosidade é maior, e ocorre menor síntese de melatonina, sendo chamados, portanto, de reprodutores de “dias longos” (NAGY et al., 2000).

Durante a estação reprodutiva, a melatonina pode realizar suas ações regulatórias na reprodução, principalmente, de duas formas. A via principal é pela indução de uma maior liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, e, consequentemente, dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela adenohipófise. Tanto o FSH quanto o LH, são responsáveis pelo desenvolvimento, ativação e estímulo das gônadas, que produzem os hormônios sexuais e desenvolvimento dos gametas (MALPAUX et al., 2001; CLARKE et al., 2009). No entanto, a melatonina pode agir também

diretamente sobre os testículos (LI et al., 1998), os espermatozoides (CASAO et al., 2012) e plasma seminal (CASAO et al., 2010b), utilizando ou não seus receptores de membrana, para auxiliar na melhor conservação e qualidade espermática.

Assim, tem-se como objetivo por meio desta revisão mostrar a influência do fotoperíodo sobre a reprodução dos machos caprinos e ovinos, e também, possíveis ações da melatonina na conservação espermática de forma direta e indireta.

2. FOTOPERÍODO E AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA

Os estudos relacionados à sazonalidade reprodutiva em machos são essenciais para o manejo e eficiência zootécnica da produção a campo. Ao se conhecer o processo reprodutivo sazonal de uma determinada espécie, pode-se fazer a correta escolha do reprodutor para estação de monta de um rebanho, além de identificar as melhores técnicas e períodos para a coleta e criopreservação do sêmen utilizado nas biotecnologias reprodutivas. Portanto, ao se compreender as variáveis reprodutivas dos animais sazonais podem ser criadas alternativas para diminuir ou eliminar os períodos de montas restritas, e aumentar a produção de produtos de origem animal/ano.

As características sazonais de reprodução se expressam com maior intensidade naqueles animais com origem em regiões de latitudes superiores a 35 °N ou 35 °S (AVDI et al., 2004; SARLÓS et al., 2013). No entanto, estas alterações sazonais são muito mais delicadas em machos do que em fêmeas, as quais apresentam um período de anestro reprodutivo, enquanto a espermatogênese e atividade sexual são ininterruptas nos machos (PELLETIER & ALMEIDA, 1987). Dentre as principais características claramente observadas nos machos estão as mudanças no comportamento (libido), nas dimensões testiculares (massa e volume), na espermatogênese e secreção hormonal (KAFI et al., 2004; ZAMIRI & KHODAEI, 2005).

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, pelo qual uma espermatogônia (2n), gradativamente, se diferencia em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. A produção espermática acontece com a liberação pulsátil de GnRH e a chegada subsequente de LH e FSH às células-alvo. O LH estimula as células de Leydig a secretarem testosterona, que se difunde através da membrana basal e regula as células de Sertoli e mióides, as quais contêm receptores androgênicos. Uma alta concentração local de testosterona (50 a 100 vezes maior que no plasma) é essencial para que se completem os estágios subsequentes da espermatogênese.

O FSH estimula a produção da proteína transportadora de andrógeno (ABP), que forma um complexo com a testosterona. Esse complexo, ABP-T, é transportado com os espermatozoides para dentro do epidídimo, pois as células epiteliais do epidídimo requerem concentrações relativamente altas de testosterona para uma boa atividade de maturação espermática (GARDNER & HAFEZ, 2004).

2.1 Variação do volume testicular e sazonalidade

As mudanças sazonais nas dimensões testiculares são precedidas pela diminuição de LH e aumento da secreção de FSH, como relatado em inúmeras raças de ovinos (AVDI et al., 2004; KAFI et al., 2004; DICKSON & SANFORD, 2005; BARKAWI et al., 2006). A principal razão para o aumento do volume testicular na estação reprodutiva é a proliferação das células de Sertoli, as quais são essenciais para fornecer suporte estrutural, nutricional e funcional para a diferenciação e a proliferação das células germinativas (SHARPE et al., 2003). O processo que leva ao aumento do número e da funcionalidade das células de Sertoli, ainda precisa ser totalmente esclarecido, mas já se sabe da necessidade do controle hormonal hipofisário (ESCOTT et al., 2011/2), o qual é regulado pelo fotoperíodo como descrito anteriormente.

A análise do perfil hormonal de machos caprinos em uma região com latitude 30° N durante as quatro estações do ano, mostrou que no verão, período que antecede a estação reprodutiva, a concentração plasmática de FSH ($1,1 \pm 0,15$ mIU/mL) foi maior que a de LH ($0,4 \pm 0,18$ mIU/mL). Durante a estação reprodutiva, no outono, a concentração plasmática de LH ($2,9 \pm 0,16$ mIU/mL) foi maior que a de FSH ($0,4 \pm 0,13$ mIU/mL) (BARKAWI et al., 2006). O aumento anterior à estação reprodutiva de FSH pode ser um mecanismo fisiológico do organismo para aumentar o volume testicular e aumentar a produção espermática. Durante a estação reprodutiva, o aumento de LH pode ser devido à influência da melatonina ativando um perfil predominantemente de pulsos de alta frequência de GnRH, que induz a secreção de LH e não de FSH.

Os testículos dos mamíferos podem ser divididos em duas áreas principais, com morfologia e funções distintas. A região intertubular contém o tecido intersticial e é composta por células conjuntivas e esteroideogênicas (de Leydig), vasos sanguíneos e linfáticos. Essa região preenche os espaços entre os cordões sexuais ou túbulos seminíferos, onde se encontram as células de Sertoli e as células germinativas em desenvolvimento (GARDNER & HAFEZ, 2004). Barkawi et al. (2006) ao avaliarem a influência sazonal do fotoperíodo na reprodução de carneiros, observaram que a área, a espessura do epitélio

seminífero e o número de camadas espermáticas na parede dos túbulos seminíferos na estação reprodutiva ($65,4 \pm 17,0$ %; $53,0 \mu\text{m}$; e $5,6 \pm 0,55$, respectivamente), foram maiores que as encontradas fora da fase de estação ($49,8 \pm 7,9$ %; $19 \mu\text{m}$; $2,5 \pm 0,58$, respectivamente). Por outro lado, a área ocupada pelo tecido intersticial na estação reprodutiva foi menor ($34,6 \pm 17,0$ %) que a encontrada na estação não-reprodutiva ($50,2 \pm 7,9$ %). Essas alterações testiculares ocorrem para aumentar a produção espermática durante a época de estação reprodutiva das fêmeas, podendo ser necessário, no entanto, a diminuição da área intersticial para um maior aumento da área produtora dos espermatozoides.

Sarlós et al. (2013) mostraram que os aumentos das dimensões testiculares em carneiros foram substancialmente influenciadas pela estação reprodutiva ($r= 0,87$). Por consequência, o aumento do perímetro escrotal pode ter permitido a moderada correlação negativa estabelecida com as anormalidades nas células espermáticas ($r= -0,50$) (SARLÓS et al., 2013). Portanto, é possível que o maior espaço/volume testicular na fase reprodutiva permita um menor número de apoptoses celular, além de levar ao aumento do número das células de Sertoli, que aumenta o aporte nutricional e estrutural das células germinativas.

Na tabela 1, alguns resultados de trabalhos com pequenos ruminantes são apresentados mostrando as variações de alguns parâmetros reprodutivos, como o perímetro. Já na figura 1, pode-se observar a variação na estrutura dos túbulos seminíferos em hamsters, que são animais considerados reprodutores de “dias longos”, expostos a dois fotoperíodos (longo e curto).

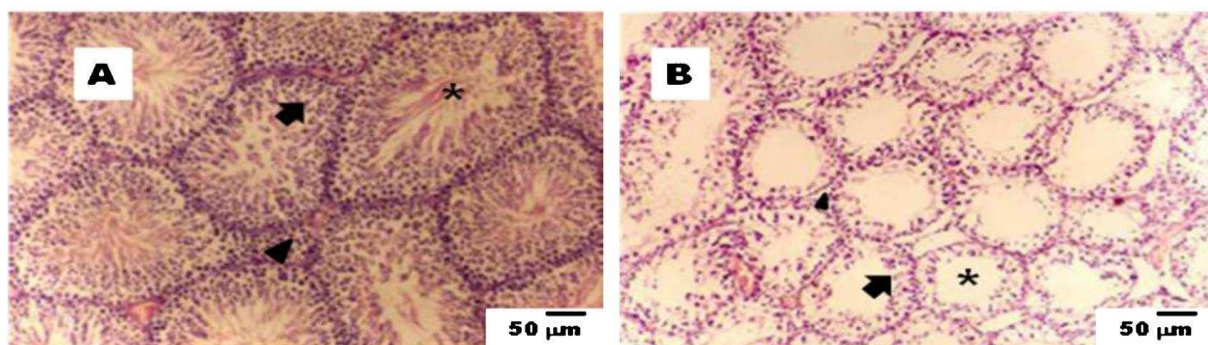


Figura 1: epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos de hamsters expostos ao fotoperíodo longo (A) ou curto (B). Os asteriscos indicam o lúmen do túbulo seminífero, setas apontam para células da linhagem espermatogênica e pontas de seta apontam para tecido intersticial (hematoxilina-eosina; aumento de 40x).
Fonte: reproduzido de Boggio et al. (2013).

2.2 Tempo de reação e sazonalidade

O tempo de reação (TR) do reprodutor é o período transcorrido desde a visualização

e contato com a fêmea até a primeira ejaculação (CHENOWETH, 1981). É um parâmetro muito utilizado para analisar o comportamento sexual do macho reprodutor. Em caprinos, durante o TR pode se observar antes da cópula ou ejaculação algumas outras características como, ato de cheirar e lamber a região anogenital, reflexo de Flehmen, ato de bater e raspar o casco no chão, acotovelamento e escoiceamento da fêmea, emissão de som característico, exteriorização e retração da língua, ereção/exposição do pênis, reflexo de monta e montas sem introdução do pênis na vagina com posterior ejaculação (montas sem serviço) (dados pessoais).

Barkawi et al. (2006) observaram maior libido de bodes Zaraibi no outono (estação reprodutiva), com menor número de montas (1,7) e tempo de reação mais curto (21,4 segundos) que na contra-estação (2,4 e 87,4 segundos, respectivamente). Em carneiros deslanados tropicais, também foi encontrado menor TR na estação reprodutiva (14,64 segundos) que fora dela (26,46 segundos) (AGUIRRE et al., 2007). Esse aumento da libido pode ser devido a maior concentração de testosterona circulante, já que este hormônio além de ser responsável pela eficiência da espermatogênese, também influencia na manifestação das características sexuais secundárias, como os feromônios. Além disso, a testosterona está em níveis mais elevados durante a estação de monta e acompanha uma tendência sazonal anual de síntese e secreção (SANTIAGO-MORENO et al., 2005; TODINI et al., 2007).

2.3 Síntese de testosterona e sazonalidade

O hormônio testosterona é quase que exclusivamente produzido pelas células de Leydig (tecido intersticial), podendo também ser secretado pela região cortical da adrenal (SIEGEL et al., 1992). Dentre as suas funções reprodutivas, podem-se destacar a regulação das células de Sertoli estimulando os estádios finais da espermatogênese, o prolongamento da vida útil dos espermatozoides no epidídimo, estímulo ao desenvolvimento dos órgãos reprodutivos secundários, e a manutenção das características sexuais secundárias e da libido do macho (GARDNER & HAFEZ, 2004). Segundo Odonnell et al. (1994), o desenvolvimento das espermátides alongadas a partir das arredondadas é altamente dependente de testosterona. Portanto, a testosterona está diretamente envolvida em vários processos reprodutivos e apresenta flutuações em suas concentrações plasmáticas entre as estações reprodutivas (SANTIAGO-MORENO et al., 2005; TODINI et al., 2007).

Estudos realizados em carneiros mostraram que a sazonalidade do fotoperíodo influencia fortemente a síntese de testosterona ($r= 0,71$), ou seja, a produção de testosterona é maior na estação reprodutiva (SARLÓS et al., 2013). Porém, ainda não se sabe, se a baixa atividade na sua síntese fora da época da estação reprodutiva (primavera/verão) é devido somente à diminuição da concentração de gonadotrofinas por influência do fotoperíodo (crescente), ou uma combinação de fatores fisiológicos e ambientais (fotoperíodo crescente+altas temperaturas) (BARBOSA et al., 1999).

Além dos dados apresentados na tabela 1, outros trabalhos também apresentam a variação das concentrações plasmáticas da testosterona durante o ano. Todini et al. (2007) observaram nas raças caprinas Ionica, Garganica, Maltese e Red Syrian que a produção de testosterona (ng/mL) durante a estação reprodutiva foi maior ($8,37 \pm 0,56$; $9,12 \pm 0,43$; $4,53 \pm 0,43$; $5,20 \pm 0,47$, respectivamente) que na estação não reprodutiva ($2,01 \pm 0,26$; $1,77 \pm 0,20$; $1,47 \pm 0,12$; $2,93 \pm 0,46$). Em Muflão, uma raça de carneiro selvagem, a concentração plasmática máxima de testosterona ocorreu durante o outono (estação reprodutiva), enquanto em carneiros Merino, uma raça domesticada, a maior concentração de testosterona circulante ocorreu durante o verão (SANTIAGO-MORENO et al., 2005). As diferenças entre raças podem ser explicadas, de acordo com Lincoln et al. (1990), pelas variações nos mecanismos neuroendócrinos centrais ao transmitir as informações do fotoperíodo para o hipotálamo, o qual controla a secreção de GnRH/LH. Contrariamente, Roselli et al. (2002) afirmaram que variações nas concentrações de testosterona podem ser devido mais como resultado de uma diferença na receptividade funcional do testículo ao LH, do que a sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise ou no metabolismo periférico e clearance de testosterona.

Como foi descrito anteriormente, durante a estação reprodutiva ocorre um aumento do volume e massa testicular que influenciam positivamente na síntese de testosterona. Zamiri et al. (2010) e Sarlós et al. (2013) demonstraram correlação positiva entre a concentração de testosterona plasmática e o perímetro escrotal ($r= 0,58$ e $r= 0,62$, respectivamente). Além disso, também foi registrado correlação negativa entre a testosterona e as anormalidades espermáticas ($r= -0,43$) (SARLÓS et al. 2013), mostrando a importância deste hormônio para a correta produção das células espermáticas, principalmente nas fases finais (ODONNELL et al. 1994). Assim, conclui-se que o aumento de volume do testículo na estação reprodutiva, leva a uma maior secreção de testosterona para

Tabela 1- Influência da sazonalidade na circunferência testicular, concentração plasmática de testosterona e alterações seminais de ovinos e caprinos

ESPÉCIE	RAÇA	LATITUDE	FASE	CIRCUNFERÊNCIA TESTICULAR (cm)	TESTOSTERONA	VOLUME SEMINAL (mL)	CONCENTRAÇÃO (10 ⁹ /mL)	TOTAL DE CÉLULAS (x10 ⁹)	CÉLULAS ANORMAIS (%)	MOTILIDADE (escala 0-100 %)	AUTOR
Ovina	Black Racka	47° 29' N (Hungria)	Estação	31,77 ± 0,26	19,76 ± 1,96 (ng/mL)	0,91 ± 0,05	5,75 ± 0,25	5,41 ± 0,42	6,15 ± 0,73	-	SARLÓS et al., 2013
			Anestro	27,65 ± 0,36	6,34 ± 0,75 (ng/mL)	0,55 ± 0,05	6,15 ± 0,24	3,44 ± 0,33	16,90 ± 1,70	-	
	Moghani	39° 26' N (Irã)	Estação	34,5	4,47 (nmol/mL)	1,60	4,84	-	9,2	84,9	ZAMIRI et al., 2010
			Anestro	30,0	3,04 (nmol/mL)	0,93	3,44	-	14,2	69,3	
	Persian Karakul	29° 50' N (Irã)	Estação	33,3 ± 1,4	6,2 ± 1,2 (ng/mL)	1,3 ± 0,3	-	4,6 ± 1,7	-	-	KAFI; SAFDARIAN; HASHEMI, 2004
			Anestro	31,9 ± 1,2	4,1 ± 1,3 (ng/mL)	1,0 ± 0,2	-	4,3 ± 1,05	-	-	
	Pelibuey	18° 37' N (México)	Estação	30,90 ± 0,12	8,68 ± 0,44 (ng/mL)	0,86 ± 0,02	4,40 ± 0,16	3,37 ± 0,17	-	-	AGUIRRE; ORIHUELA; VÁZQUEZ, 2007
			Anestro	29,59 ± 0,32	6,03 ± 0,65 (ng/mL)	0,73 ± 0,05	4,02 ± 0,19	2,73 ± 0,27	-	-	
Caprina	Saanen Inglês	51° 46' N (Inglaterra)	Estação	26,8 ± 0,31	-	0,87 ± 0,04	4,37 ± 0,14	3,64 ± 0,14	13,65 ± 0,62	79,71 ± 0,71	AHMAD; NOAKES, 1996
			Anestro	23,2 ± 0,22	-	0,40 ± 0,01	5,51 ± 0,21	2,22 ± 0,13	16,32 ± 1,15	72,70 ± 1,47	
	Alpino	40° 37' N (Grécia)	Estação	-	-	1,42 ± 0,04	3,50 ± 0,09	4,92 ± 0,18	8,9 ± 0,14	64,04 ± 0,70	KARAGIANNIDIS; VARSAKELI; KARATZAS, 2000
			Anestro	-	-	1,09 ± 0,04	3,77 ± 0,10	4,11 ± 0,20	11,9 ± 0,20	55,11 ± 0,91	
	Saanen	40° 37' N (Grécia)	Estação	-	-	1,27 ± 0,04	3,42 ± 0,09	4,37 ± 0,20	7,41 ± 0,25	68,73 ± 0,67	KARAGIANNIDIS; VARSAKELI; KARATZAS, 2000
			Anestro	-	-	1,01 ± 0,04	3,82 ± 0,08	3,78 ± 0,15	9,5 ± 0,30	59,64 ± 0,82	
	Damascus	40° 37' N (Grécia)	Estação	-	-	1,18 ± 0,03	3,54 ± 0,09	4,12 ± 0,13	5,68 ± 0,26	69,04 ± 0,56	KARAGIANNIDIS; VARSAKELI; KARATZAS, 2000
			Anestro	-	-	1,00 ± 0,03	3,83 ± 0,09	3,73 ± 0,14	7,21 ± 0,33	61,20 ± 0,61	
	Murciano-Granadina	37° 59' N (Espanha)	Estação	-	-	1,21 ± 0,02	3,35 ± 0,06	4,06 ± 0,09	5,55 ± 0,23	89,36 ± 0,88	ROCA et al., 1992
			Anestro	-	-	0,88 ± 0,02	4,73 ± 0,10	4,17 ± 0,15	6,80 ± 0,33	89,30 ± 0,83	
	Zaraibi	30° 1' N (Egito)	Estação	25,4 ± 0,22	8,2 ± 0,47 (ng/mL)	0,98 ± 0,03	4,7 ± 0,10	4,6 ± 0,02	8,8 ± 0,46	79,5 ± 1,37	BARKAWI et al., 2006
			Anestro	26,2 ± 0,34	2,6 ± 0,56 (ng/mL)	0,35 ± 0,05	4,8 ± 0,09	4,4 ± 0,02	17,9 ± 0,84	73,1 ± 2,5	

permitir a perfeita produção das células espermáticas, além do desenvolvimento das características sexuais secundárias e comportamentais necessárias nesta fase.

2.4 Características seminais e sazonalidade

Como pode ser observado de forma resumida na tabela 1, quanto maior a latitude da região onde foi realizado o experimento, maior é a variação dos parâmetros reprodutivos entre a estação de reprodução e estação não-reprodutiva (AGUIRRE et al., 2007). Segundo alguns autores, diferentemente das fêmeas, a variação de muitos desses parâmetros durante o ano não compromete a capacidade de fertilização do macho (ROCA et al., 1992; KARAGIANNIDIS et al., 2000; KAFI et al., 2004; AGUIRRE et al., 2007; SARLÓS et al., 2013).

De acordo com os trabalhos apresentados, sêmen de qualidade e quantidade superior é coletado no final do verão e durante o outono (ROCA et al., 1992; KARAGIANNIDIS et al., 2000; KAFI et al., 2004; BARKAWI et al., 2006). Segundo Sarlós et al. (2013) existe correlação negativa entre a sazonalidade e anormalidades espermáticas ($r = -0.55$), ou seja, durante o período de estação reprodutiva ocorrem menores índices de espermatozoides defeituosos que comprometem a qualidade espermática e sua eficiência de fertilização.

Apesar das variações reprodutivas sazonais não serem consideradas suficientes para impedir os carneiros de serem usados para a reprodução ao longo do ano, deve-se considerar tais alterações para algumas práticas zootécnicas e tomadas de decisões. Por apresentar melhor qualidade, Zamiri et al. (2010) recomendam o sêmen de carneiro produzido durante o outono (estação) para se realizar o armazenamento (criopreservação). Durante a estação reprodutiva, também se pode fazer a correta seleção dos melhores machos para fase de monta e coleta de sêmen para inseminação artificial (ROCA et al., 1992; BARKAWI et al., 2006), sem condenar de forma equivocada os machos com menores índices reprodutivos. Além disso, conhecer os parâmetros reprodutivos dos machos de cada raça permite criar alternativas no manejo de animais em sistemas intensivos de criação, que buscam, por exemplo, terem dois partos por ano em seus rebanhos (BARKAWI et al., 2006).

Portanto, de forma geral, os trabalhos apresentam resultados semelhantes quanto à variação sazonal da testosterona plasmática e dos parâmetros andrológicos em pequenos ruminantes, com a estação de monta sendo comum nas épocas de fotoperíodo decrescente (final do verão/outono) (Figura 2).

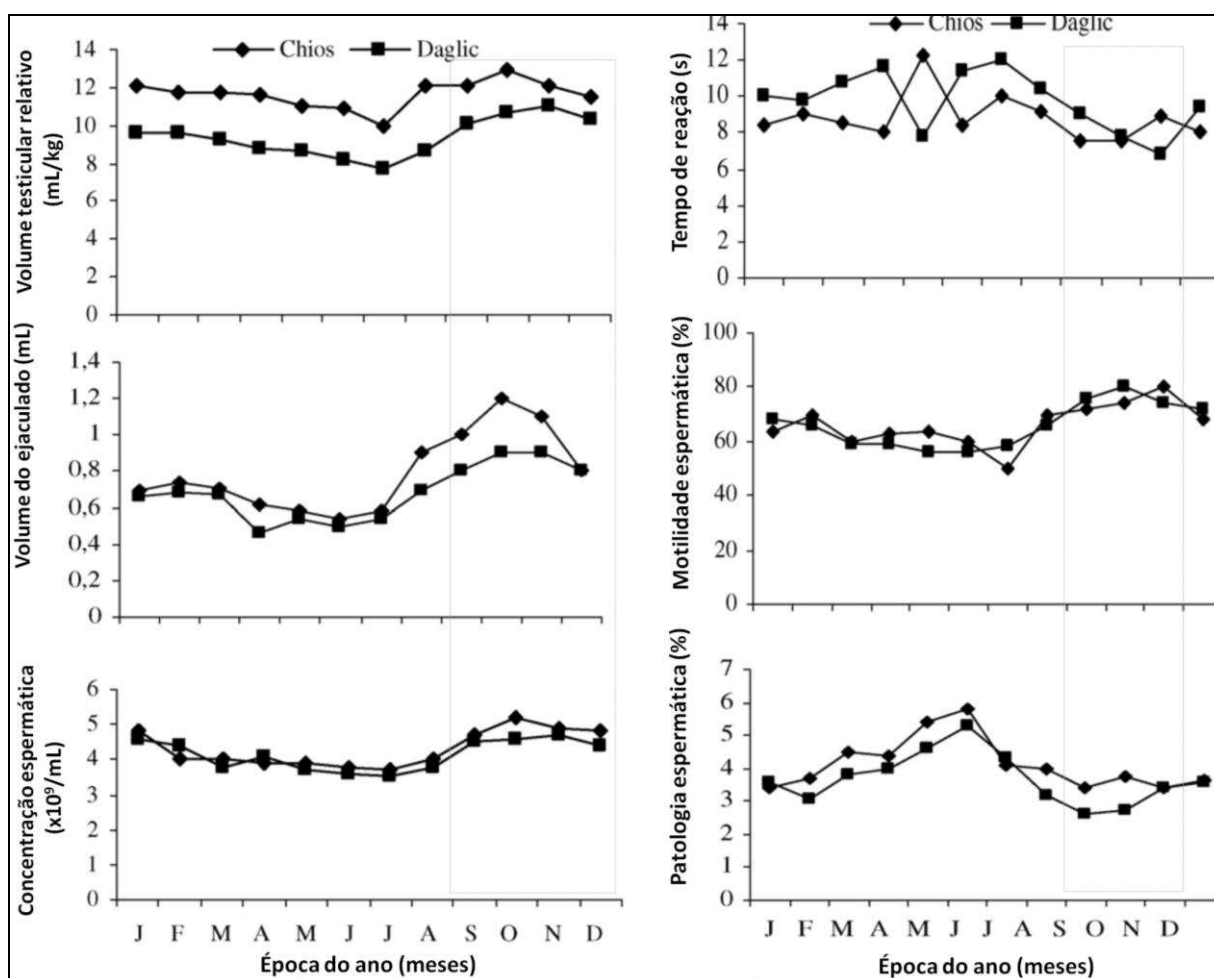


Figura 2: médias mensais dos parâmetros andrológicos em carneiros da raça Chios e Daglic durante o ano.
Fonte: reproduzido de M. Gündogan (2007).

3. A MELATONINA NA REPRODUÇÃO DO MACHO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é sintetizada a partir do triptofano, e secretada principalmente pela glândula pineal de mamíferos, mas existem várias estruturas reprodutivas periféricas que a produzem provavelmente para seu próprio uso (ITOH et al., 1999; TOSINI & FUKUHARA, 2002). Ainda se tem sugerido que as mitocôndrias de todas as células eucarióticas produzem melatonina (TAN et al., 2013). Obviamente, se esta hipótese for verdadeira, não haveria nenhuma célula no organismo que não sintetizasse esta importante indolamina (REITER et al., 2013).

Esse hormônio sintetizado quase que exclusivamente durante a ausência de luz é um dos componentes essenciais na regulação reprodutiva dos animais sazonais, já que todo o eixo reprodutivo é positivamente ou negativamente influenciado pela melatonina (REITER et al., 2013).

Os estudos relacionados aos efeitos benéficos da melatonina sobre os espermatozoides ainda não mostraram claramente se eles ocorrem por ações diretas no

esperma ou consequência de uma alteração na função do eixo HHG (REITER et al., 2013), ou ambos os mecanismos. O fornecimento de melatonina exógena a carneiros tem mostrado aumento da frequência de liberação pulsátil de GnRH e, consequentemente, hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona (WEBSTER et al., 1991; LINCOLN & CLARKE, 1997; ROSA et al., 2000). Assim, a melhoria na qualidade do sêmen pode ser devido as ações diretas da melatonina sobre os espermatozoides, por exemplo, como um antioxidante, ou indiretas, com ações mediadas pelo LH, FSH e, especialmente, a testosterona. A presença de melatonina no fluido seminal de carneiro se encontra em concentrações mais elevadas do que no soro sanguíneo (CASAO et al., 2009), o que aumenta a possibilidade da melatonina de ter ações diretas sobre os espermatozoides (REITER et al., 2013).

Os receptores de membrana para melatonina, MT1 e MT2, foram identificados em carneiros por imunocitoquímica agrupados em quase todas as áreas do espermatozoide: cabeça (região equatorial e pós-acrossomal), pescoço ou peça conectora e regiões da cauda (CASAO et al., 2012). No entanto, a razão para a distribuição heterogênea dos receptores de melatonina ainda não foi decifrado (REITER et al., 2013). Esses receptores também foram identificados nas células do epitélio epididimário, com densidade regulada pela testosterona e hidrocortisona (LI et al., 1998; SHIU et al., 2000). Em ratos, a melatonina tem a função de modular a proliferação da linhagem celular epididimária (LI et al., 1999), que auxilia a musculatura lisa na movimentação espermática nos ductos do epidídimo (REITER et al., 2013).

A vesícula seminal e próstata apresentaram mudanças no tamanho e função em animais que são classificados como reprodutores sazonais sensíveis ao fotoperíodo. No entanto, essas mudanças são secundárias as alterações na síntese e secreção de andrógenos que são regulados pela gonadotrofinas (REITER, 1975; CHAVES et al., 2012).

3.1 Melatonina como molécula antioxidante e protetora do DNA celular

A melatonina influencia, independente de receptores, a fisiologia reprodutiva do macho estimulando enzimas antioxidantes, e também, sequestrando radicais livres (OH e ONOO^-) que poderiam levar a danos e apoptose das células espermática (RODRIGUEZ et al., 2004; DU PLESSIS et al., 2010) (Figura 3).

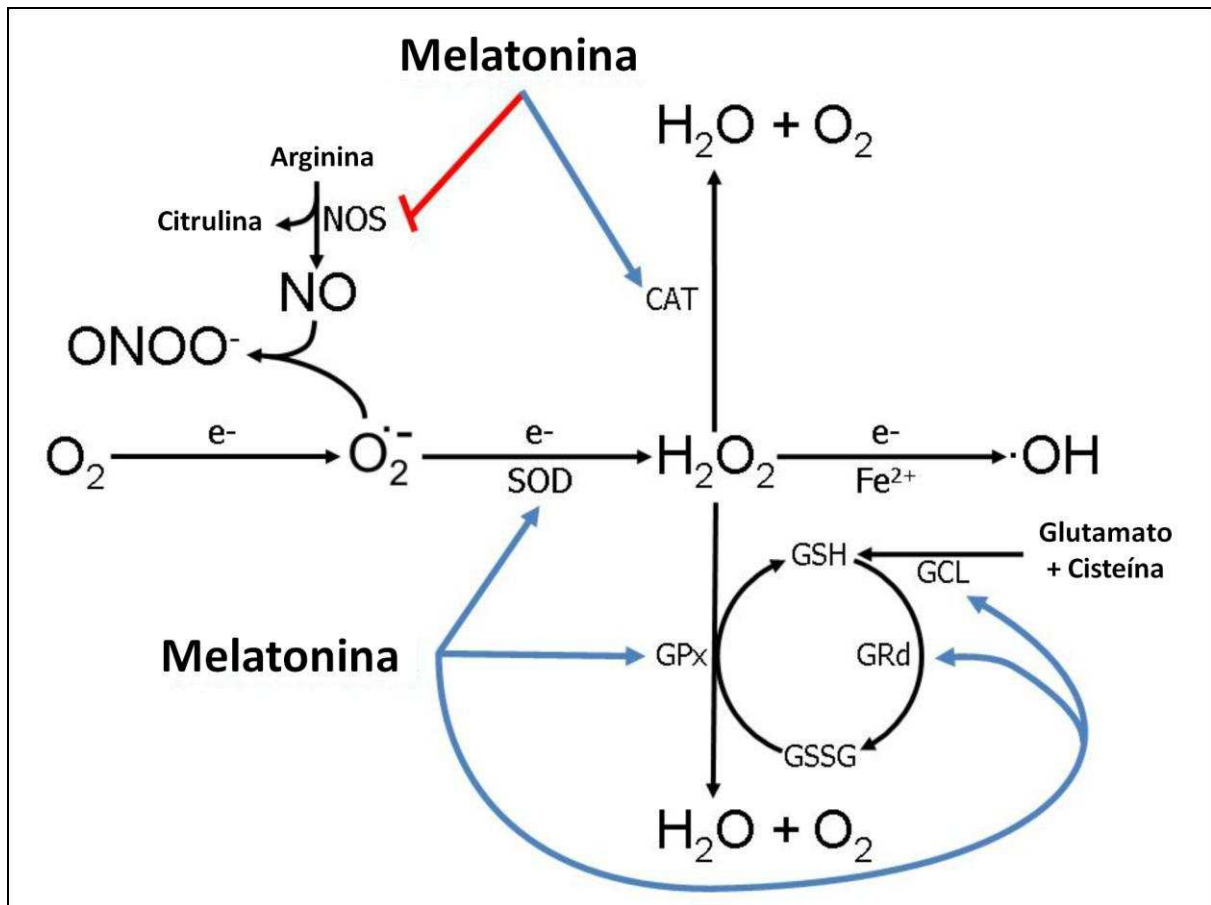


Figura 3: ações da melatonina reduzindo radicais livres. A melatonina estimula muitas enzimas antioxidantes incluindo a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GRd) e glutamylcysteine ligase (GCL); e também, inibe enzimas pró-oxidativas como, óxido nítrico sintase (NOS). O radical ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (•OH) são referidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), e o óxido nítrico (NO) e ânion peroxinitrito (ONOO⁻) são referidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS).

Fonte: reproduzido de Reiter et al. (2013).

Quando a função mitocondrial dos espermatozoides, como em qualquer outra célula, está comprometida, ocorre um vazamento dos elétrons da cadeia respiratória levando a excessiva produção de radicais livres que danificam as organelas e os espermatozoides, que eventualmente, sofrem apoptose (REITER et al., 2013). Shang et al. (2004) usando sêmen humano induziram a síntese de radicais livres, e verificaram o aumento na atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, a geração de ROS e a redução do potencial de membrana mitocondrial. O grau de alteração de cada um destes parâmetros foi reduzido na presença de melatonina e os autores sugeriram a utilização deste antioxidante em diluentes seminais para proteger os espermatozoides de danos oxidativos.

Essas alterações danosas que prejudicam a funcionalidade espermática e a fertilidade, muitas vezes ocorrem também por contaminantes ambientais (REITER et al., 2013). Espermatozoides de ratos, retirados do epidídimo, e incubados com mercúrio

apresentaram redução na motilidade e na atividade de enzimas antioxidantes, e aumento na geração de H_2O_2 e produtos de peroxidação lipídica. Quando coincubados com melatonina (mercúrio + melatonina) todas as mudanças induzidas pelo metal pesado foram revertidas para os níveis encontrados em espermatozoides normais (RAO & GANGADHARAN, 2008). Outra questão ambiental são os pesticidas organofosforados utilizados em lavouras e que podem levar a alterações no genoma celular. Roedores tratados com *Diazinon*, um pesticida muito utilizado para controlar insetos em culturas de frutas e legumes, apresentaram extensa ruptura do DNA e da cromatina em espermatozoides epididimários. Porém, quando a melatonina foi administrada antes do fornecimento do pesticida, os danos ao DNA foram drasticamente diminuídos (SARABIA et al., 2009).

Os profissionais que trabalham em locais de altas altitudes, como pilotos de aeronaves, estão sempre submetidos à hipóxia, que pode danificar os espermatozoides (TAMME et al., 2010), principalmente, os que estão concentrados na cauda do epidídimo (KURCER et al., 2010). Uma vez que os efeitos danosos causados pela isquemia/reperfusão sanguínea são principalmente uma consequência da geração excessiva de radicais livres, a capacidade da melatonina de diminuir os danos dos espermatozoides no epidídimo foi atribuída à atividade de eliminação de radicais livres de forma direta (REITER et al., 2013). Roedores expostos a altas altitudes (4500 m acima do nível do mar) por 33 dias resultaram em aumento de teratozoospermia (teratospermia), assim como, elevada peroxidação lipídica e danos ao DNA. A administração regular de melatonina em condições de hipóxia amenizou parcialmente as ações destrutivas do ambiente de baixo oxigênio (VARGAS et al., 2011).

Quando espermatozoides de humanos foram incubado com 2 mM de melatonina *in vitro*, durante 120 min. e avaliados posteriormente, a percentagem de espermatozoides móveis, com mobilidade progressiva e rápida foram todos elevadas (DU PLESSIS et al., 2010). Estas alterações foram acompanhadas por um aumento na viabilidade do esperma analisado por meio de sonda fluorescente Iodeto de Propídio (IP), o qual passa pelas membranas celulares de células lesionadas ou com metabolismo deficiente, corando o DNA. No mesmo trabalho, a melatonina também reduziu as concentrações de óxido nítrico no esperma, mas não na geração de ROS.

Na produção de “semen sexado”, os espermatozoides que carregam os cromossomos X e Y são separados por citometria de fluxo para produzir um sêmen comercial que permite o nascimento de crias com o sexo desejado (JOHNSON, 2000). No entanto, a taxa de prenhez

ao utilizar este tipo de sêmen é menor que a aquela obtida ao se utilizar o sêmen convencional, pois o processo de sexagem, e também de criopreservação logo após, produzem muitos radicais livres que comprometem a funcionalidade do esperma (AGAWAL & PROBAKARAN, 2005). Li et al. (2012) usaram melatonina como protetor do esperma de búfalos Nili-Ravi durante o processo de sexagem. Eles concluíram que a melatonina no diluidor de sêmen, devido a sua capacidade de sequestrar efetivamente espécies reativas de oxigênio, é altamente útil ao proteger os espermatozoides de búfalos durante a coloração, classificação (processo de sexagem) e congelamento. Eles também previram que espermatozoides bubalinos tratados com melatonina teriam uma melhor capacidade de fertilização e taxas de prenhez aumentadas após a transferência de embriões ou inseminação artificial.

3.2 Melatonina e conservação do sêmen

A criopreservação espermática é realizada em várias espécies, porém o processo de congelamento e descongelamento causam danos moleculares e prejudicam a capacidade fertilizadora dos espermatozoides. A melatonina já foi utilizada em vários trabalhos para preservar a qualidade e viabilidade espermática durante a estocagem.

Succu et al. (2011) adicionaram melatonina (em concentrações de 0,001 a 1 mM) no diluente de congelamento de carneiros para determinar se a presença da indolamina iria diminuir os danos celulares e melhorar a qualidade dos espermatozoides após o descongelamento. Na concentração de 1 mM, a melatonina apresentou, após o descongelamento, as maiores porcentagens de espermatozoides móveis, de motilidade progressiva, de espermatozoides com velocidade média rápida e média, altas concentrações de ATP intracelular e maior integridade do DNA. Além disso, os oócitos fertilizados por espermatozoides tratados com melatonina exibiram maiores taxas de clivagem do que aqueles fertilizados por espermatozoides de carneiro congelados sem melatonina. Como a criopreservação do sêmen está associada a produção de elevadas concentrações de reagentes tóxicos, incluindo ROS e RNS (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2009), a melatonina agiria como um antioxidante contribuindo para diminuir os danos contra o espermatozoide.

Além da adição de melatonina no diluente de criopreservação, também já foram utilizados em carneiros implantes subcutâneos de melatonina durante e fora da estação reprodutiva, e após a coleta e criopreservação, a qualidade do ejaculado foi avaliada (KAYA

et al., 2001). Os resultados mostraram que a melatonina melhorou a viabilidade pós-descongelamento durante a estação reprodutiva, e melhorou, em ambas as fases reprodutivas, as taxas de acrossomos intactos. Assim, o sêmen de carneiros tratados com melatonina antecipadamente parecem ser mais bem conservados durante a criopreservação e criopreservadas (REITER et al., 2013).

Em suínos, a melatonina na concentração de 1 μ M foi adicionada ao sêmen com o objetivo de aumentar a vida útil do espermatozoide refrigerado (a 17 °C) (MARTIN-HILDAGO et al., 2011). Após os períodos de 1, 4 ou 7 dias, foram analisados os parâmetros referentes a motilidade total e progressiva por análise computacional. Também foram analisados por citometria fluxo, o estado de potencial de membrana mitocondrial com JC-1, a viabilidade celular com IP, a fluidez da membrana (que inversamente se correlaciona com o grau de peroxidação lipídica) (GARCIA et al., 1997) com M-540/YoPro-1, e o estado do acrossoma com FITC-PNA/PI. No dia 7, o número de espermatozoides estáticos aumentou e a porcentagem de espermatozoides móveis progressivos foi reduzida. As características de velocidade (velocidade curvilínea, a velocidade em linha reta, e a velocidade média de precursor) foram elevadas pelo tratamento de melatonina. As medidas de citometria documentaram que a melatonina aumentou a porcentagem de espermatozoides viáveis com acrossoma intacto e uma porcentagem significativamente maior de espermatozoides permanecendo viáveis durante o período de armazenamento de 7 dias.

3.3 Melatonina como redutora de apoptose

Casao et al. (2010c) investigou se o ejaculado de carneiro durante a estação não-reprodutiva, incubado com melatonina nas concentrações 1 μ M, 10 nM e 100 pM, reduziria a apoptose espermática e melhoraria a qualidade do sêmen, ao avaliar a fertilização *in vitro* (FIV). Os resultados não mostraram influência da melatonina nos parâmetros de motilidade e de viabilidade espermática, porém, na concentração de 1 μ M, a melatonina diminuiu a capacitação e a translocação de fosfatidilserina (marcador utilizado para estudar o fenômeno apoptótico). Por outro lado, a 100 pM melatonina aumentou a capacitação em curto prazo, o que levou a elevadas taxas de fertilização e clivagem de oócitos na fertilização *in vitro*.

Em equinos, a incubação a 37 °C por 3 horas, do sêmen com melatonina (0, 50 pM, 100 pM, 200 pM ou 1 μ M) mostrou redução nas alterações que estão normalmente

associados com apoptose (aumento da permeabilidade da membrana plasmática e do baixo potencial de membrana mitocondrial), além de baixas concentrações de produtos de peroxidação lipídica e uma maior fluidez (menos rigidez) das membranas plasmáticas dos espermatozoides (SILVA et al., 2011). A peroxidação dos lipídeos é considerada como um grave risco durante a criopreservação de espermatozoides e a sua redução com a melatonina, juntamente com os melhoramentos funcionais relacionados, é altamente notável. Eles concluíram que as ações protetoras da melatonina foram uma consequência de suas ações diretas no sequestro de radicais livres e indiretas na estimulação de enzimas antioxidantes (provavelmente receptor-mediado).

Em trabalhos com sêmen humano (ESPINO et al., 2010), a melatonina foi testada quanto à sua capacidade para proteger os espermatozoides humanos da apoptose depois da exposição à agentes tóxicos. Após a sua incorporação, a melatonina inibiu o aumento da atividade das caspase-3 e caspase-9, que são essenciais para a realização do processo apoptótico, além de reduzir a externalização da fosfatidilserina que é um dos primeiros eventos da apoptose, e também dos níveis de radicais livres que podem levar a morte das células. Assim, como as técnicas de reprodução assistida induzem a produção de radicais livres e apoptose, e com base nos dados já descobertos por outros pesquisadores, Espino et al. (2010) também sugeriram a possibilidade de utilização de melatonina como um componente do meio de armazenamento para a preservação espermática, devido as suas atividades antioxidante e anti-apoptótica.

3.4 Melatonina como indutor da capacitação e hiperativação espermática e reação acrossômica

A capacitação espermática é um processo de modificação estrutural e funcional necessário que o espermatozoide deve passar para obter a capacidade de fertilizar os oócitos. Essas modificações ocorrem ao nível molecular da membrana plasmática e resultam em alterações morfológicas (reação acrossômica) e fisiológicas (hiperativação do flagelo), sendo todo o processo dependente de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos íons Ca^{2+} . A reação acrossômica é caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando em formação de vesículas e permitindo a liberação de enzimas do conteúdo acrossômico (BENDAHMANE et al., 2001). Já a hiperativação, caracteriza-se por mudanças no padrão do batimento flagelar, fato que

facilita a penetração dos espermatozoides através dos diversos envoltórios dos oócitos (FUJINOKI et al., 2006).

A hiperativação após a adição de melatonina foi observada em espermatozoides de suínos (MARTIN-HIDALGO et al., 2011) e de hamsters (FUJINOKI, 2008). A hiperatividade nos estágios iniciais de armazenamento pode ter sido resultado de uma elevada síntese de ATP, já que a melatonina pode promover a eficiência do complexo mitocondrial e a produção de ATP (MARTIN et al., 2000; MARTIN et al., 2002; LEON et al., 2004). Devido à sua elevada solubilidade lipídica, a melatonina passa facilmente através do plasmalema de células e entra nas mitocôndrias (JOU et al., 2007). Algumas das ações da melatonina sobre a motilidade do espermatozoide também podem ter sido uma consequência de sua interação com a calmodulina (POZO et al., 1997; BENITEZ-KING & ANTON-TAY, 1993) que, entre as suas várias funções, influencia elementos do citoesqueleto, e assim, regula a motilidade dos espermatozoides (REITER et al., 2013).

Fujinoki (2008) sugeriu que a melatonina produzida no ovário serviria como o agente de ativação para os espermatozoides no trato reprodutivo feminino. No entanto, como a melatonina é sintetizada em vários tecidos do trato reprodutivo feminino, a fonte deste hormônio que auxilia na hiperativação do espermatozoide no útero e, ou, tuba uterina permanece indefinida (REITER et al., 2013). Fujinoki (2008) também descobriu que o tratamento de espermatozoide hamster com luzindol, um antagonista dos receptores de membrana da melatonina, MT1/MT2, bloqueou a hiperativação, enquanto a incubação de espermatozoide com dois diferentes antagonistas para MT2 não conseguiu alterar a resposta hiperativa. Assim, pode-se pressupor que a ação da melatonina sobre a hiperatividade espermática é mediada pelo receptor MT1.

Após a capacitação, os espermatozoides estão aptos a realizarem a fecundação após se ligarem a Zona Pelúcida que envolve o oócito. Casao et al. (2010) examinaram pelo Teste de Ligação à Zona Pelúcida a habilidade da melatonina em influenciar a fertilidade do espermatozoide. Ao utilizarem o sêmen de carneiros com e sem implantes de melatonina, eles observaram maior facilidade de ligação do espermatozoide ao oócito do sêmen de animais que receberam melatonina. Além disso, ovelhas inseminadas com sêmen de doadores tratados com melatonina, exibiram uma melhoria na fertilidade e fecundidade. Assim, os autores concluíram que o uso de melatonina poderia ser um meio eficaz para melhorar a qualidade do espermatozoide e melhorar a sua capacidade fertilizadora.

4. O PLASMA SEMINAL E A SAZONALIDADE

Em várias espécies, o plasma seminal (PS) contém fatores (íons ou proteínas) que podem influenciar a viabilidade espermática, como por exemplo, mantendo a motilidade espermática (GRAHAM, 1994) ou melhorando a sua viabilidade (ASHWORTH et al., 1994). Alguns estudos ainda, demonstram a capacidade do PS de carneiros de reparar a integridade da membrana dos espermatozoides que sofreram choque térmico (BARRIOS et al., 2000) e, ou, de evitar crioinjúrias (PÉREZ-PÉ et al., 2001). Por outro lado, os efeitos prejudiciais do PS na motilidade, viabilidade, e sobrevivência após o congelamento-descongelamento (GRAHAM, 1994; PELLICER-RUBIO & COMBARNOUS, 1998) também têm sido relatados. Estes resultados indicam que o PS é uma mistura complexa que contém uma grande variedade de componentes que afetam a sobrevivência e motilidade dos espermatozoides (DOMÍNGUEZ et al., 2008)

A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada espécie, podendo diferir entre os tipos e a atuações das proteínas espermáticas que nele se encontram (SOUZA et al., 2009). Ainda se pode considerar a variação sazonal nos níveis de proteínas (DOMÍNGUEZ et al., 2008), açúcares (MATSUOKA et al., 2006) e íons (ZAMIRI & KHODAEI, 2005).

Além dos componentes adquiridos de forma fisiológica ou endógena, o plasma seminal pode ainda adquirir moléculas e, ou, estruturas do ambiente após a sua ejaculação. Azawi e Ismaeel (2012) observaram que houve um significativo efeito sazonal na contagem bacteriana do sêmen de carneiros, sendo maior no meio do verão e no outono, ou seja, no período da estação reprodutiva. Esses microrganismos podem prejudicar a qualidade do sêmen ejaculado, principalmente se for utilizado para criopreservação (AZAWI & ISMAEEL, 2012). Além de serem causas de doenças, eles podem alterar o equilíbrio osmótico do meio, produzir substâncias tóxicas aos espermatozoides, e diminuir os nutrientes destinados às células espermáticas contidos nos meios de conservação. As bactérias mais frequentemente isoladas no sêmen de carneiro são *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus aureus* (YÁNIZ et al., 2010). Como essas espécies necessitam de uma temperatura ótima para crescimento entre 25 e 45 °C, acredita-se que o aumento da temperatura e de possíveis secreções uretrais na época da estação, estimule o crescimento bacteriano na mucosa do pênis (AZAWI & ISMAEEL, 2012).

A presença ou ausência de determinadas substâncias do plasma seminal que

sustentam as células espermáticas, ou seja, mantêm sua integridade funcional e fisiológica, podem influenciar na eficiência da fertilização. Essas funções de auxílio e preservação do ambiente ideal para os espermatozoides são realizadas por essas substâncias plasmáticas tanto internamente, no armazenamento dos espermatozoides na cauda do epidídimo, quanto após a ejaculação, através da criação de um microambiente favorável para o movimento de espermatozoides (EVANS & MAXWELL, 1987). Assim, as informações sobre a variação sazonal da composição do plasma seminal podem ser utilizadas na produção de soluções utilizadas como diluentes ou como meio de armazenamento de espermatozoides (ZAMIRI et al., 2010).

Alguns íons, como, o Ca^{2+} , Na^+ e K^+ ajudam estabelecer o equilíbrio osmótico do plasma seminal, e também são elementos essenciais nos componentes de muitas enzimas (ZAMIRI & KHODAEI, 2005). Portanto, a análise bioquímica do plasma seminal pode ser importante para a avaliação da qualidade espermática dos machos reprodutores. Zamiri et al. (2010) observaram níveis mais baixos de K^+ e Na^+ no fluido seminal de carneiros na contra-estação (72,7 e 70,2 mg/dL, respectivamente), que na estação reprodutiva (94,1 e 72,4 mg/dL, respectivamente). Ainda foi observado que a correlação da percentagem de espermatozoides vivos e da motilidade espermática com o nível seminal de K^+ ($r= 0,61$ e $0,49$, respectivamente) e nível de Na^+ ($r= 0,48$ e $0,34$, respectivamente) foram positivas (Zamiri et al., 2010). Assim, quanto maior a presença destes elementos no plasma seminal, possivelmente melhor será a qualidade e viabilidade espermática.

Diluentes seminais a base de gema de ovo ou leite para congelação de espermatozoides usualmente contêm glicose ou frutose. No sêmen ejaculado, a frutose é o maior sacarídeo presente, e tem um papel no metabolismo do espermatozoide, o qual a utiliza para produção de adenosina trifosfato (ATP) (KAMP et al., 1996; RIGAU et al., 2001; RIGAU et al., 2002). A frutose é sintetizada a partir da glicose sanguínea pelas glândulas acessórias, que são estimuladas pela testosterona (KUMAR & FAROOQ, 1994). O sêmen de Carneiros da raça Sulfock foi coletado durante o curso de um ano e as mudanças sazonais nas concentrações de frutose no plasma seminal, e de glicose e testosterona no plasma sanguíneo foram analisadas. A concentração de frutose aumentou na estação reprodutiva, com o máximo em outubro (179,8 mg/dL) e o mínimo na primavera (6,9 mg/dL). A concentração plasmática de glicose e testosterona em (79,3 mg/dL e 10,2 ng/mL) foi também significativamente maior na estação reprodutiva do que na contra estação (52,1

mg/dL e 1,8 ng/mL). Desta forma, a constatação de mudanças sazonais dos níveis de frutose no plasma seminal durante o ano, pode auxiliar na determinação da apropriada concentração deste carboidrato a ser adicionada nos diluentes seminais (MATSUOKA et al., 2006).

Um recente estudo (CASAO et al., 2010b) demonstrou também a presença sazonal da melatonina no plasma seminal de carneiros, e suas correlações positivas com os níveis de testosterona e com a atividade de enzimas antioxidantes no mesmo fluido. O tratamento com melatonina exógena em carneiros durante a estação não reprodutiva modificou o perfil do plasma seminal ao aumentar a melatonina endógena, testosterona e 17β estradiol, e também a presença de enzimas antioxidantes como a glutadiona peroxidase e redutase (CASAO et al., 2013). Assim, as diferenças sazonais na qualidade espermática e na fertilidade de carneiros pode ser devido à presença de melatonina no plasma seminal agindo diretamente nos espermatozoides (CASAO et al., 2010c) através da ligação com seus receptores de membrana (CASAO, 2012), ou variando a composição do plasma seminal.

Como relatado anteriormente, algumas funções do plasma seminal nem sempre promovem a melhoria e conservação das células espermáticas. Neste caso, ele pode afetar a qualidade do sêmen e a capacidade de fertilização devido a atividade de alguns elementos que o compõe (MAXWELL et al., 2007).

Em caprinos, o plasma seminal tem um efeito negativo sobre a sobrevivência dos espermatozoides quando são utilizados diluente a base de gema de ovo (ROY, 1957; IRITANI & NISHIKAWA, 1963). Essa interferência é causada por uma enzima conhecida como coaguladora de gema de ovo (EYCE), uma fosfolipase A secretada pelas glândulas bulbouretral (IRITANI & NISHIKAWA, 1963). Essa enzima hidrolisa os triglicerídeos das membranas plasmáticas dos espermatozoides e as tornam mais fusogênica, induzindo assim à reação acrossômica (UPRETI et al., 1999). Além disso, ela também hidrolisa a lecitina da gema do ovo em lisolecitina que é tóxica aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO & COMBARNOUS, 1998), e induz a condensação da cromatina (SAWYER & BROWN, 1995). Somado a isso, tem sido demonstrado que a atividade das glândulas sexuais acessórias em ruminantes aumenta durante a época de reprodução (SANTIAGO-MORENO et al., 2005), sendo uma característica negativa para as células espermática no processo de criopreservação durante este período.

Lavar amostras de sêmen caprino antes do processo de congelamento, no entanto, é um

processo demorado e que pode danificar as células se realizado de forma inadequada. Alguns trabalhos indicam que a remoção do plasma seminal é necessário para maximizar a motilidade e preservar a integridade acrossomal na descongelação (MEMON et al, 1985; RITAR & SALAMON, 1991), enquanto outros relatam resultados positivos para o sêmen congelado sem passar pelo processo de lavagem (AZERÊDO et al, 2001; RITAR & SALAMON, 1982). Coloma et al. (2010) ao remover o plasma seminal de bodes (*Capra pyrenaica*) observou o efeito benéfico durante a época de fotoperíodo decrescente, mostrando que o sêmen caprino apresenta um aumento da atividade fosfolipase durante a época da estação reprodutiva. Desta forma, os efeitos negativos da congelação-descongelação sobre a qualidade espermática (motilidade, integridade da membrana plasmática e do acrossoma) foram mais graves nas amostras de sêmen não lavadas do que naquelas da qual foi removido o plasma seminal.

No entanto, ao se analisar as possíveis funções e ações do plasma seminal, será observada a importância da sua presença, no que se diz respeito à conservação da qualidade espermática, principalmente, quando criopreservado.

Como descrito anteriormente, em países de regiões com clima temperado, a estação reprodutiva é determinada pelo fotoperíodo, o qual regula a secreção de gonadotrofinas, e estas modulam as gônadas dos animais sazonais. Já nas regiões tropicais e subtropicais, os caprinos se reproduzem em todas as épocas do ano, pois não sofrem interferência do fotoperíodo, porém os fatores ambientais, tais como alimentação e temperatura, regulam os períodos reprodutivos (MALPAUX, 2006). De Souza et al. (2009), ao estudarem o plasma seminal de bodes da raça Alpina no Nordeste do Brasil, observaram que o sêmen de melhor qualidade e um grupo de proteínas de 13 kDa e 45 kDa foram encontrados somente no período de alto índice pluviométrico. Assim, eles concluíram que o aumento das chuvas e, conseqüentemente, de alimentos, estimularia a síntese de proteínas do PS que influenciariam positivamente na qualidade do sêmen.

Várias proteínas do plasma seminal são aderidas à superfície do espermatozoide ejaculado (METZ et al., 1990; DESNOYERS & MANJUNATH, 1992; AMANN et al., 1999), mantendo a estabilidade da membrana plasmática do espermatozoide até a capacitação, que se inicia no trato reprodutivo da fêmea (CROSS, 1996) e é um pré-requisito para a fertilização (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992). Vários componentes do PS previnem e revertem danos causados pelo choque térmico na membrana espermática e melhoram a viabilidade e

fertilidade do sêmen congelado-descongelado (BARRIOS et al., 2000; BARRIOS et al., 2005; FERNANDEZ-JUAN et al., 2006). Em bovinos, esse grupo de proteína é chamado de “proteínas plasmáticas seminais bovinas” (BSP) ou (PDC-109), sendo as mais estudadas as BSP A1/A2. Proteínas homólogas às encontradas em bovinos foram descobertas em caprinos (GSP 14/15 kDa) (VILLEMURE et al., 2003) e em ovinos (RSP 15) (BERGERON et al., 2005). A possibilidade dessas proteínas, influenciadas pelo fotoperíodo, serem sintetizadas em diferentes níveis durante o ano levou Domínguez et al. (2008) a realizarem um estudo onde se incluiu o plasma seminal de diferentes épocas do ano de carneiros no diluente de congelação, com o objetivo de se prevenir ou reverter os danos causados pelo choque térmico durante o processo de criopreservação/descongelação. As proteínas do plasma seminal que se ligam aos espermatozoides foram afetadas pela estação, uma vez que a inclusão do plasma seminal do outono (estação reprodutiva) aumentou a motilidade espermática, diferentemente dos plasmas seminais coletados na primavera ou verão (DOMÍNGUEZ et al., 2008).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melatonina é um hormônio sintetizado principalmente durante o período de escuro e pode influenciar na fisiologia reprodutiva do macho de forma direta ou indireta. Esse hormônio pode tanto regular a síntese de gonadotrofinas e estas agirem nos testículos estimulando a esteroidogênese e gametogênese, quanto pode agir diretamente nos órgãos reprodutores e plasma seminal. A síntese de melatonina aumenta durante a estação reprodutiva dos caprinos e ovinos, a qual segue um padrão sazonal anual regulada pelo fotoperíodo. Apesar do volume seminal, da qualidade seminal e da concentração de testosterona serem maiores na estação reprodutiva (final do verão e outono), os menores valores destes parâmetros nas outras épocas do ano não são responsáveis por mudanças na qualidade e quantidade do sêmen que possam prejudicar a fertilização. No entanto, o conhecimento destas variações sazonais auxilia nas tomadas de decisões zootécnicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p.173-179, 2012.

AGAWAL, A.; PROBAKARAN, A. S. Mechanism, measurements, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.43, p.963–974, 2005.

AGUIRRE, V.; ORIHUELA, A.; VÁZQUEZ, R. Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). **Tropical Animal Health and Production**, v.39, p.271–277, 2007.

AHMAD, N.; NOAKES, D. E. Seasonal variations in the semen quality of young british goats. **British Veterinary Journal**, v.152, p.225-236, 1996.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; SHABANOWITZ, R. B. Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases binding to an egg-membrane substrate. **Journal of Andrology**, v.20, p.34–41, 1999.

ASHWORTH, P. J.; HARRISON, R. A.; MILLER, N. G.; PLUMMER, J. M.; WATSON, P. F. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.6, p.173–80, 1994.

AVDI, M.; BANOS, G.; STEFOS, K.; CHEMINEAU, P. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. **Theriogenology**, v.62, p.275–282, 2004.

AZAWI, O. I.; ISMAEEL, M. A. Effects of seasons on some semen parameters and bacterial contamination of Awassi ram Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.403-406, 2012.

AZERÊDO, G. A., ESPER, C. R., RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v.41, p.257–263, 2001.

BARBOSA, O. R.; TUTIDA, L.; HUBLER, M. R. N. O.; AKIMOTO, L. S.; MORAES, G. V. Influência das estações do ano nas concentrações séricas de 3,5,3' triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e testosterona (Tes) de carneiros. **Acta Scientiarum**, v.21, n.3, p.599-605, 1999.

BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHEHATA, E. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. **Small Ruminant Research**, v.66, p.209–213, 2006.

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

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

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and Characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p.461–470, 2005.

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

BENITEZ-KING, G.; ANTON-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experientia**, v.49, p.35–41, 1993.

BOGGIO, V.; CUTRERA, R.; CARBONE, S.; SCACCHI, P.; PONZO, O. J. Leptin inhibits the reproductive axis in adult male Syrian hamsters exposed to long and short photoperiod. **Reproductive Biology**, v. 13, p.203–208, 2013.

CASAO, A.; LUNA, C.; SERRANO, E. Quantification of melatonin on oxidized proteins and lipids in ram Semen in the breeding and non-breeding season. **XIII Jornadas sobre Produccion Animal**, AIDA: Zaragoza, Spain, 2009; p.723–725.

CASAO, A.; VEJA, S.; PALACÍN, I.; PÉREZ-PÉ, R.; LAVIÑA, A.; QUINTÍN, F. J.; SEVILLA, E.; ABECIA, J. A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; FORCADA, F.; MUIÑO-BLANCO, T. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in *Rasa Aragonesa* rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.425–432, 2010.

CASAO, A.; CEBRIÁN, I.; ASUMPÇÃO, M. E.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; PÉREZ-CEBRIÁN, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, n.59, p.1-9, 2010b.

CASAO, A.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal of Pineal Research**, v.48, p.39–46, 2010c.

CASAO, A.; GALLEGU, M.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in *Rasa aragonesa* ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.953–961, 2012.

CASAO, A.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of *Rasa Aragonesa* rams. **Animal Reproduction Science**, v.138, p.168–174, 2013.

CHAVES, E. M.; AGUILEA-MERLO, C.; CRUCEÑO A.; FOGAL, T.; PIEZZI, R.; SCARDAPANE, L.; DOMINGUEZ, S. Seasonal morphological variations and age-related changes of the seminal vesicle of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): an ultrastructural and

immunohistochemical study. **The Anatomical Record**, v.295, p.886–895, 2012.

CHENOWETH, P. J. Libido and mating behavior in bulls, boars and rams. A review. **Theriogenology**, v.16, p.155-177, 1981.

CLARKE, I. J.; SMITH, J. T.; CARATY, A.; GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N. Kisspetin and seasonality in sheep. **Peptides**, v.30, p.154-163, 2009.

COLOMA, M. A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIAN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. **Theriogenology**, v.73, p.900–908, 2010.

CROSS, N. L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. **Biology of Reproduction**, v.54, p.138–45, 1996.

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

DICKSON, K. A.; SANFORD, L. M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the south eastern Canadian prairies. **Small Ruminant Research**, v.56, p.189–203, 2005.

DOMÍNGUEZ, M. P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SÁNCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, v.69, p.564–573, 2008.

DU PLESSIS, S. S.; HAGENAAR, K.; LAMPIAO, F. The *in vitro* effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, v.42, p.112–116, 2010.

ESCOTT, G. M.; DA ROSA, L. A.; LOSS, E. S. Regulação hormonal do transporte de glicose e aminoácido e sua relação com as funções e o desenvolvimento das células de Sertoli: uma revisão. **Ciência em Movimento**, v.27, p.85-98, 2011/2.

ESPINO, J.; BEJARANO, I.; ORTIZ, A.; LOZANO, G. M.; GARCIA, J. F.; PARIENTE, J. A.; RODRIGUEZ, A. B. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.94, p.1915–1917, 2010.

EVANS, G.; MAXWEL, W. M. C. Artificial insemination of sheep and goats. **Butterworth Publishers**, v.53, p.25-29, 1987.

FERNANDEZ-JUAN, M.; GALLEGU, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.27, p.588–595, 2006.

FUJINOKI, M.; SUZUKI, T.; TAKAYAMA, T.; SHIBAHARA, H.; OHTAKE, H. Profiling of proteins phosphorylated or dephosphorylated during hyperactivation via activation on hamster spermatozoa. **Reproduction Medicine and Biology**, v.5, p.123–135, 2006.

FUJINOKI, M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, v.136, p.533–541, 2008.

GARCIA, J. J.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M.; ESCAMES, G.; YU, B. P.; OH, C. S.; MUÑOZ-HOYOS, A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v.408, p.297–300, 1997.

GARDNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. e HAFEZ, B. (Org.) **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 7, p. 97-110,

GRAHAM J. Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v.41, p.1151–1162, 1994.

GOLDMAN, B. D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, p.283-301, 2001.

GÜNDOĞAN, M. Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andological parameters of two Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v.67, p.312-316, 2007.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.8, p.113–117, 1963.

ITOH, M. T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v.5, p.402–408, 1999.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.93–107, 2000.

JOU, M. J.; PENG, T. I.; YU, P. Z.; JOU, S. B.; REITER, R. J.; CHEN, J. Y.; WU, H. Y.; CHEN, C. C.; HSU, L. F. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.389–403, 2007.

KAFI, M.; SAFDARIAN, M.; HASHEMI, M. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. **Small Ruminant Research**, v.53, p.133–139, 2004.

KAMP, G.; BUSSELMANN, G.; LAUTERWEIN, J. Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. **Experientia**, v.52, p.487-494, 1996.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIDIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Research**, v.37,

p.125-130, 2000.

KARAGINNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of alpine, seamen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. **Theriogenology**, v.53, p.1285-1293, 2000.

KAYA, A.; AKSOY, M.; BASPINAR, N.; YILDIZ, C.; ATAMAN, M. B. Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.211–215, 2001.

KUMAR, A.; FAROOQ, A. Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. **Life Sciences**, v.55, p.19-24, 1994.

KURCER, Z.; HEKIMOGLU, A.; ARAL, F.; BABA, F.; SAHNA, E. Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. **Fertility and Sterility**, v.93, p.1545–1549, 2010.

LEON, J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sciences**, v.75, p.765–790, 2004.

LI, L.; XU, J. N.; WONG, Y. H.; WONG, J. T. Y.; PANG, S. F.; SHIU, S. Y. W. Molecular and cellular analyses of melatonin receptor-mediated cAMP signaling in rat corpus epididymis. **Journal of Pineal Research**, v.25, p.219–228, 1998.

LI, L.; WONG, J. T. Y.; PANG, S. F.; SHIU, S. Y. W. Melatonin-induced stimulation of rat corpus epididymal epithelial cell proliferation. **Life Sciences**, v.65, p.1067–1076, 1999.

LI, X. X.; YANG, X. G.; LU, Y. Q.; LU, S. S.; ZHANG, M.; YAO, H. I.; MENG, L. J.; LU, K. H. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.299–307, 2012.

LINCOLN, G. A.; LINCOLN, C. E.; McNEILLY, A. S. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.623-633, 1990.

LINCOLN, G. A.; CLARKE, I. J. Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. **Biology of Reproduction**, v.57, p.460–467, 1997.

MARTIN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T.; ORTIZ, G. G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **Journal of Pineal Research**, v.28, p.242–248, 2000.

MARTIN, M.; MACÍAS, M.; LEÓN, J.; ESCAMES, G.; KHALDY, H.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin increases the activity of oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.34, p.348–357, 2002.

MARTIN-HILDAGO, D.; BARÓN, F. J.; BRAGADO, M. J.; CARMONA, P.; ROBINA, A.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, v.75, p.1550–1560, 2011.

MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and critical role of pineal gland and melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, p.336-347, 2001.

MALPAUX, B. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: NEILL, J. D. & KNOBIL, E. (Org.). **Physiology of Reproduction**. 3. ed. London: Elsevier, 2006. Cap. 41, p. 2231–2281.

MATSUOKA, T.; IMAI, H.; ASAKUMA, S.; KOHNO, H.; FUKUI, Y. Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. **Journal of Reproduction and Development**, v.52,

n.6, 2006.

MAXWELL, W. M. C.; GRAAF, S. P.; GHAOUI, R. E. H.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society for Reproduction and Fertility. Supplement**, v.64, p.13–38, 2007.

MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N.; OTT, R. S. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.473–475, 1985.

METZ, K. W.; BERGER, T.; CLEGG, E. D. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.34, p.691–700, 1990.

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

ODONNELL, L.; McLACHLAN, R. I.; WREFORD, N. G.; ROBERTSON, D. M. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. **Endocrinology**, v.135, p.2608-2614, 1994.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MORILLO RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Effect of cryopreservation on nitric oxide production in stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1106–1111, 2009.

PELLETIER, J.; ALMEIDA, G. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.34, p.215–226, 1987.

PELLICER-RUBIO, M. T., COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.95–105, 1998.

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

POZO, D.; REITER, R. J.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.65, p.430–442, 1997.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidant potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.935–942, 2008.

REITER, R. J. Exogenous and endogenous control of the annual reproductive cycle in the male golden hamster: participation of the pineal gland. **Journal of Experimental Zoology**, v.191, p.111–120, 1975.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.7231-7272, 2013.

RIGAU, T.; FARRÉ, M.; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**, v.56, p.801-815, 2001.

RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M. J.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; MOGAS, T.; BALLESTER, J.; PEÑA, A.; OTAEGUI, P. J.; GUINOVART, J. J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.579-591, 2002.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v.4, p.29–37, 1991.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the

diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.35, p.305–312, 1982.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J. M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.255-262, 1992.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal Pineal Research**, v.36, p.1–9, 2004.

ROSA, H. J. D.; JUNIPER, D. T.; BRYANT, M. J. Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentrations, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anestrous ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.120, p.169–176, 2000.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, p.155–171, 2003.

ROSELLI, C. E.; STORMSHAK, F.; STELLFLUG, J. N.; RESKO, J. A. Relationship of serum testosterone concentrations to mate preferences in rams. **Biology of Reproduction**, v.67, p.263-268, 2002.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v.179, p.318–319, 1957.

SANTIAGO-MORENO, J.; GÓMEZ-BRUNET, A.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; MALPAUX, B.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.416–429, 2005.

SARABIA, L.; MAURER, I.; BUSTOS-OBREGON, E. Melatonin prevents damage elicited by

organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.663–668, 2009.

SARLÓS, P.; EGERSEGI, I.; BALOGH, O.; MOLNAR, A.; CSEH, S.; RATKY, J. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. **Small Ruminant Research**, v.111, p.90–95, 2013.

SAWYER, D. E.; BROWN, D. B. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. **Reproductive Toxicology**, v.9, p.351–357, 1995.

SHANG, X. J.; LI, K.; YE, Z. Q.; CHEN, Y. G.; YO, X.; HUANG, Y. F. Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by high-performance liquid chromatography. **Archives of Andrology**, v.50, p.411–416, 2004.

SHARPE, R. M.; McKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v.125, p.769–784, 2003.

SHIU, S. Y.; LI, L.; SIU, S. W.; XI, S. C.; FONG, S. W.; PANG, S. F. Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. **Biological Signals and Receptors**, v.9, p.172–187, 2000.

SIEGEL, S. F.; FINEGOLD, D. N.; URBAN, M. D.; McVIE, R.; LEE, P. A. Premature pubarche: etiological heterogeneity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.74, p.239–247, 1992.

SILVA, C. M.; MARCÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUES, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v.51, p.172–179, 2011.

SOUZA, A. F.; LEITÃO, M. C. G.; BATISTA, A. M.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L.; GUERRA, M. M. P. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v.39, p.1166-1172, 2009.

SMITH, J. T. The role of kisspeptina and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v.43, p.75-84, 2012.

SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; PASCIU, V.; SATTA, V.; LEONI, G. G.; NAITANA, S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.310–318, 2011.

TAMME, L. A.; STILL, D. L.; ACROMITE, M. T. Hypoxia and flight performance of military instructor pilots in a flight simulator. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, v.81, p.654–659, 2010.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; LIU, X.; ROSALES-CORRAL, S. A.; CASTROVIEJO, D. A.; REITER, R. J. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evaluation in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, v.54, p.127–138, 2013.

TODINI, L.; Malfatti, A.; TERZANO, G. M.; BORGHESE, A.; PIZZILLO, M.; DEBENEDETTI, A. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. **Theriogenology**, v.67, p.627–631, 2007.

TOSINI, G.; FUKUHARA, C. The mammalian retina as a clock. **Cell and Tissue Research**, v.309, p.119-126, 2002.

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

VARGAS, A.; BUSTOS-OBREGON, E.; HARTLEY, R. Effects of hypoxia on epididymal sperm

parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. **Biological Research**, v.44, p.161–167, 2011.

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

WEBSTER, J. R.; SUTTIE, J. M.; VEENVLIET, B. A.; MANLEY, T. R.; LITTLEJOHN, R. P. Effect of melatonin implants in secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.92, p.21–31, 1991.

YÁÑIZ, J. L.; MARCO-AGUADO, M. A.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.142–149, 2010.

ZAMIRI, M. J.; KHODAEI, H. R. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.245–255, 2005.

ZAMIRI, M. J.; KHALILI, B.; JAFAROGHLI, M.; FARSHAD, A. Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. **Small Ruminant Research**, v.94, p.132–136, 2010.

Parâmetros fisiológicos de machos caprinos criados em condições de clima tropical de altitude

Physiological parameters of male goat raised under highland tropical climate conditions

Resumo: Esse trabalho avaliou durante doze meses a capacidade adaptativa e as variações dos parâmetros fisiológicos de quatro machos caprinos da raça Alpina criados em condições de clima tropical de altitude. A temperatura ambiente, a umidade relativa do ar e a temperatura do globo negro, para o cálculo do ITGU, foram coletadas em cinco momentos do dia, três vezes por semana, durante as quatro estações climáticas anuais. Quinzenalmente, durante todo o período experimental, as frequências respiratória e cardíaca e as temperaturas retal e superficial dos animais foram medidas pela manhã, além de coletas sanguíneas para dosagem hormonal (cortisol, T3 e T4) e realização do hemograma. Houve diferença entre os valores médios da temperatura superficial, da frequência respiratória, dos hormônios e de alguns parâmetros hematológicos (proteína total e monócitos) entre as estações climáticas ($P<0,05$). No entanto, não foram observadas situações de estresse térmico, com base nos parâmetros fisiológicos que ficaram dentro da normalidade e do esperado para espécie caprina. Assim, conclui-se que os machos caprinos da raça Alpina, criados de forma intensiva, mantêm a homeotermia e grande adaptabilidade às condições do clima tropical de altitude.

Palavras-chave: bioclimatologia, cortisol, estresse por calor, ITGU, parâmetros clínicos, tiroxina, triiodotironina, variáveis ambientais.

Abstract: This study evaluated twelve months the adaptive capacity and variations in physiological parameters of four Alpine male goats in a tropical climate of altitude. The ambient temperature, relative humidity and black globe temperature, to calculate the BGHI, were collected at five times of the day, three times for week, during the four annual seasons. Fortnightly, throughout the experimental period, respiratory and heart rates and rectal and surface temperatures of the animals were measured in the morning, and blood samples for hormonal dosage (cortisol, T3 and T4) and complete blood count. There was difference between the mean values of surface temperature, respiratory rate, hormones and some

hematological parameters (total protein and monocytes) between the seasons ($P < 0,05$). However, no were observed cases of heat stress, based on physiological parameters were within normal and expected for goats. Thus, it is concluded that the male goats of the Alpine, reared intensively, keep homeothermy and great adaptability to the conditions of the tropical climate of altitude.

Keywords: BGHI, bioclimatology, clinical parameters, cortisol, environmental variables, heat stress, thyroxine, triiodothyronine.

1. Introdução

Os caprinos são considerados animais rústicos e com alta capacidade de adaptação às variáveis climáticas. Porém quando são expostos a altas temperaturas ambientais, umidades do ar e radiação solar, sofrem alterações no seu comportamento fisiológico e produtivo (BRASIL et al., 2000; SILVA et al., 2005).

Na maioria das vezes, a tolerância e o grau de adaptabilidade dos animais ao estresse por calor são determinados pelas medidas fisiológicas da respiração, batimento cardíaco e temperatura corporal (SILANIKOVE, 2000; MARAI et al., 2008; PEREIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2013). No entanto, o sistema sanguíneo também poderia ser utilizado para avaliar a relação entre os animais e o estresse por calor, tendo em vista que os mecanismos de perda de calor envolvem diretamente o sangue (DELFINO et al., 2012). Dessa forma, é possível que ocorram alterações quantitativas e morfológicas nas células e no volume sanguíneo dos animais, podendo ser observadas nos valores de eritograma e leucograma (IRIADAN, 2007). Assim, sendo o sistema sanguíneo sensível às mudanças de temperatura, ele poderia ser considerado um importante indicador das respostas fisiológicas às situações de estresse (DELFINO et al., 2012), complementando os outros parâmetros fisiológicos.

Outros aspectos importantes a serem considerados quando se relacionam estresse por calor e metabolismo animal são os hormônios triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e cortisol. A atividade da glândula tireoide está diretamente relacionada ao metabólico, e este com a termogênese (COELHO et al., 2008). Dessa forma, o estresse por calor induz o organismo a reduzir a concentração dos hormônios tireoideanos com o objetivo de diminuir a taxa de calor metabólico (YOUSEF et al., 1967). Já o cortisol, tem a função de conservar o equilíbrio interno do organismo e, por isso, quando ameaçado, o organismo desenvolve uma resposta biológica de defesa, com uma hiperatividade do córtex da adrenal, aumentando

seus hormônios, a fim de restabelecer a homeostase (VASQUEZ & HERRERA, 2003). Portanto, os hormônios T3, T4 e cortisol poderiam auxiliar, indiretamente, na verificação de situações de estresse por calor.

A maioria das raças caprinas de aptidão leiteira criadas em países tropicais têm sua origem em regiões temperadas, e em um sistema de produção, a adaptação e bem estar dos animais no ambiente significa não só uma questão de sobrevivência, mas também de eficiência produtiva e reprodutiva (FAÇANHA, 2013). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar durante doze meses a capacidade adaptativa e as variações dos parâmetros fisiológicos de machos caprinos da raça Alpina, criados em condições de clima tropical de altitude.

Todos os procedimentos de manuseio foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 32/2013) e foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente.

2. Material e Métodos

2.1 Local e período de realização

Os animais foram alocados no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais, a 649 m de altitude, sob a latitude de 20°45'20"S e longitude 42°52'40" W, temperatura média anual de 20,9°C, índice médio pluviométrico anual de 1.221 mm³ e clima tropical de altitude do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), pela classificação climática de Köppen-Geiger. O período experimental foi de 12 meses (de março 2012 a março de 2013), compreendendo as quatro estações do ano (outono, inverno, primavera e verão).

2.2 Animais, sistema de criação e alimentação

Foram selecionados quatro caprinos, machos inteiros, da raça Alpina, clinicamente hígidos e com idade de $3,4 \pm 1,9$ anos. Eles permaneceram sob condições de iluminação natural e confinados em baias individuais cobertas, com área de exercício descoberta (solário) onde tinham acesso voluntário à radiação solar. Os animais receberam alimentação volumosa, composta de silagem de milho, e concentrado proteico e energético, bem como

sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria de acordo com o National Research Council – NRC (2007). Foi oferecida uma única dieta durante todo o experimento para eliminar possíveis interferências de ofertas oscilantes de alimentação nas características estudadas.

2.3 Parâmetros ambientais

Os dados climáticos de temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram obtidos por termohigrômetro digital e a temperatura de globo negro utilizando-se um termômetro de globo negro, sendo as médias obtidas em cada estação climática apresentadas na Tabela 1. Esses aparelhos foram instalados a meia altura dos animais e os dados coletados durante um ano, três vezes por semana (segunda, quarta e sexta), em cinco momentos durante o dia (7:00, 9:30, 12:00, 14:30 e 17:00). O índice para se avaliar o conforto térmico dos animais foi o índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU) (Tabela 1), calculado segundo a fórmula proposta por Buffington et al. (1981):

$$ITGU = T_{gn} + 0,36 T_{po} + 41,5$$

T_{gn} = temperatura de globo negro (°C); e T_{po} = temperatura em ponto de orvalho (°C).

2.4 Parâmetros fisiológicos dos animais

Os parâmetros fisiológicos foram aferidos e coletados dentro das baias individuais, quinzenalmente, às 7:00 da manhã.

A) Temperaturas retal e superficial, frequências respiratória e cardíaca:

A temperatura retal (°C) foi aferida com um termômetro clínico veterinário, com escala até 44°C, introduzido diretamente no reto do animal com o bulbo em contato com a mucosa retal do animal durante dois minutos. A temperatura superficial (°C) foi a média aritmética das temperaturas superficiais da costela, flanco e escroto, tomadas com um termômetro digital com infravermelho. A frequência respiratória foi obtida pela observação direta dos movimentos do flanco do animal, durante um minuto, e o resultado expresso em movimentos por minuto (mov min^{-1}). A frequência cardíaca foi medida por estetoscópio flexível (Rappaport Premium®), colocado diretamente na região torácica esquerda, à altura do arco aórtico, durante um minuto, e o resultado expresso em batimentos por minuto (bat min^{-1}).

B) Coleta de sangue para hemograma e determinação da concentração sérica de tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e cortisol:

As amostras de sangue foram coletadas após as análises dos parâmetros fisiológicos, quinzenalmente, às 7:00, por venopunção da jugular, em dois tubos vacutainers de 10 mL, sendo um contendo heparina (tubo 1) e outro sem anticoagulante (tubo 2). No tubo, foi rapidamente realizado o hemograma do animal (eritrograma e leucograma), enquanto o tubo 2 foi imediatamente centrifugado a 1500 G, por 10 minutos, em temperatura ambiente, e o soro sanguíneo armazenado em tubos de polietileno de 2 mL a -20 °C. Os ensaios para dosagem dos hormônios (ng/mL) T4, T3 e cortisol foram realizados por quimioluminescência, pela técnica imuno-enzimática, utilizando os kits comerciais Beckman Coulter® (Beckman Coulter, EUA), no aparelho Access® (Beckman Coulter, EUA), conforme as especificações do fabricante.

Tabela 1 – Médias e erros padrão da média da temperatura ambiente (°C), da umidade relativa do ar (%) e do índice de temperatura de globo negro e umidade (ITGU) nas estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG - Brasil)

Período	Temperatura Ambiente (°C)				
	Manhã		Tarde		
	7:00	9:30	12:00	14:30	17:00
Outono	16,97 ± 0,39	20,53 ± 0,39	23,80 ± 0,45	25,69 ± 0,75	23,15 ± 0,54
Inverno	13,87 ± 0,45	18,73 ± 0,48	23,66 ± 0,48	26,03 ± 0,57	24,80 ± 0,62
Primavera	19,43 ± 0,44	23,34 ± 0,46	26,37 ± 0,59	27,22 ± 0,67	26,79 ± 0,73
Verão	20,50 ± 0,20	23,88 ± 0,29	26,89 ± 0,44	28,35 ± 0,53	27,40 ± 0,60
Período	Umidade Relativa do Ar (%)				
	Manhã		Tarde		
	7:00	9:30	12:00	14:30	17:00
Outono	92 ± 0,2	87 ± 0,8	69 ± 1,4	61 ± 0,8	67 ± 1,7
Inverno	89 ± 0,4	79 ± 1,9	55 ± 1,9	44 ± 2,0	47 ± 0,7
Primavera	86 ± 1,0	68 ± 1,9	57 ± 2,3	53 ± 2,7	55 ± 3,4
Verão	90 ± 0,5	76 ± 1,2	63 ± 1,7	57 ± 2,0	59 ± 2,7
Período	ITGU				
	Manhã		Tarde		
	7:00	9:30	12:00	14:30	17:00
Outono	64 ± 0,5	69 ± 0,5	72 ± 0,6	75 ± 0,3	72 ± 0,9
Inverno	61 ± 0,6	66 ± 0,5	71 ± 0,5	73 ± 0,6	72 ± 2,5
Primavera	68 ± 0,6	72 ± 0,6	75 ± 0,7	76 ± 0,8	76 ± 1,1
Verão	69 ± 0,3	74 ± 0,4	77 ± 0,5	78 ± 0,6	78 ± 0,9

2.5 Análise Estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o Statistical Analysis System (SAS, 2002). As variáveis quantitativas foram avaliadas por análise de variância, considerando o efeito do animal, utilizando o PROC GLM, as médias foram comparadas pelo teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welsh. As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis usando o PROC NPAR1WAY. As correlações entre as variáveis quantitativas foram avaliadas pela correlação simples de Pearson, e entre as variáveis qualitativas pela correlação de Spearman (PROC CORR). Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro-padrão da média, e a significância adotada foi $\alpha = 0,05$.

3. Resultados e discussão

Os valores de temperatura ambiental ($^{\circ}\text{C}$) (Tabela 1) foram diferentes daqueles registrados em trabalhos realizados em regiões de clima tropical semiárido e mediterrânico, onde as médias, geralmente, foram superiores aos 30°C (SHINDE et al., 2002; DARCAN & GÜNEY, 2008; ROCHA et al., 2009; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2011). Considerando o intervalo de 20 a 30°C , como o que compreende os valores de temperatura ambiente da Zona de Conforto Térmico (ZCT) para caprinos (BAÊTA & SOUZA, 2010), pode-se inferir que durante o período experimental os animais não foram expostos a estresse por calor. Alguns valores da temperatura ambiente ficaram abaixo desse limite às 7:00 (outono, inverno e primavera) e às 9:00 (inverno), no entanto ficaram dentro da faixa de modesto conforto térmico (ZMCT) que é de -20 a 34°C para espécie caprina (BAÊTA & SOUZA, 2010). Assim, não houve sensação de frio ou calor pelos animais durante os períodos analisados.

A umidade relativa do ar (%) apresentou maiores valores no período da manhã e um decréscimo com o aumento da temperatura ambiente no decorrer do dia, conforme observado por Shinde et al. (2002) e Rocha et al. (2009) que ao trabalharem com caprinos leiteiros no semiárido encontraram valores médios de 90% e 30%, durante a manhã e tarde, respectivamente. Além da radiação solar e o vento, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar são os principais fatores ambientais que determinam a ocorrência de estresse por calor nos animais (MEDEIROS et al., 1998; SOUZA et al., 2008), sobretudo se estiverem elevados (NARDONE et al., 2006). Em regiões de clima quente, onde a temperatura ambiente geralmente é maior que a da superfície do corpo, a eliminação de calor corporal dos animais homeotérmicos por radiação, condução e convecção fica prejudicada, sendo o

principal processo de eliminação do excesso de calor a evaporação. No entanto, sua eficiência é prejudicada quando a umidade relativa do ar está excessiva, uma vez que a evapotranspiração é regulada pela umidade ambiental (MARAI et al., 2008).

Nesse trabalho, o aumento das temperaturas ambientais durante o dia, nas quatro estações climáticas, foi acompanhado por diminuição da umidade relativa do ar (Tabela 1). Assim, o efeito negativo no mecanismo de eliminação de calor por evaporação foi reduzido, e também, a possibilidade de estresse por calor. Isso também foi observado por Martins Júnior et al. (2007), ao trabalharem com caprinos da raça Boer no semiárido.

Buffington et al. (1981) concluíram que em ambientes onde ocorre a exposição dos animais à radiação solar, o índice de temperatura de globo e umidade (ITGU) é o mais preciso indicador de estresse por calor, permitindo avaliar o conforto térmico do ambiente em que os animais estão alojados. Observou-se que os ITGU apresentados na Tabela 1 foram maiores nos períodos de primavera e verão, principalmente no período da tarde. Os valores de ITGU ficaram abaixo daqueles registrados em regiões de clima tropical semiárido, onde nos períodos da manhã e tarde foram encontrados valores de ITGU acima de 77 e 82, respectivamente (SILVA et al., 2006; ROCHA et al., 2009; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2013). Segundo Baêta e Souza (2010), os valores de ITGU até 74 indicam uma situação de conforto térmico, de 74 a 78 uma situação de alerta, de 79 a 84 uma situação perigosa e superior a 84 uma situação de emergência. Dessa forma, os valores obtidos nesse trabalho para ITGU não indicaram uma situação de desconforto térmico, e somente houve risco à homeotermia durante o período da tarde (situação de alerta), principalmente nos períodos mais quentes do ano (primavera e verão), provavelmente devido à maior incidência de radiação solar dentro dos apriscos.

Na Tabela 2, estão apresentados os parâmetros fisiológicos dos animais. Somente na temperatura superficial e na frequência respiratória foram observadas diferenças ($P < 0,05$), com médias superiores durante as estações climáticas com maiores temperaturas ambientes. Segundo Kabuga & Agyemang (1992) e Abi Saab & Sleiman (1995), a frequência respiratória, a frequência cardíaca e, principalmente, a temperatura corporal (retal) podem indicar se o animal está passando por uma situação de estresse por calor. A influência do calor nos parâmetros fisiológicos pode levar ao aumento de 3,3% na temperatura retal e 194% na frequência respiratória (McDOWELL, 1972).

Os animais homeotérmicos têm temperaturas corporais que variam nas diferentes

partes do corpo em adaptação ao meio ambiente externo a fim de controlar e regular a fisiologia animal. No entanto, a temperatura do núcleo corporal, que na espécie caprina é de 40°C, matem-se em nível independente da variação ambiental (BAÊTA & SOUZA, 2010).

Tabela 2- Médias e erros padrão da média dos parâmetros fisiológicos de machos caprinos da raça Alpina nas diferentes estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)

Período	Parâmetro Fisiológico			
	Temperatura corporal		Frequência	
	Retal (°C)	Superficial (°C)	Respiratória (mov min ⁻¹)	Cardíaca (bat min ⁻¹)
Outono	38,09 ± 0,05 ^a	28,06 ± 0,24 ^{ab}	33,04 ± 2,72 ^{ab}	73,07 ± 2,85 ^a
Inverno	37,35 ± 0,04 ^a	26,47 ± 0,49 ^b	23,36 ± 2,04 ^b	76,91 ± 1,69 ^a
Primavera	37,94 ± 0,06 ^a	29,85 ± 0,29 ^a	23,21 ± 1,28 ^b	77,29 ± 2,23 ^a
Verão	38,05 ± 0,06 ^a	29,32 ± 0,27 ^a	38,50 ± 6,05 ^a	74,86 ± 3,65 ^a

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05).

Os animais homeotérmicos têm temperaturas corporais que variam nas diferentes partes do corpo em adaptação ao meio ambiente externo a fim de controlar e regular a fisiologia animal. No entanto, a temperatura do núcleo corporal, que na espécie caprina é de 40°C, matem-se em nível independente da variação ambiental (BAÊTA & SOUZA, 2010).

A temperatura retal média do caprino, em repouso e à sombra, é de 39,1 °C (ROBERTSHAW, 2006), e acima de 42°C é considerada um risco para a saúde e bem estar animal (BROWN-BRANDL et al., 2003; MARAI et al., 2008). Nesse trabalho, as temperaturas retais, nas quatro estações, além de não apresentarem diferenças entre si, não apresentaram indícios de estresse por calor, uma vez que estavam próximas à média preconizada, assim como demonstrado por Pereira et al. (2011) e Souza et al. (2013), em caprinos no clima tropical semiárido. Quando os animais estão em temperaturas que compõem a sua Zona de Conforto Térmico, eles mantêm praticamente constantes as temperaturas corporais, com mínimo esforço dos mecanismos termorregulatórios (BAÊTA & SOUZA, 2010). Segundo Hopkins et al. (1978), valores de temperatura retal próximos à temperatura considerada normal para a espécie podem ser considerados como índice de adaptabilidade.

Outro parâmetro importante na avaliação da dissipação do calor é a temperatura superficial (SANTOS et al., 2005). A temperatura superficial (°C) teve correlação (r= 0,65) com a temperatura ambiente (°C) e, assim, apresentou maiores valores durante a primavera (29,85 ± 0,29) e verão (29,32 ± 0,27) (P<0,05), que foram as épocas mais quentes do período experimental. Esses valores de temperatura superficial ficaram próximos aos registrados por

Silva et al. (2006) e Souza et al. (2013), que foram de 29,50 e 29,47°C, respectivamente. Nos mecanismos de eliminação do excesso de calor corporal, a evaporação pode ocorrer tanto através da superfície do corpo do animal, pela evaporação do suor liberado pelas glândulas sudoríparas, quanto através da evaporação no aparelho respiratório, ao expirar o vapor d'água juntamente com o ar (SILVA, 2000). Portanto, os maiores valores de temperatura superficial, durante os períodos mais quentes do ano, demonstram a necessidade fisiológica dos animais de eliminar o calor interno para o ambiente, aumentando o fluxo sanguíneo nos tecidos periféricos e a produção de suor pelas glândulas sudoríparas (LIGEIRO et al., 2006). Além disso, quando ocorre um aumento da vasodilatação periférica, aumenta-se, conseqüentemente, as perdas de calor sensíveis, como a radiação, condução e convecção (SILVA, 2000). Por outro lado, o menor valor de temperatura superficial (Tabela 2; $P < 0,05$) durante o inverno ($26,47 \pm 0,49$) evidencia a necessidade de maior retenção de calor corporal nessa estação, que apresenta menores temperaturas ambientais e valores de umidade, o que favorece a perda de calor para o meio externo, nas formas sensíveis e latentes.

No entanto, no caso dos caprinos, por possuírem um menor número de glândulas sudoríparas em relação aos bovinos, o mecanismo de evaporação pela respiração é mais utilizado que a sudorese para dissipação do calor (ARRUDA et al., 1984). Em condições normais, 20% das perdas de calor, nos ovinos, são realizadas pela respiração, e esse valor aumenta para 60% quando os animais são submetidos a temperaturas ambientais acima de 35°C (QUESADA et al., 2001), devido à queda da eficiência das perdas de calor sensível por diminuição do gradiente de temperatura entre a pele do animal e o ambiente (SILVA et al., 2006). Os valores considerados normais de frequência respiratória para a espécie caprina são de 12 a 25 movimentos respiratórios/minuto (KOLB, 1984; REECE, 2006). Assim, quando os ruminantes apresentam frequência de 40-60, 60-80 ou 80-120 movimentos/minuto, considera-se que estejam passando por uma situação de estresse baixo, médio-alto ou alto, respectivamente (SILANIKOVE, 2000).

Os dados apresentados na Tabela 2, mostram que as frequências respiratórias (mov min^{-1}) dos animais não atingiram a faixa indicativa de estresse, sendo maiores somente no verão ($38,50 \pm 6,05$) e outono ($33,04 \pm 2,72$) ($P < 0,05$), sendo próximas às observadas por Souza et al. (2013) e inferiores às verificadas por Pereira et al. (2011), de 37,18 e 77,62, respectivamente. Além disso, durante as estações de verão e outono, foi observado que os

valores de umidade estavam maiores (Tabela 1), o que dificulta a perda de calor através da pele dos animais, levando esses a realizarem mais o processo de evaporação pela respiração. Segundo Buffington et al. (1981), a taxa de respiração está diretamente relacionada ao ITGU, podendo ser observado nesse trabalho, que um possível desconforto ambiental (ITGU na Tabela 1), principalmente no verão, pode ter levado ao aumento da frequência respiratória (Tabela 2). Dessa forma, pode-se inferir que a frequência respiratória dos animais variou conforme a temperatura ambiental com objetivo de eliminar o calor interno excessivo adquirido durante as estações mais quentes do ano e alcançar a homeotermia, fato também observado por Martins Junior (2007). Segundo Baccari Junior (1986), animais como os desse experimento, que apresentam menor aumento de temperatura retal e menor frequência respiratória, quando submetidos a altas temperaturas são considerados mais tolerantes ao calor.

Os valores de frequência cardíaca ficaram dentro dos limites preconizados para a espécie caprina (70 a 80 batimentos/minuto) (ERICKSON & DETWEILER, 2006) e não apresentaram diferenças entre as estações climáticas, semelhante ao verificado por Souza et al. (2008) e Salles (2010).

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios (ng/mL) do cortisol, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) dos animais durante as quatro estações do ano.

Tabela 3 - Médias e erros padrão da média das concentrações séricas dos hormônios cortisol, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) de machos caprinos da raça Alpina nas diferentes estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)

Período	Parâmetro Fisiológico		
	Cortisol (ng/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (ng/mL)
Outono	17,57 ± 1,09 ^a	0,58 ± 0,02 ^c	61,61 ± 2,62 ^b
Inverno	13,11 ± 1,05 ^b	0,72 ± 0,03 ^a	81,76 ± 4,23 ^a
Primavera	14,40 ± 1,23 ^{ab}	0,65 ± 0,02 ^b	74,73 ± 2,54 ^a
Verão	17,20 ± 1,18 ^a	0,56 ± 0,01 ^c	61,57 ± 2,16 ^b

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05).

Os valores do cortisol foram maiores durante o verão, o outono e a primavera (P<0,05) que foram as estações maiores valores de temperatura, umidade (Tabela 1) e frequências respiratórias (Tabela 2), porém, os valores registrados estão dentro do intervalo esperado para os pequenos ruminantes, que vai de 14 a 31 ng/mL (RADOSTITS et al., 2002). Em situação de estresse, uma das primeiras reações fisiológicas dos animais é a ativação do

eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, liberando, na corrente sanguínea, glicocorticoides, sobretudo o cortisol, que têm como função principal regular e, ou, adaptar o metabolismo interno (VASQUEZ & HERRERA, 2003; EILER, 2006). No estresse agudo, ocorre aumento das concentrações de cortisol sérico e, assim, aumento da degradação dos tecidos de reserva, a fim de disponibilizar maior concentração de glicose para o coração, sistema nervoso e músculo esquelético. Por outro lado, no estresse crônico, ocorre redução da atividade do eixo para diminuir a mobilização excessiva dos tecidos e o efeito negativo sobre a produção e reprodução animal (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

Os valores das concentrações séricas dos hormônios T4 e T3 também apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre as estações, porém ficaram próximos (T4) ou abaixo (T3) dos valores médios esperados para pequenos ruminantes, que é de 79 ng/mL e 0,98 ng/mL, respectivamente (ANDERSON et al., 1988). No verão, quando as temperaturas ambientais estão mais altas, pode ser observado redução dos valores hormonais, enquanto no inverno foi registrado aumento desses valores ($P < 0,05$). Essa alteração sanguínea conforme as estações climáticas também foi verificada por outros autores trabalhando com caprinos (PRAKASH & RATHORE, 1991), ovinos (TAHA et al., 2000; ZAMIRI & KHODAEI, 2005) e bovinos (RASOOLI et al., 2004). T3 e T4 são caracterizados por sua ação calorigênica e controlam a termogênese dos animais (EILER, 2006; COELHO et al., 2008) a fim de manter a homeostase e temperatura interna constante. A resposta hormonal em uma possível situação de estresse por calor é a redução na síntese dos hormônios tireoidianos e, assim, a diminuição do metabolismo e da produção do calor interno (YOUSEF et al., 1967; EILER, 2006). Além disso, é possível que a exposição ao calor possa influenciar diretamente no eixo hipotalâmico-pituitário e permitir a redução na secreção do TSH (TAL & SULMAN, 1973).

No entanto, os valores de frequência respiratória e outros parâmetros fisiológicos (Tabela 2), dentro dos limites pré-estabelecidos e esperados para espécie caprina, mostram que, apesar do aumento do hormônio indicador de estresse (cortisol) e das variações anuais dos hormônios termogênicos (T3 e T4) nas estações climáticas, os animais conseguiram dissipar o calor interno excessivo e alcançar a homeostase. Da mesma forma, o aumento de T3 e T4 no inverno para aumentar e manter a temperatura corporal interna dentro dos limites fisiológicos foi eficiente.

Os valores de hematócrito, proteína total sanguínea e leucograma, observados nos machos caprinos da raça Alpina, nas diferentes estações do ano, no clima tropical de

altitude, podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias e erros padrão do hematócrito, proteína total e leucograma de machos caprinos da raça Alpina nas diferentes estações do ano no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil)

Período	Parâmetro Fisiológico		
	Hematócrito (%)	Proteína Total (g/dL)	Leucócitos (mm ³)
Outono	31,04 ± 0,94 ^a	7,96 ± 0,09 ^{ab}	6.189 ± 201 ^a
Inverno	31,25 ± 1,15 ^a	7,81 ± 0,09 ^b	6.621 ± 577 ^a
Primavera	31,75 ± 0,62 ^a	8,20 ± 0,12 ^a	6.693 ± 346 ^a
Verão	30,85 ± 1,00 ^a	7,98 ± 0,12 ^{ab}	5.771 ± 270 ^a

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05).

Tabela 4 – Continuação

Período	Parâmetro Fisiológico				
	Basófilos (%)	Eosinófilos (%)	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)
Outono	0	4,39 ± 0,87 ^a	47,19 ± 2,09 ^a	43,81 ± 1,92 ^a	3,31 ± 0,40 ^b
Inverno	0	5,75 ± 1,46 ^a	44,08 ± 2,08 ^a	44,17 ± 1,95 ^a	5,92 ± 0,95 ^a
Primavera	0	4,18 ± 0,73 ^a	46,04 ± 1,61 ^a	45,50 ± 1,69 ^a	3,96 ± 0,37 ^a
Verão	0	4,21 ± 0,82 ^a	50,04 ± 2,33 ^a	41,58 ± 1,92 ^a	3,29 ± 0,43 ^b

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05).

A concentração de proteína total do plasma sanguíneo foi maior que o valor de referência (6,5-7,5 g/dL; REECE e SWENSON, 2006), principalmente, na primavera (P<0,05), que foi um dos períodos de temperatura ambiente elevada (Tabela 1). Isso pode ter ocasionado maior estado de desidratação e, assim, maior concentração plasmática proteica.

Os valores obtidos, nesse trabalho, para hematócrito estão de acordo com os valores de referência, que são de 27 a 35% para a espécie caprina (BHARGAVA, 1980). O hematócrito é a porcentagem de eritrócitos em relação ao volume total de sangue (DELFINO et al., 2012) e pode ser muito importante no diagnóstico de estresse por calor. Além da proteína total plasmática, o hematócrito pode aumentar na desidratação, devido à perda de líquidos por meio dos mecanismos evaporativos de dissipação de calor (respiração e sudorese) (LEE et al., 1974; SOUZA et al. 2011). Nesse trabalho, o hematócrito apresentou correlação com o cortisol (r= 0,26) e, portanto, poderia ser considerado como parâmetro para indicar uma situação de estresse por calor.

Na determinação do valor do hematócrito, leva-se em consideração não só o volume da hemácia, mas também o seu número e, portanto, um acréscimo no número de hemácias pode levar, também, ao aumento do hematócrito. Em uma situação de estresse por calor prolongado, a evaporação pulmonar acontece com maior intensidade e essa hiperventilação

crônica pode diminuir a tensão de oxigênio no organismo, estimulando a eritropoiese na medula óssea (REECE e SWENSON, 2006). Assim, em uma situação de estresse por calor crônico, o número de hemácias pode aumentar e, conseqüentemente, o hematócrito. Por outro lado, alguns autores acreditam que o hematócrito pode diminuir em uma situação de estresse por calor prolongado devido, à redução do número de hemácias, em função da menor ingestão de alimento (HERZ e STEINHOUT, 1978; BEZERRA et al., 2008; SOUZA et al., 2008).

Os valores do leucograma, segundo Pugh (2004) e Reece e Swenson (2006), variam de: 4.000 a 13.000 leucócitos/mm³; 0 a 1% basófilos; 1 a 5% eosinófilos; 0 a 2% bastonetes; 30 a 55% segmentados; 50 a 69% linfócitos; e 0 a 4% monócitos. Souza et al. (2008), trabalhando com caprinos de diferentes grupos genéticos, no semi-árido paraibano, encontraram valores superiores para os leucócitos e linfócitos, e menores para os segmentados e monócitos. Segundo Broucek et al. (2009), em bovinos com estresse por calor, ocorre aumento dos neutrófilos (bastonetes e segmentados) e decréscimo dos eosinófilos. No entanto, nesse trabalho, os valores médios obtidos nas diferentes estações do ano ficaram dentro da faixa de normalidade, mesmo com os bastonetes (%) e monócitos (%) apresentando diferença entre as estações ($P < 0,05$).

A adaptação às diversas condições estressantes do ambiente pode levar a alterações nos padrões hematológicos e hormonais dos animais (YOUSEF et al., 1967; IRIDIAN, 2007; DELFINO et al., 2012), os quais poderiam ser utilizados, assim como as frequências respiratória e cardíaca, e a temperatura retal, como indicadores de estresse. A observação de alterações drásticas nesses parâmetros pode mostrar desequilíbrio fisiológico e menor eficiência adaptativa (BROUCEK et al., 2009) dos animais.

Dessa forma, não foram observadas, durante esse experimento, indicações fisiológicas de estresse térmico pelos animais, uma vez que os mecanismos fisiológicos que regulam a temperatura corporal foram eficientes durante o período experimental e permitiram o equilíbrio interno, observado principalmente, pelas temperaturas retal e superficial e frequências respiratória e cardíaca. Apesar de a raça Alpina ter origem em regiões de clima temperado, os dados observados nesse trabalho, utilizando caprinos em sistema intensivo, demonstraram que houve uma adaptação fisiológica, e, ou, estrutural ao clima tropical de altitude. No entanto, em situações de pastejo, os parâmetros fisiológicos podem apresentar diferenças, pois outras variáveis climáticas como, a insolação direta,

sombreamento e vento, podem alterar a fisiologia e a homeostasia dos animais.

5. Conclusão

Nas condições desse experimento, concluiu-se que, machos da raça Alpina mantiveram a homeostase, durante as quatro estações do ano, apresentando seus parâmetros fisiológicos dentro da normalidade e do esperado para espécie caprina, demonstrando assim, estarem fisiologicamente adaptados ao clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil).

6. Referências Bibliográficas

ABI SAAB, S.; SLEIMAN, F. T. Physiological responses to stress of filial crosses compared to local Awassi sheep. **Small Ruminant Research**, v.16, p.55-59, 1995.

ANDERSON, R. R.; NIXON, D. A.; AKASHA, M. A. Total and free thyroxine and triiodothyronine in blood serum of mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.89(3), p.401-404, 1988.

ARRUDA, F. A. V.; FIGUEIREDO, E. A. P.; PANT, K. P. Variação da temperatura corporal de caprinos e ovinos sem lã em Sobral. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.915-919, 1984.

BACCARI JÚNIOR, F. Métodos e técnicas de avaliação de adaptabilidade às condições tropicais In: Simpósio Internacional de Bioclimatologia Animal nos Trópicos: Pequenos e Grandes Ruminantes, 1., 1986, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: [s.n.], p. 9-17, 1986.

BAÊTA, F. C.; SOUZA, C. F. **Ambiência em edificações rurais e conforto térmico**. 2. ed. Viscose: UFV, 2010. 246 p.

BEZERRA, L. R. ; FERREIRA, A. F.; CAMBOIM, E. K. A.; JUSTINIANO, S. V.; MACHADO, P. C. R.; GOMES, B. B. Perfil hematológico de cabras clinicamente sadias criadas no cariri paraibano. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.955-960, 2008.

BHARGAVA, S. C. Hematological studies in goat. **Indian Veterinary Journal**, v.57, n.6, p.485-486, 1980.

BRASIL, L. H. A.; WECHESLER, F. S.; BACCARI JR., F.; GONÇALVES, H. C.; BONASSI, I. A. Efeitos do estresse térmico sobre a produção, composição química do leite e respostas termorreguladoras de cabras da raça Alpina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.6, p.1632-1641, 2000.

BROUCEK, J.; KISAC, P.; UHRINCAT, M. Effect of hot temperatures on the hematological parameters, health and performance of calves. **International Journal of Biometeorology**, v.15, p.201-208, 2009.

BROWN-BRANDL, T. M.; NIENABER, J. A.; EIGENBERG, R. A.; HAHN, G. L.; CAMPOS, O. F.; SILVA, J. F. C.; MILAGRES, J. C.; SAMPAIO, A. O. Comportamento de ovinos submetido a três níveis de temperatura ambiente. **Revista Ceres**, v.20, p.231-242, 2003.

BUFFINGTON, D. E.; COLLAZO-AROCHO, A.; CANTON, G.H.; PITT, D. Black Globe-Humidity index (BGHI) as Comfort Equation for Dairy Cows. **Transactions of the ASAE**, v.24, n.3, p.711-714, 1981.

COELHO, L. A.; SASA, A.; BICUDO, S. D.; BALIEIRO, J. C. C. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em bodes submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1338-1345, 2008.

DARCAN, N.; GÜNEY, O. Alleviation of climatic stress of dairy goats in Mediterranean climate. **Small Ruminant Research**, v.74, p.212–215, 2008.

DELFINO, L. J. B.; SOUZA, B. B.; SILVA, R. M. N.; SILVA, W. W. Efeito do estresse calórico sobre o eritrograma de ruminantes. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, v.8, n.2, p.1-7, 2012.

EILER, H. Glândulas endócrinas. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos animais**

domésticos. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 37, p.577-622.

ERICKSON, H. H.; DETWEILER, D. K. Regulação cardíaca. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 16, p.240-251.

FAÇANHA, D. A. E.; CHAVES, D. F.; MORAIS, J. H. G.; VASCONCELOS, A. M.; COSTA, W. P.; GUILHERMINO, M. M.; Tendências metodológicas para avaliação da adaptabilidade ao ambiente tropical. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, n.1, p.91-103, 2013.

HERZ, A.; STEINHAUT, D. The reaction of domestic animal to heat stress. **Animal Research Development**, n.7, p.7-38, 1978.

HOPKINS, P. S.; KNIGHTS, G.; LE FEUVRE, A. S. Studies of the environmental physiology of Tropical Merinos. **Australian Journal of Agricultural Research**, 29:161-171, 1978.

IRIADAN, M. Variation in certain hematological and biochemical parameters during the peri-partum period in kilis does. **Small Ruminant Research**, v.73, p.54-57, 2007.

KABUGA, J. D.; AGYEMANG, K. An investigation into the heat stress suffered by imported Holstein Friesian cows in the humid tropics. **Bulletin of Animal Production in Africa**, v.40, p.245-252, 1992.

LEE, J. A.; ROUSSEL, J. D.; BEATTY, J. F. Effect of temperature season on bovine adrenal cortical function, blood cell profile, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.1, p.104-108, 1974.

LIGEIRO, E. C.; MAIA, A. S. C.; SILVA, R. G.; LOUREIRO, C. M. B. Perda de calor por evaporação cutânea associada às características morfológicas do pelame de cabras leiteiras criadas em ambiente tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.544-549, 2006.

MARAI, I. F. M.; EL-DARAWANY, A. A.; FADIEL, A.; ABDEL-HAFEZ, M. A. M. Reproductive

performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep - A review. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.8, p.209-234, 2008.

MARTINS JÚNIOR, L. M.; COSTA, A. P. R.; RIBEIRO, D. M. M.; TURCO, S. H. N.; MURATORI, M. C. S. Respostas fisiológicas de caprinos Bôer e Anglo-Nubiana em condições climáticas de Meio-Norte do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 2, p. 1-7, 2007.

McCDOWELL, R. G. **Improvement of livestock production in warm climates**. San Francisco: Freeman, 1972. 711 p.

MEDEIROS, L. F.; SCHERER, P. O.; VIEIRA, D. H.; SOUSA, J. C. D. Frequência respiratória e cardíaca de caprinos de diferentes raças e idades. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35, 1998, Botucatu, **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U. Climatic effects on productive traits in livestock. **Veterinary Research Communications**, v.30 (Supl.1), p.75– 81, 2006.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academy Press, 2007. 362p.

PEREIRA, G. M.; SOUZA, B. B.; SILVA, A. M. A.; ROBERTO, J. V. B.; SILVA, C. M. B. A. Avaliação do comportamento fisiológico de caprinos da raça Saanen no semiárido paraibano. **Revista Verde**, v.6, n.1, p.83 – 88, 2011.

PRAKASH, P.; RATHORE, V. S. Seasonal variations in blood serum profiles of triiodothyronins and thyroxine in goat. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v.61, p.1311-1312, 1991.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 528p.

QUESADA, M.; McMANUS, C.; COUTO, F. A. D'A. Tolerância ao calor de duas raças de ovinos deslanados no distrito federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30 (Supl.1), n.3, p.1021-1026, 2001.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Apêndices, 882-904p.

RASOOLI, A.; NOURI, M.; KHADJEH, G. H.; RASEKH, A. The influences of seasonal variations on thyroide activity and some biochemical parameters of cattle. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.5, n.2, ser. n. 10 1283, 2004.

REECE, W. O.; SWENSON, M. J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara 2006. Cap. 3, p.24-48.

REECE, W. O. Respiração nos mamíferos. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 7, p.103-134.

ROBERTSHAW, D. Regulação da temperatura e o ambiente térmico. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 55, p.897-908.

ROCHA, R. R. C.; COSTA, A. P. R.; AZEVEDO, D. M. M. R.; NASCIMENTO, H. T. S.; CARDOSO, F. S.; MURATORI, M. C. S.; LOPES, J. B. Adaptabilidade climática de caprinos Saanen e Azul no Meio-Norte do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1165-1172, 2009.

SALLES, M. G. F. **Parâmetros fisiológicos e reprodutivos de machos caprinos Saanen criados em clima tropical**. 2010. 159p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. 2010.

SANTOS, F. C. B.; SOUZA, B. B; ALFARO, C. E. P.; CÉZAR, M. F.; PIMENTA FILHO, E. C.; ACOSTA, A. A. A.; SANTOS, J. R. S. Adaptabilidade de caprinos exóticos e naturalizados ao clima semiárido do nordeste brasileiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.142-149, 2005.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5. ed. São Paulo: Santos, 2002. 546p.

SHINDE, A. K.; RAGHAVENDRA BHATTA; SANKHYAN, S. K.; VERMA, D. L. Effect of season on thermoregulatory responses and energy expenditure of goats on semi-arid range in India. **Journal of Agricultural Science**, v.139, p.87–93, 2002.

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

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. 286p.

SILVA, G. A.; SOUZA, B. B.; ALFARO, C. E. P.; AZEVEDO, S. A.; NETO, J. A; SILVA, E. M. N.; SILVA, A. K. B. Efeito das Épocas do Ano e de Turno Sobre os Parâmetros Fisiológicos e Seminais de Caprinos no Semiárido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.01, n.1, p.7-14, 2005.

SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; SILVA, G. A.; CEZAR, M. F.; SOUZA, W. H.; BENÍCIO, T. M. A.; FREITAS, M. M. S. Avaliação da adaptabilidade de caprinos exóticos e nativos no semiárido paraibano. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.3, p.516-521, 2006.

SILVA, C. M. B. A.; SOUZA, B. B.; BRANDÃO, P. A.; MARINHO, P. V. T.; BENÍCIO, T. M. A. B. Efeito das condições climáticas do semiárido sobre o comportamento fisiológico de caprinos mestiços f1 Saanen x Boer. **Revista Caatinga**, v.24, n.4, p.195-199, 2011.

SOUZA, B. B.; SOUZA, E. D.; SILVA, R. M. N.; CEZAR, M. F.; SANTOS, J. R. S.; SILVA, G. A. Respostas fisiológicas de caprinos de diferentes grupos genéticos no semiárido paraibano. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.1, p.314-320, 2008.

SOUZA, B. B.; ASSIS, D.Y. C.; NETO, F. L. S.; ROBERTO, J. V. B.; MARQUES, B. A. A. Efeito do

clima e da dieta sobre os parâmetros fisiológicos e hematológicos de cabras da raça Saanen em confinamento no sertão paraibano. **Revista Verde**, v.6, n.1, p.77, 2011.

SOUZA, B. B.; SILVA, A. L. N.; PEREIRA FILHO, J. M.; BATISTA, N. L.; FURTADO, D. A. Respostas fisiológicas de caprinos terminados em pastagem nativa no semiárido paraibano. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.1, n.2, p.37-43, 2013.

TAHA, T. A.; ABDEL-GAWAD, E. I.; AYOUB, M. A. Monthly variations in some reproductive parameters of barki and awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions. 1. Semen characteristics and hormonal levels. **Animal Science**, v.71, p.317–324, 2000.

TAL, E.; SULMAN, F. G. Rat thyrotrophin levels during heat stress and stimulation by TRH. **Journal of Endocrinology**, v.57, p.181-182, 1973.

VASQUEZ, E. F. A.; HERRERA, A. P. N. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p.743-747, 2003.

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

ZAMIRI, M. J.; KHODAEI, H. R. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.245-255, 2005.

Variação sazonal na atividade reprodutiva de caprinos criados em condições de clima tropical de altitude

Season variation on reproductive activity of goat raised under highland tropical climate conditions

Resumo: Esse trabalho analisou durante doze meses as variações anuais da biometria testicular, da concentração dos hormônios sexuais, dos parâmetros do sêmen fresco e descongelado, e do comportamento sexual de machos caprinos da raça Alpina, criados em condições de clima tropical de altitude. A temperatura ambiente máxima e mínima, e a luminosidade foram registradas diariamente, enquanto as avaliações seminais, hormonais e comportamentais foram realizadas quinzenalmente. Houve diferença ($P < 0,05$) entre os valores médios mensais do perímetro escrotal, volume testicular, volume e concentração do sêmen fresco, vigor espermático do sêmen descongelado, níveis séricos de testosterona, FSH e LH e alguns comportamentos sexuais de cortejo e cópula. As variações anuais dos parâmetros testicular e seminal podem ter sido determinadas pelas estações reprodutiva e não-reprodutiva, principalmente, pela frequência de utilização dos machos reprodutores. Os parâmetros seminais durante todo o período experimental ficaram próximos ou superiores aos valores recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), não sendo observadas diferenças durante o ano na motilidade progressiva e funcionalidade da membrana (teste hiposmótico) para o sêmen descongelado ($P > 0,05$), permitindo inferir que o ambiente não levou a alterações nas membranas plasmáticas espermáticas e diminuição da qualidade seminal. Assim, as variações que ocorreram na quantidade e qualidade seminal, no perfil hormonal e em alguns comportamentos sexuais, não devem ser consideradas como um impedimento para utilização dos machos caprinos da raça Alpina em regiões de clima tropical de altitude durante todo o ano. Essas variações estão relacionadas à frequência de cobertura das fêmeas e, ou, influência do fotoperíodo, e não levam a alterações no sêmen que possam comprometer a capacidade de fertilização desses animais.

Palavras-chave: bioclimatologia, comportamento sexual, gonadotrofinas, qualidade seminal, testosterona.

Abstract: This study analyzed twelve months the annual variations of the testis, the concentration of sex hormones, the parameters of fresh and thawed semen, and sexual behavior of Alpine male goats raised in tropical climate of altitude. The maximum and minimum temperature and luminosity were recorded daily, while seminal, hormonal and behavioral assessments were carried out fortnightly. There was difference ($P < 0,05$) between the monthly average scrotal circumference, testicular volume, volume and concentration of fresh semen, sperm vigor of the thawed semen, serum levels of testosterone, FSH and LH and some sexual behaviors of courtship and copulation. Annual variations in testicular and seminal parameters may have been determined by the reproductive and non-reproductive seasons, mainly by the frequency of use of breeding males. The seminal parameters throughout the experimental period were near or above those values recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA), and no differences were observed during the progressive motility and functionality of the membrane (hyposmotic test) for thawed semen ($P > 0,05$), it can be inferred that the environment has not led to changes in sperm plasma membranes and decreased semen quality. Thus, the changes that occurred in the quantity and quality sperm, in the hormonal profile and some sexual behaviors, should not be regarded as an impediment to the use of Alpine male goats in tropical altitude climate throughout the year. These variations are related to the frequency of coverage of females, or influence of photoperiod, and not lead to changes in the semen that may compromise the fertilizing capacity of these animals.

Keywords: bioclimatology, gonadotropins, semen quality, sexual behavior, testosterone.

1. Introdução

A sazonalidade reprodutiva é um mecanismo fisiológico, utilizado por algumas espécies, que permite a manifestação dos períodos aptos à reprodução somente em determinados momentos do ano, com o objetivo de terem suas crias em épocas com melhor disponibilidade de alimento e temperatura (GOLDMAN, 2001). Esse fenômeno é influenciado, principalmente, pelas variações anuais do fotoperíodo, as quais aumentam proporcionalmente à latitude, permitindo que as estações reprodutivas e não-reprodutivas sejam bem definidas entre as espécies sazonais. No entanto, nas regiões tropicais, outros fatores ambientais, tais como temperatura ambiente, umidade relativa do ar, distribuição de

chuvas e nutrição parecem, também, exercer efeitos na fisiologia reprodutiva dos animais sazonais (ROSA & BRYANT, 2003).

As características sazonais de reprodução se expressam com maior intensidade nas fêmeas, as quais apresentam, de forma bem definida, um período em que estão aptas à reprodução (estação reprodutiva) e outro não (estação não-reprodutiva ou contra-estação) (GOODMAN & INSKEEP, 2006), enquanto a espermatogênese e atividade sexual são ininterruptas nos machos (PELLETIER & ALMEIDA, 1987). Dentre as principais características em que podem ser observadas alterações sazonais nos machos, encontram-se as mudanças no comportamento sexual (libido), nas dimensões testiculares, na espermatogênese e na secreção hormonal (KAFI et al., 2004; ZAMIRI et al. 2005).

Analisar a influência das variações ambientais nas raças de caprinos de aptidão leiteira, como Alpina, Saanem e Anglo-Nubiana, é necessário uma vez que essas são as principais raças com origem em regiões temperadas que são exploradas em regiões tropicais. Em relação aos machos caprinos, o maior conhecimento de suas variações reprodutivas, durante o ano, pode auxiliar nas práticas zootécnicas e nas tomadas de decisão nos criadouros. Assim, pode-se definir o período do ano em que o sêmen apresenta os melhores parâmetros para a sua criopreservação (ZAMIRI et al., 2010), pode-se aumentar os índices reprodutivos, com a adequação da proporção macho:fêmea e, também, permitir diminuição dos custos de manutenção, com a redução do número de reprodutores da propriedade (ROCA et al., 1992; BARKAWI et al., 2006). Além disso, os machos que apresentarem melhor comportamento sexual, em condições de temperatura elevada, podem ser selecionados para o desenvolvimento de raças adaptadas ao clima tropical (PACHECO & QUIRINO, 2010).

O objetivo desse trabalho foi analisar as variações anuais da biometria testicular, dos parâmetros seminais, da concentração de testosterona, FSH e LH, e do comportamento sexual de machos caprinos da raça Alpina, criados em condições de clima tropical de altitude.

Todos os procedimentos de manuseio foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 32/2013) e foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente.

2. Material e métodos

2.1 Local e período de realização

O experimento foi realizado no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no município de Viçosa-MG (20°45'20"S e longitude 42°52'40" W). O clima da região é o tropical de altitude do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), pela classificação climática de Köppen-Geiger, com temperatura média de 20,9 °C e índice pluviométrico de 1.221 mm³/ano. O período experimental foi de 12 meses (de março 2012 a fevereiro de 2013), compreendendo as estações de outono (20 de março a 20 de junho), inverno (21 de junho a 21 de setembro), primavera (22 de setembro a 20 de dezembro) e verão (21 de dezembro a 19 de março).

2.2 Animais, sistema de criação e alimentação

Foram utilizados quatro caprinos machos inteiros da raça Alpina, clinicamente hígidos e com idade de 3,4 ± 1,9 anos. Eles permaneceram sob iluminação natural, em baias individuais, sendo utilizados nas coberturas das fêmeas em estro do rebanho durante a estação monta. Os animais receberam durante todo o período experimental, uma dieta composta por silagem de milho e concentrado proteico e energético, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria de acordo com o National Research Council – NRC (2007).

2.3 Variáveis ambientais

Os valores referentes à luminosidade da região onde foi realizado o experimento foram adquiridos no Observatório Nacional (ON, 2013), e as temperaturas ambientais (°C) máxima e mínima foram aferidas todos os dias, sempre às 17:00, por meio de um termohigrômetro digital de máxima e mínima (Incoterm®), instalado à meia altura dos mesmos dos animais (Figura 1).

2.4 Determinação da concentração sérica de testosterona, FSH e LH

As amostras de sangue foram coletadas quinzenalmente, às 7:00, por venopunção da jugular, em tubos de 10 mL sem anticoagulante, os quais foram imediatamente centrifugados a 1500 G, durante 10 minutos, e os soros sanguíneos armazenados a -20 °C.

Os ensaios para dosagem dos hormônios testosterona (ng/mL), FSH (mUI/mL) e LH ((mUI/mL) foram realizados por quimioluminescência, pela técnica imuno-enzimática, utilizando os kits comerciais Beckman Coulter® (Beckman Coulter, EUA), no aparelho Access® (Beckman Coulter, EUA), conforme as especificações do fabricante.

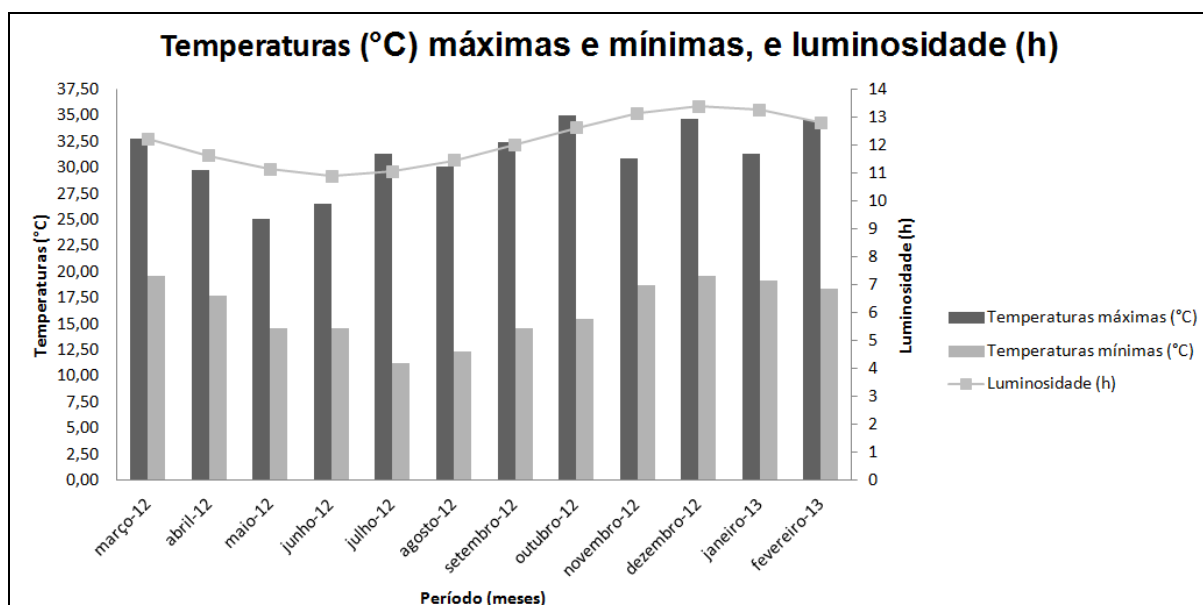


Figura 1: variações mensais das temperaturas (°C) máximas e mínimas, e luminosidade (h) durante o período experimental (2012-2013) na região de Viçosa, MG – Brasil (20°45'20"S e 42°52'40"W).

2.5 Perímetro escrotal e volume testicular

Os testículos dos bodes foram mensurados, quinzenalmente, durante todo o período experimental, com os animais em estação, antes das coletas de sêmen. Os testículos foram tracionados suavemente para a porção distal da bolsa escrotal e, em seguida, com uma fita métrica flexível, na região mais larga longitudinalmente, foi aferido o perímetro escrotal (cm). Nenhuma correção foi feita para a espessura da pele escrotal. Com auxílio de um paquímetro, foram mensuradas (cm) a largura (sentido médio-lateral) e o comprimento (sentido dorso-ventral) de cada testículo, excluindo a cabeça, o corpo e a cauda do epidídimo. Os volumes testiculares foram obtidos utilizando a fórmula $VT = 0,5236(CT)(LT)^2$, de Bailey et al. (1998), em que VT= volume testicular, CT= comprimento testicular e LT= largura testicular.

2.6 Comportamento sexual na cópula

O comportamento sexual foi observado durante a coleta de sêmen, sendo analisadas as variáveis: tempo de reação (período entre a introdução do bode na sala de coleta com

observação da fêmea em estro e a ejaculação na vagina artificial); ato de cheirar e lambear a região anogenital da fêmea; reflexo de Flehmen; ato de bater e raspar o casco no chão; acotovelamento e escoiceamento da fêmea; emissão de som característico; exteriorização e retração da língua; ereção/exposição do pênis; reflexo de monta (contração seguidas da região posterior do macho com ou sem exposição do pênis); número de falsas montas; e interesse sexual após a monta (serviço). Um serviço foi definido como uma monta acompanhada por introdução do pênis na vagina artificial e ejaculação, caracterizada por um impulso pélvico com a cabeça jogada para trás, seguido ou não por um curto período durante o qual o bode não mostrou interesse pela fêmea (período de refratariedade).

2.7 Coletas e avaliação seminal

As coletas de sêmen dos animais foram realizadas quinzenalmente, sempre no período da manhã, durante todo o período experimental. Em um tronco de contenção para espécie caprina, fêmeas em estro natural ou induzido, durante a estação não-reprodutiva, foram utilizadas como manequins. O tipo de vagina artificial e o método de coleta de sêmen foram seguidos como previamente descrito por Evans & Maxwell (1987), utilizando água a 40-42°C. O tubo de coleta era de plástico (15 mL), transparente, de fundo cônico, graduado e estava sob proteção de luz com papel alumínio.

Foram realizadas duas coletas de cada animal, em um intervalo de dez minutos, e, após a formação de um *pool*, o sêmen foi levado, imediatamente, ao laboratório para análise. Em todos os ejaculados, foram avaliados o volume (mL), o aspecto (1= cremoso; 2= leitoso; 3= aquoso), a coloração (1= branca; 2= branca-amarelada; 3= amarelada), o turbilhonamento ou movimento em massa (TUR, 0-5), a motilidade espermática espermática progressiva (MOT, 0-100%), o vigor espermático (VIG, 0-5), a concentração (espermatozoides/mL) e as patologias espermáticas. No tubo de coleta, foi verificado macroscopicamente o volume, o aspecto e a coloração, imediatamente após a coleta conforme Ax et al. (2004). A avaliação do turbilhonamento foi realizada por meio da deposição de uma gota de sêmen (10 µL) em uma lâmina pré-aquecida (37 °C), com posterior observação em microscópio óptico de contraste de fase, em aumento de 100X, classificando a amostra em uma escala de 0 a 5, admitindo-se zero como ausência do movimento em forma de onda e cinco como o valor máximo desse parâmetro. Para realizar a avaliação da MOT e do VIG, foram homogeneizados 10 µL do sêmen e 100 µL do diluente

Botubov® (Botupharma) e retirada uma alíquota de 10 µL. A observação foi feita em microscópio óptico com contraste de fase, em aumento de 200X, utilizando-se lâminas e lamínulas pré-aquecidas (37°C). Para o parâmetro motilidade, foram atribuídas notas percentuais subjetivas de 0 a 100% em relação à quantidade de espermatozoides móveis totais, enquanto para o vigor, os valores de 0 a 5 foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade de movimentação. A concentração de espermatozoides no sêmen coletado foi determinada com auxílio da câmara de Neubauer, após diluição (1:200) da amostra, enquanto a morfologia espermática foi determinada por meio da avaliação de 100 espermatozoides em um microscópio óptico com contraste de fase (1000X), segundo os critérios adotados por Blom (1973) quanto as anormalidades totais.

2.8) Resfriamento e congelamento do sêmen

As amostras seminais foram diluídas em um meio comercial TRIS-gema de ovo contendo glicerol (Botubov®, Botupharma), pré-aquecido (37°C), tendo uma concentração final de $2,00 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Posteriormente, o sêmen diluído foi acondicionado em palhetas plásticas de 0,25 mL (IMV®), as quais foram mantidas em geladeira à temperatura de 5°C, por três horas. Após o período de resfriamento e equilíbrio, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido, sendo as mesmas colocadas, rapidamente, à altura de 5 cm do nitrogênio líquido, na posição horizontal, em uma grade suporte de aço inox (Botupharma®), por 20 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio e, em seguida, acondicionadas em raques identificadas para serem armazenadas em botijão criogênico até a sua avaliação.

2.9 Avaliações do sêmen descongelado

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por 30 segundos, e o conteúdo transferido para um tubo plástico (Eppendorf®) de 1,5 mL, do qual foi retirada uma alíquota de 10 µL para análise dos parâmetros MOT e VIG, conforme descrito para o sêmen fresco. Para a realização do Teste Hiposmótico, que avalia a funcionalidade da membrana plasmática, uma alíquota de 50 µL do sêmen descongelado foi retirada e transferida para um tubo plástico (Eppendorf®) de 1,5 mL, contendo 1 mL da solução hiposmótica (solução de frutose a 100 mOsm/L), e em seguida, incubada em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Após o término da incubação, foram adicionados 500 µL de formol salino para posterior

contagem de 100 células em microscópio óptico, com aumento de 1000X. Foram considerados espermatozoides com membrana funcional aqueles que, durante a incubação, sofreram dobramento da cauda (BITTENCOURT et al., 2005).

2.5 Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o Statistical Analysis System (SAS, 2002). As variáveis quantitativas foram avaliadas por análise de variância, considerando o efeito do animal, utilizando o PROC GLM. As médias foram comparadas pelo teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welsh. As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, usando o PROC NPAR1WAY. Os dados de comportamento sexual foram comparados entre a estação reprodutiva (Março a Agosto) e a não-reprodutiva (Setembro a Fevereiro) por meio do teste exato de Fisher (PROC FREQ). As correlações entre as variáveis quantitativas foram avaliadas pela correlação simples de Pearson, e entre as variáveis qualitativas pela correlação de Spearman (PROC CORR). Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro-padrão da média e a significância adotado foi $\alpha = 0.05$.

3. Resultados e Discussão

A diferença média de incidência de luz entre o mês com maior (dezembro) e menor (junho) luminosidade foi de 2,48 horas (Figura 1). Essa diferença ocorre devido à localização da região experimental no Hemisfério Sul do globo terrestre, o qual apresenta aumento da incidência luminosa durante os períodos de primavera e verão, enquanto sua diminuição acontece no outono e inverno (ON, 2013). A espécie caprina e algumas raças de ovinos são consideradas poliéstricas estacionais de dia curto, pois as fêmeas iniciam a atividade sexual (estação de reprodução) em resposta a diminuição do comprimento do dia, enquanto seu aumento leva ao término do período reprodutivo (estação não-reprodutiva) (ABECIA et al., 2012). Na região onde foi realizada essa pesquisa, foi verificado que a estação reprodutiva das fêmeas ocorreu durante os meses de março e agosto, compreendendo o final do verão, outono e início do inverno.

Na Tabela 1 e na Figura 2, são apresentadas as variações mensais do perímetro escrotal (cm) e do volume (mL) dos testículos esquerdo e direito dos machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil).

O perímetro escrotal (cm) apresentou correlação positiva com a temperatura máxima ($r = 0,48$) e, assim, maiores medidas nos meses de setembro a fevereiro ($P < 0,05$), os quais

compreendem a primavera e o verão (estação não-reprodutiva). Barkawi et al. (2006), trabalhando no Egito (30° 1' N), também encontraram valores de perímetro escrotal maiores durante a primavera e verão, enquanto Coloma et al. (2011) e Santiago-Moreno et al. (2013), trabalhando em maiores latitudes (40° 25' N - Espanha), encontraram maiores valores no verão e outono, coincidindo com a estação reprodutiva das fêmeas. Também foi verificado, nesse trabalho, um aumento gradativo nas medidas dos volumes testiculares esquerdo e direito a partir de setembro ($P<0,05$), período do ano onde foi observado ausência de fêmeas em estro.

Na Tabela 2 e Figura 3, são apresentadas as médias ($\pm$ S.E.) dos parâmetros macroscópicos (volume, coloração e aspecto) e microscópicos (turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático, concentração e anormalidades espermáticas totais) do sêmen durante o período experimental. Em conjunto, essas características auxiliam na análise dos parâmetros seminais para processamento e utilização *in vivo* ou *in vitro* do mesmo.

O volume seminal de caprinos é, em média, 1,0 mL, variando de 0,5 a 1,2 mL (AX et al., 2004). O volume médio obtido por Santos et al. (2006), para animais adultos da raça Alpina, e o recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) é de 0,8 mL. Karagiannidis et al. (2000), ao trabalharem com a raça Alpina, verificaram uma diferença no volume seminal de 0,33 mL entre as estações de reprodução (1,42 mL) e não-reprodutiva (1,09 mL). Nesse trabalho, foi realizado um *pool* de duas coletas seminais sucessivas, com intervalo de 10 minutos, e os menores valores de volume seminal foram observados durante a estação reprodutiva (Figura 3), com correlações médias de $r= 0,35$ e $r= 0,33$, com o perímetro escrotal e volume testicular, respectivamente ($P<0,05$).

A coloração e o aspecto seminal não apresentaram diferenças entre as médias mensais ($P>0,05$) e, segundo Mies Filho (1987) e Ax et al. (2004), quando analisadas de forma conjunta, esses parâmetros podem ser indicadores da concentração espermática em ruminantes. A maior diluição seminal é devida à maior produção de plasma seminal, que, na espécie caprina, apresenta-se naturalmente mais amarelado (AX et al., 2004). Nesse trabalho, observou-se que quanto mais intensa a coloração amarelada (mais plasma seminal), maior é o aspecto aquoso ($r= 0,40$) e menor a concentração espermática ($r= -0,43$) do sêmen coletado. Além disso, a observação da coloração espermática pode auxiliar no

Tabela 1 - Variações mensais das mensurações escrotal e testiculares de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) (Média ± SE)

Período	Perímetro escrotal (cm)	Volume (mL)	
		Testículo esquerdo	Testículo direito
Março/12	30,8 ± 0,6 ^{bcd}	162,9 ± 15,4 ^{bcd}	155,1 ± 13,7 ^{dc}
Abril/12	29,5 ± 0,7 ^{ed}	138,25 ± 14,2 ^{def}	137,8 ± 9,0 ^{cde}
Maio/12	29,1 ± 0,6 ^e	107,7 ± 13,2 ^{ef}	112,6 ± 9,9 ^e
Junho/12	28,9 ± 0,8 ^e	124,5 ± 15,4 ^{def}	125,8 ± 12,0 ^{de}
Julho/12	28,6 ± 0,9 ^e	99,3 ± 13,5 ^f	111,0 ± 12,0 ^e
Agosto/12	29,8 ± 0,6 ^{cde}	130,3 ± 14,4 ^{def}	133,2 ± 8,7 ^{de}
Setembro/12	31,3 ± 0,5 ^{abc}	151,5 ± 19,5 ^{cde}	161,0 ± 7,8 ^{cd}
Outubro/12	32,0 ± 0,5 ^{ab}	170,4 ± 20,6 ^{abcd}	170,0 ± 10,3 ^{bc}
Novembro/12	32,5 ± 0,5 ^{ab}	169,6 ± 15,8 ^{abcd}	202,9 ± 9,2 ^{ab}
Dezembro/12	32,1 ± 0,6 ^{ab}	192,6 ± 21,1 ^{abc}	211,0 ± 10,2 ^a
Janeiro/13	32,1 ± 0,4 ^{ab}	202,1 ± 17,5 ^{ab}	233,7 ± 9,9 ^a
Fevereiro/13	32,9 ± 0,3 ^a	213,1 ± 12,7 ^a	199,5 ± 10,4 ^{ab}

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo testeRyan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05).

Tabela 2 - Variações mensais dos parâmetros do sêmen fresco e descongelado, coletado de machos caprinos da raça Alpina (Média ± SE)

Período	Sêmen fresco								Sêmen descongelado		
	Volume (mL)	Coloração (1-3)*	Aspecto (1-3)**	TUR (0-5)	MOT (0-100 %)	VIG (0-5)	Concentração (x10 ⁹ SPTZ/mL)	Anormalidades totais	MOT (0-100 %)	VIG (0-5)	HOST (%)
Março/12	1,6 ± 0,3 ^{cd}	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	85,8 ± 1,5	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,4 ^{ab}	38,3 ± 4,6	45,4 ± 2,4	3,4 ± 0,1 ^{ab}	42,9 ± 4,6
Abril/12	1,2 ± 0,2 ^d	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	84,4 ± 1,8	3,3 ± 0,1	2,7 ± 0,5 ^{ab}	31,3 ± 5,8	45,0 ± 4,1	3,7 ± 0,2 ^{ab}	44,4 ± 5,8
Maio/12	1,9 ± 0,3 ^{bcd}	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	3,4 ± 0,3	85,0 ± 1,9	3,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2 ^b	43,6 ± 4,8	46,3 ± 3,9	3,8 ± 0,1 ^a	33,9 ± 2,8
Junho/12	2,7 ± 0,5 ^{abc}	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	3,4 ± 0,3	83,8 ± 1,6	3,8 ± 0,1	2,5 ± 0,4 ^b	30,1 ± 6,5	40,6 ± 4,0	3,4 ± 0,2 ^{ab}	42,6 ± 5,2
Julho/12	2,8 ± 0,5 ^{abc}	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,0	2,9 ± 0,3	80,7 ± 2,0	3,4 ± 0,2	2,7 ± 0,6 ^{ab}	40,6 ± 5,9	41,4 ± 6,0	3,2 ± 0,2 ^{bc}	42,5 ± 4,4
Agosto/12	1,8 ± 0,2 ^{bcd}	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2	3,1 ± 0,3	84,6 ± 1,8	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,4 ^{ab}	27,7 ± 4,6	43,2 ± 4,9	3,3 ± 0,2 ^b	41,2 ± 6,0
Setembro/12	2,4 ± 0,3 ^{abcd}	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,0 ± 0,5	84,4 ± 2,7	3,6 ± 0,2	4,2 ± 0,8 ^{ab}	33,4 ± 4,0	41,9 ± 2,7	3,3 ± 0,1 ^b	38,9 ± 5,9
Outubro/12	2,9 ± 0,3 ^{abc}	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,1	3,3 ± 0,3	82,5 ± 2,8	3,5 ± 0,2	4,5 ± 0,7 ^a	22,4 ± 4,1	43,8 ± 3,8	3,2 ± 0,2 ^{bc}	43,4 ± 4,0
Novembro/12	3,2 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,3	80,0 ± 2,1	3,6 ± 0,1	4,1 ± 0,5 ^{ab}	32,3 ± 4,4	35,6 ± 3,7	2,8 ± 0,1 ^c	37,3 ± 5,1
Dezembro/12	3,1 ± 0,3 ^{ab}	2,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,4	80,0 ± 2,5	3,3 ± 0,2	3,7 ± 0,7 ^{ab}	36,1 ± 6,3	36,3 ± 4,2	3,1 ± 0,1 ^{bc}	41,1 ± 6,6
Janeiro/13	3,0 ± 0,3 ^{ab}	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,3	79,6 ± 2,1	3,5 ± 0,1	3,8 ± 0,5 ^{ab}	39,3 ± 4,6	41,7 ± 3,0	3,3 ± 0,1 ^b	42,4 ± 5,3
Fevereiro/13	2,4 ± 0,2 ^{abcd}	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,4	85,0 ± 2,5	3,7 ± 0,2	3,1 ± 0,5 ^{ab}	28,6 ± 6,3	48,1 ± 3,8	3,4 ± 0,2 ^{ab}	47,8 ± 5,5

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo testeRyan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05); *Colorações: 1 (branca), 2 (branca-amarelada) e 3 (amarelada); **Aspecto: 1 (cremoso), 2 (leitoso) e 3 (aquoso); TUR: turbilhonamento; MOTP: motilidade espermática progressiva retilínea; VIG: vigor espermático; HOST: teste hiposmótico

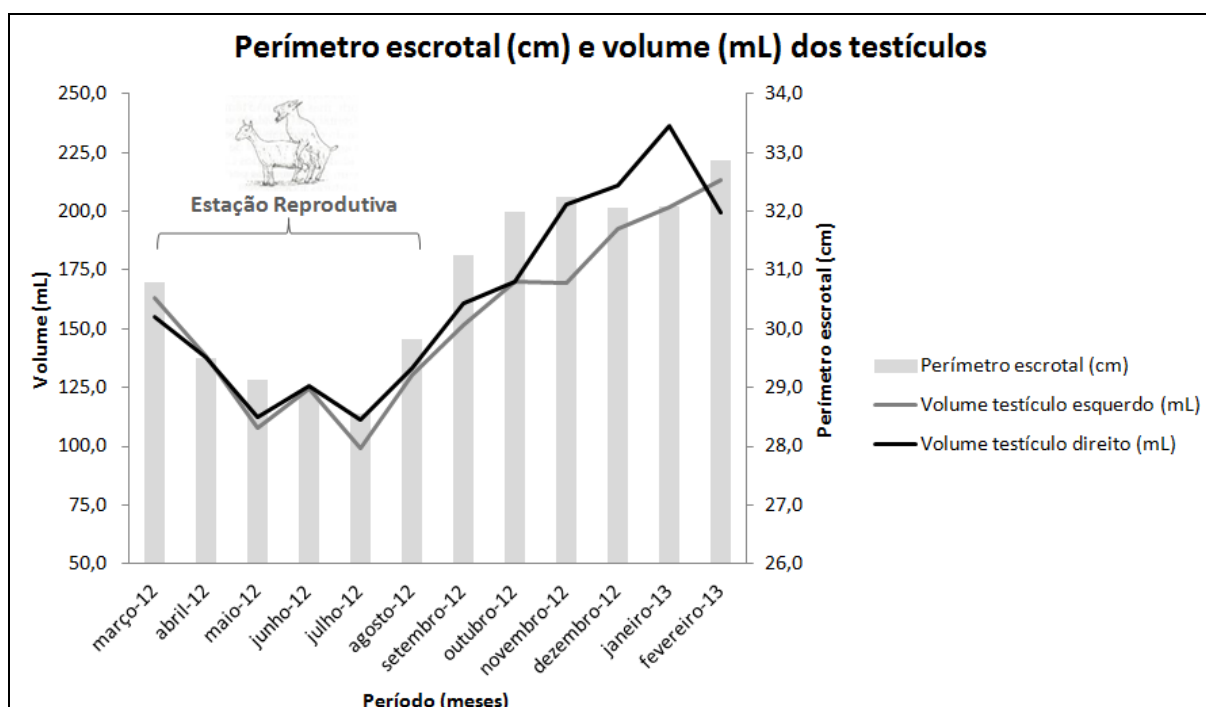


Figura 2: variações mensais do perímetro escrotal (cm) e volume (mL) testicular de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil).

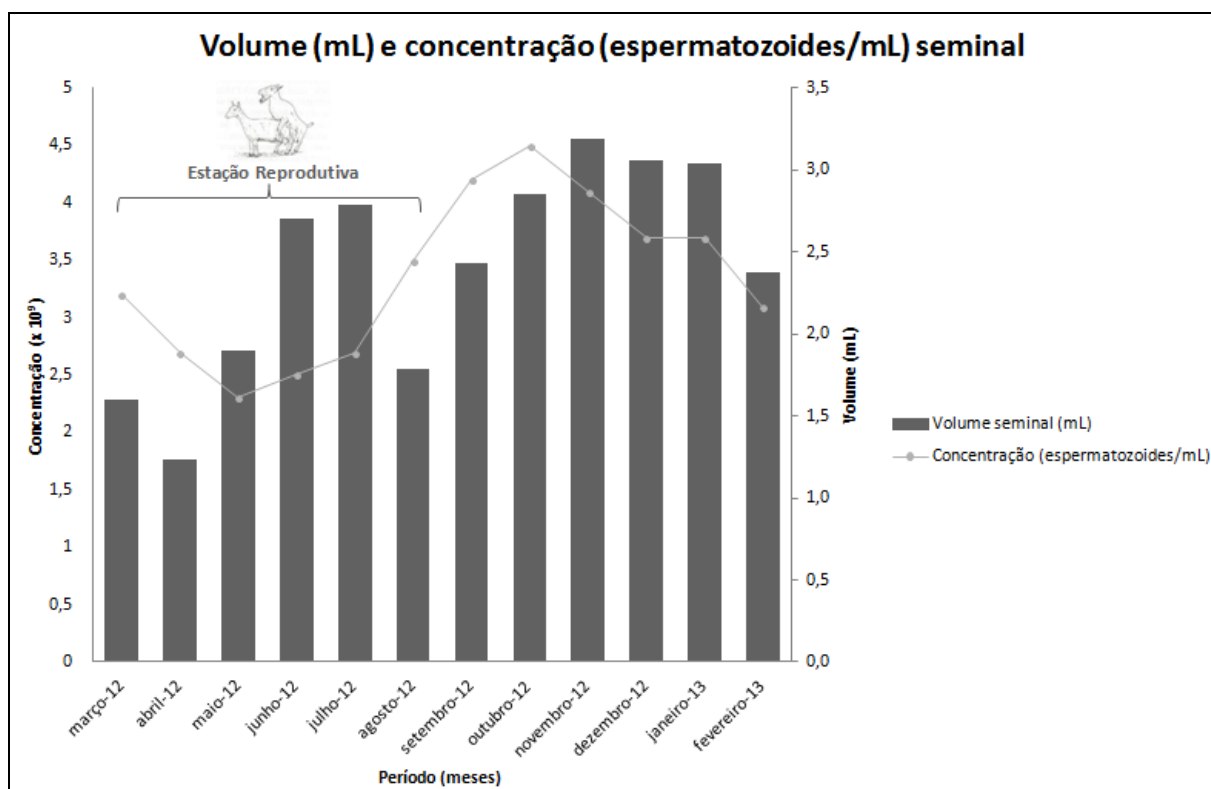


Figura 3: variações mensais do volume (mL) e concentração (espermatozoide/mL) seminal de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil).

diagnóstico de patologias no aparelho reprodutor masculino, a partir da presença de sangue, pus e urina no sêmen recém-coletado (AX et al., 2004).

O turbilhonamento ou movimento de massa (0-5), que ocorre no sêmen fresco de ruminantes, é caracterizado pelo movimento em forma de ondas e, nesse trabalho, correlacionou-se positivamente com a motilidade ($r= 0,62$), o vigor ($r= 0,55$) e a concentração espermática ($r= 0,38$). As médias mensais não apresentaram diferenças, durante esse experimento, e ficaram próximas ao valor mínimo recomendado pelo CBRA (1998) e o verificado por Nunes et al. (1983), que foram de 3,0 e 3,5, respectivamente. Ainda pode-se destacar as correlações negativas obtidas entre o turbilhonamento e outros parâmetros seminais: volume ($r= -0,20$), aspecto ($r= -0,33$) e coloração ($r= -0,41$). Assim, quanto maior a diluição, o aspecto aquoso e mais intensa a coloração amarelada, maior é quantidade de plasma seminal em relação à quantidade de espermatozoide, e por isso, menor o turbilhonamento.

A motilidade espermática progressiva retilínea (MOT) é representada pela porcentagem total de espermatozoides móveis de forma progressiva, enquanto o vigor espermático é a qualidade (intensidade) do movimento das células espermáticas (CASTELO et al., 2008). Nesse trabalho, a motilidade progressiva (0-100 %) e o vigor (0-5) não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre as médias mensais e ficaram dentro do recomendado pelo CBRA (1998) para sêmen fresco de caprinos, que é de 80% para motilidade e 3 para vigor espermático. O mesmo foi verificado por Coloma et al. (2011), que também não observaram diferenças entre os meses avaliados, porém foram maiores que os valores obtidos por Santiago-Moreno et al. (2013). A motilidade e o vigor espermático são os principais e mais comuns parâmetros utilizados na avaliação seminal para predizer a qualidade seminal, pois apresentam correlação positiva com a fertilidade do sêmen (CORREA et al., 1997).

Assim como Aller et al. (2012), os valores médios mensais verificados nesse trabalho para a concentração espermática, durante o período experimental, estão de acordo com Castelo et al. (2008), que descreveram como normal uma concentração variando de 2,5 - 5,0 x 10⁹ espermatozoides/mL para caprinos. Esses valores também ficaram acima do mínimo recomendado pelo CBRA (1998), que é de 2 x 10⁹ espermatozoides/mL.

A motilidade espermática progressiva retilínea (0-100%; MOT) do sêmen descongelado não apresentou diferença ($P<0,05$) entre os valores médios mensais, variando de 36,3 a 48,1%. Diferentemente do vigor espermático (0-5) que variou de 2,8 a 3,8 após o descongelamento ($P>0,05$). Os valores obtidos para esses parâmetros foram superiores aos

verificados por Coloma et al. (2011), e também, acima do recomendado pelo CBRA (1998) que é de, no mínimo, 30% para a motilidade e 2 para o vigor, e inferiores aos obtidos por Bitencourt et al. (2005).

Os processos para a criopreservação seminal (diluição, congelamento e descongelamento) são responsáveis por importantes lesões nos espermatozoides, principalmente, nas membranas plasmáticas (HOLT, 2000). As injúrias que acontecem nas células espermáticas decorrentes dos efeitos de temperatura e, ou, osmolaridade resultam em diminuição de 50% da motilidade verificada no sêmen fresco (AMMAN & PICKETT, 1987; THOMAS et al., 1998), como observado nesse trabalho. Além disso, as mudanças morfo-bioquímicas no sêmen também podem alterar o metabolismo e a produção de ATP nas mitocôndrias da peça intermediária do espermatozoide e, assim, o vigor espermático.

Dentre as variáveis ambientais, as altas temperaturas do ambiente são as que mais podem influenciar na qualidade seminal, pois alteram o processo de maturação epididimária, comprometendo as estruturas da membrana plasmática dos espermatozoides (HUANG et al., 2000) e, assim, diminuindo a qualidade seminal após o descongelamento. O teste hiposmótico avalia a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide e possui correlação positiva com o motilidade espermática progressiva, como observado por Martins et al. (2006) e Lodhi et al. (2008), que apresentaram $r = 0,28$ e $r = 0,65$, respectivamente. Nesse trabalho, o teste hiposmótico (HOST, %) do sêmen descongelado não apresentou diferenças entre as médias mensais, e foi próximo ao verificado por Santos et al. (2006) e superior aos obtidos por Bittencourt et al. (2005), 39 e 17%, respectivamente. Assim, a ausência de alterações significativas tanto nas médias de motilidade espermática progressiva, quanto no teste hiposmótico durante todos os meses do ano, permite inferir que o ambiente não levou a alterações nas membranas plasmáticas espermáticas e diminuição da qualidade seminal.

A morfologia espermática do sêmen fresco foi resumida na Tabela 2 com a apresentação das anormalidades totais observadas, porém não foram observadas diferenças entre os meses ($P > 0,05$) durante o período experimental. No entanto, Coloma et al. (2011) e Santiago-Moreno et al. (2013) verificaram diferenças durante o ano, com o outono e a primavera apresentado a menor (30 e 24,1%) e a maior (80 e 61,5%) percentagem de patologias espermáticas, respectivamente. Essa diferença, pode ocorrer Segundo Sarlós et al. (2013), pois existe uma correlação negativa entre a sazonalidade e anormalidades

espermáticas ($r = -0,55$), ou seja, durante o período de estação reprodutiva ocorrem menores índices de espermatozoides defeituosos que comprometem a qualidade espermática e sua eficiência de fertilização. No entanto, esses trabalhos foram realizados em regiões de latitudes maiores ($> 40^{\circ}\text{N}$) onde a sazonalidade do fotoperíodo tem grande influência na fisiologia reprodutiva, diferentemente da região onde foi realizado esse trabalho (20°S).

As características sazonais de reprodução se expressam com maior intensidade nas raças caprinas, como a Alpina, que têm origem em regiões de latitudes superiores a 35°N ou 35°S (AVDI et al., 2004; SARLÓS et al., 2013). Esses animais de clima temperado apresentam sua estação reprodutiva em períodos de menor intensidade luminosa, ou seja, durante o final do verão, outono e inverno (ABECIA et al., 2012). Nos machos, essas alterações reprodutivas são mais sutis e não manifestam interrupção da gametogênese e atividade sexual, como observado nas fêmeas (PELLETIER & ALMEIDA, 1987).

Segundo Baril et al., (1993) os testículos de um macho caprino adulto são influenciados pela raça, estação do ano e estado nutricional. Nesse experimento foram utilizados animais da mesma raça e a alimentação não sofreu alteração durante o período experimental, sendo a única variável utilizada o fotoperíodo que se modificou durante o ano (Figura 1). A maioria dos parâmetros testiculares e seminais analisados não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os meses analisados, e, portanto, nos machos, a sazonalidade reprodutiva influenciada pelo fotoperíodo não foi observada com grande intensidade como nas fêmeas, as quais apresentaram manifestação de estro somente durante os meses de março a agosto. Assim, supõe-se que as alterações observadas durante os meses de março a agosto (estação reprodutiva), como a diminuição do perímetro escrotal, do volume testicular e da concentração espermática se devem ao aumento do número de coberturas realizadas pelos reprodutores no rebanho durante esse período. No entanto, é possível que o fotoperíodo tenha influenciado as glândulas anexas, as quais são responsáveis pela produção do plasma seminal e, assim, tenham ocorrido o aumento do volume seminal durante a estação reprodutiva e a diminuição da concentração espermática nos meses maio a junho (Figura 3).

No entanto, as altas temperaturas ambientais também podem influenciar nas mudanças morfológicas e seminais dos reprodutores, ao aumentar os túbulos seminíferos, e consequentemente, o volume e o perímetro escrotal (AMMAN, 1962). Nesse trabalho, as temperaturas ambientais máximas foram maiores nos meses de setembro a fevereiro, que é

o período onde também se observou aumento no volume e concentração seminal, além do perímetro escrotal e volume testicular ($P<0,05$). Esses animais, que têm sua origem em regiões de clima temperado, podem ter adaptado sua fisiologia reprodutiva ao clima tropical de altitude, e, assim, os valores de referência de alguns parâmetros, como o perímetro escrotal, devem ser avaliados de forma diferenciada e conforme o ambiente em que vivem.

Conforme observado na Tabela 3 e Figura 4, as maiores concentrações plasmáticas plasmáticas ($P<0,05$) de FSH e LH ocorreram em fevereiro e março, e de testosterona de fevereiro a abril, ou seja, períodos que compreendem o verão e outono. As concentrações desses hormônios podem ter sido influenciadas, principalmente, pelo fotoperíodo anual e aproximação da estação reprodutiva dos caprinos na região do experimento (latitude 20 °S) que ocorreu de março a agosto. Foi observado que tanto o LH quanto a testosterona apresentaram correlação negativa com a luminosidade, ou seja, a diminuição do fotoperíodo estimulou a síntese de LH e, conseqüentemente, de testosterona. Barkawi et al. (2006), Zarazaga et al. (2009) e Coloma et al. (2011) ao trabalharem com caprinos em regiões com latitudes de 30 °N, 37 °N e 36 °N, respectivamente, também verificaram maiores valores desses hormônios durante o final do verão e outono, períodos que apresentam fotoperíodo decrescente.

Tabela 3 - Variações mensais dos hormônios FSH (mUI/mL), LH (mUI/mL), e testosterona (ng/mL) de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) (Média $\pm$ SE)

Período	FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)	Testosterona (ng/mL)
Março/12	0,45 $\pm$ 0,16 ^{ab}	1,29 $\pm$ 0,42 ^{ab}	14,17 $\pm$ 0,88 ^{ab}
Abril/12	0,13 $\pm$ 0,05 ^b	0,40 $\pm$ 0,24 ^{bc}	16,95 $\pm$ 0,65 ^a
Maió/12	0,10 $\pm$ 0,05 ^b	0,37 $\pm$ 0,25 ^{bc}	9,54 $\pm$ 1,43 ^{bcd}
Junho/12	0,16 $\pm$ 0,07 ^b	0,54 $\pm$ 0,25 ^{bc}	5,62 $\pm$ 1,01 ^{cde}
Julho/12	0,07 $\pm$ 0,03 ^b	0,38 $\pm$ 0,25 ^{bc}	3,46 $\pm$ 1,25 ^e
Agosto/12	0,14 $\pm$ 0,03 ^b	0,23 $\pm$ 0,10 ^c	2,03 $\pm$ 0,24 ^e
Setembro/12	0,06 $\pm$ 0,02 ^b	0,25 $\pm$ 0,16 ^{bc}	3,07 $\pm$ 0,58 ^{de}
Outubro/12	0,10 $\pm$ 0,04 ^b	0,36 $\pm$ 0,17 ^{bc}	2,83 $\pm$ 0,49 ^e
Novembro/12	0,10 $\pm$ 0,04 ^b	0,41 $\pm$ 0,20 ^{bc}	4,75 $\pm$ 1,34 ^{cde}
Dezembro/12	0,12 $\pm$ 0,07 ^b	0,32 $\pm$ 0,20 ^{bc}	3,89 $\pm$ 1,26 ^{de}
Janeiro/13	0,10 $\pm$ 0,04 ^b	0,35 $\pm$ 0,15 ^{bc}	10,22 $\pm$ 1,83 ^{bc}
Fevereiro/13	0,54 $\pm$ 0,19 ^a	1,64 $\pm$ 0,55 ^a	14,37 $\pm$ 1,81 ^{ab}

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh ($P<0,05$).

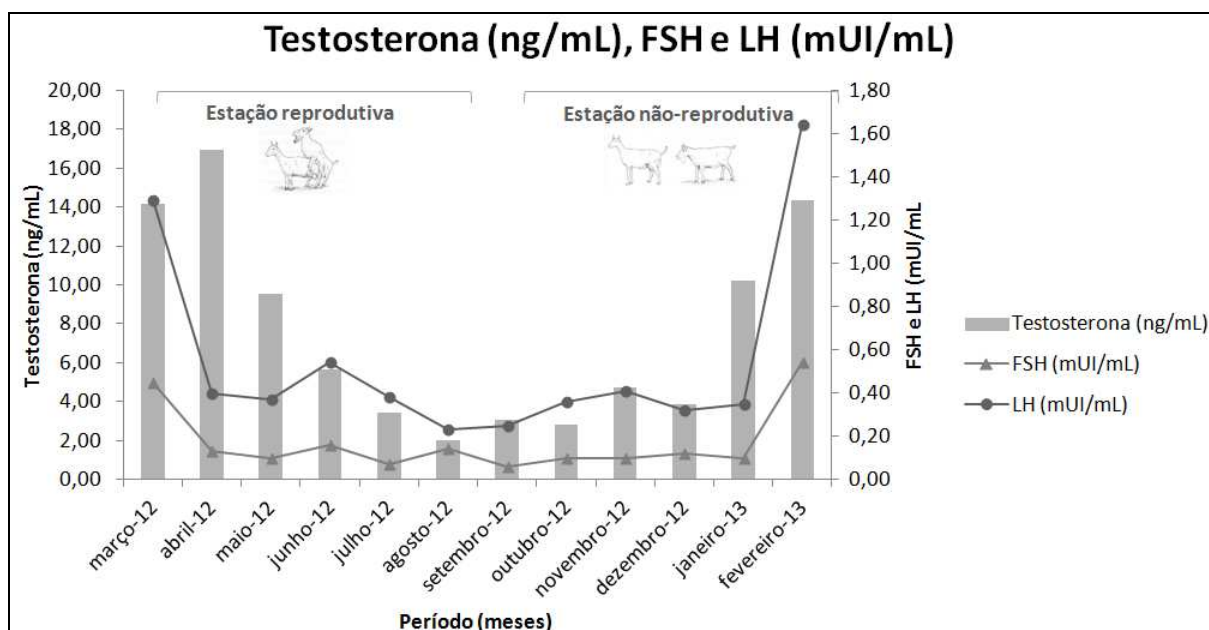


Figura 4: variações mensais dos hormônios FSH (mUI/mL), LH (mUI/mL), e testosterona (ng/mL) de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil).

Com a diminuição do fotoperíodo a partir de janeiro ($P < 0,05$) (Tabela 1; Figura 1), provavelmente, a melatonina começou a ser sintetizada em maior quantidade pela glândula pineal (ABECIA et al., 2012). Na espécie caprina, esse hormônio induz o hipotálamo a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o qual atua na hipófise anterior liberando maiores quantidades das gonadotrofinas FSH e LH (BRACKETT, 2006). Nos testículos, o FSH é responsável pela funcionalidade das células de Sertoli, as quais se localizam dentro dos túbulos seminíferos e fornecem suporte estrutural, nutricional e funcional para a diferenciação e a proliferação das células germinativas (SHARPE et al., 2003; BRACKETT, 2006). Já o LH atua sobre as células de Leydig, as quais estão localizadas no tecido intertubular e que têm como principal função a síntese de andrógenos (GARDNER & HAFEZ, 2004; BRACKETT, 2006). A testosterona é o principal hormônio masculino e tem como principais funções a estimulação dos estágios finais da espermatogênese, o prolongamento da vida útil dos espermatozoides no epidídimo, e a estimulação do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, das características sexuais secundárias e da libido (GARDNER & HAFEZ, 2004; BRACKETT, 2006).

O aumento da síntese dos hormônios hipofisários e da testosterona ocorreu de forma antecipada ao período de estação reprodutiva das fêmeas (THIÉRY et al., 2002) que acontece no final do verão, outono e final do inverno (março a agosto). Essa estimulação precoce se inicia 1 a 1,5 meses antes que nas fêmeas para que quando o período cíclico das

fêmeas se inicie, os machos já tenham alcançado a atividade sexual e produção espermática. Essa sensibilidade diferenciada ao fotoperíodo é importante, pois enquanto as fêmeas em anestro ovulam dentro de poucos dias após o início da estimulação hormonal, os machos necessitam de cerca de 54 dias para concluir a espermatogênese (ROSA & BRYANT, 2003).

De acordo com Sharpe et al. (2003) e Barkawi et al. (2006), o aumento do volume testicular, no período que antecede, e também, durante a estação reprodutiva, é devido ao aumento da área ocupada pelos túbulos seminíferos influenciado pelos hormônios FSH e LH que são secretados com a diminuição do fotoperíodo, como observado por Coloma et al. (2011) e Santiago-Moreno et al. (2013). Nesse trabalho, apesar da variação anual das concentrações dos hormônios hipofisários e da testosterona ($P < 0,05$), não foram observadas alterações na qualidade seminal (Tabela 2; Figura 3) e no volume testicular (Tabela 1; Figura 2) relacionadas a esses hormônios, mas sim devido a maior ou menor utilização dos reprodutores em coberturas.

Salles (2010) relatou aumento nas concentrações de testosterona durante o período do ano com maiores temperaturas ambiente, mas Coelho et al. (2008) mostraram que machos caprinos em estresse por calor não apresentaram variação na concentração plasmática de testosterona. Segundo Barbosa et al. (1999) ainda não se sabe se as alterações da sínteses hormonais são somente influenciadas pelo fotoperíodo ou uma combinação com outros fatores ambientais (temperatura, umidade).

Na tabela 4, estão apresentados os sinais fisiológicos de comportamento sexual durante a coleta de sêmen dos machos caprinos nas estações reprodutiva e não-reprodutiva, e na Figura 5, o tempo de reação médio durante os mesmos períodos. Segundo Chemineau et al. (1991), o comportamento sexual do macho adulto depende, principalmente, das secreções hormonais, seguido da interações sociais. Por outro lado, Azevêdo et al. (2008) afirmam que a intensidade e frequência do comportamento sexual masculino pode também ser influenciada por fatores ambientais, e não de forma exclusiva pelos hormônios sexuais.

A real capacidade reprodutiva do macho pode ser indiretamente determinada pela sua libido, que é o grau de interesse do macho em efetuar a cópula (CHENOWETH, 1981). De acordo com a classificação de Chemineau et al. (1991), em pequenos ruminantes a libido pode ser avaliada pelo do tempo de reação (segundos), ou seja, tempo decorrente desde sua apresentação à fêmea até a ejaculação subsequente diante de uma fêmea em estro, sendo classificado em excelente (até 30 seg), boa (31 a 60 seg), regular (61 a 120 seg), sofrível

(acima de 120 seg). Assim como verificado por Souza et al. (2007), a libido dos animais nesse experimento pode ser considerada boa tanto na estação reprodutiva, quanto na estação não-reprodutiva.

Tabela 4 - Frequência dos sinais fisiológicos de comportamento sexual observados durante as coletas de sêmen, nas estações reprodutiva e não-reprodutiva, de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) (Média $\pm$ SE)

Comportamentos	Períodos	
	Estação reprodutiva	Estação não-reprodutiva
Ato de cheirar e lambar a região anogenital da fêmea	96,4 % (53/55) ^a	98,1 % (51/52) ^a
Reflexo de Flehmen	18,2 % (10/55) ^a	7,7 % (4/52) ^a
Ato de bater e raspar o casco no chão	32,7 % (18/55) ^a	15,4 % (8/52) ^b
Acotovelamento e escoiceamento da fêmea	12,7 % (7/55) ^a	9,6 % (5/52) ^a
Emissão de som característico	20,0 % (11/55) ^a	17,3 % (9/52) ^a
Exteriorização e retração da língua	52,7 % (29/55) ^a	26,9 % (14/52) ^b
Ereção e exposição do pênis	54,6 % (30/55) ^a	59,6 % (31/52) ^a
Reflexo de monta	76,4 % (42/55) ^a	40,4 % (21/52) ^b
Montas sem serviço (ou falsa monta)	14,6 % (8/55) ^a	5,8 % (3/52) ^a
Interesse sexual após a monta (serviço)	47,3 % (26/55) ^a	42,3 % (22/52) ^a

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh ($P < 0,05$).

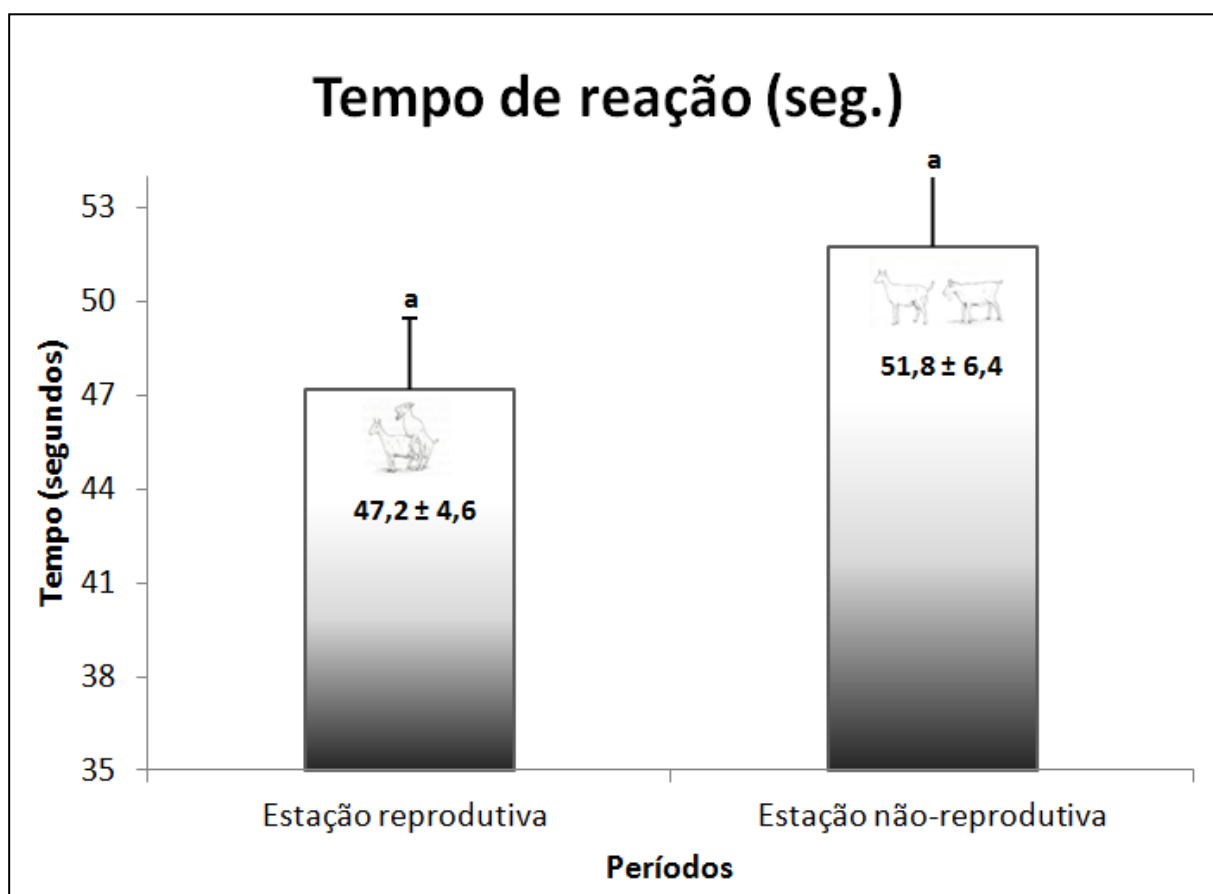


Figura 5: tempo de reação médio (seg.) durante a estação reprodutiva e não-reprodutiva de machos caprinos da raça Alpina no clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil).

Segundo Azevedo et al. (2008), em países de clima tropical, a libido de pequenos ruminantes em geral varia pouco, mas ela pode ser influenciada por variáveis ambientais, como temperatura ambiente, pluviosidade, umidade relativa do ar e insolação, ou por alteração da oferta de alimento. Godfrey et al. (1998) ao trabalharem com raças de ovinos de clima temperado em condições de estresse por calor observaram que não houve alterações dos parâmetros comportamentais, demonstrando adaptabilidade das raças ao clima tropical. Por outro lado, em regiões de latitude temperada a atividade sexual é maior a partir de outubro (outono) onde há diminuição da luminosidade, e assim, estimulação do macho com a síntese de andrógenos e da fêmea com o reinício do ciclo estral e produção de ferormônios (BARKAWI et al., 2006; ZARAZAGA et al., 2009).

Segundo Chemineau et al. (1991), após o macho identificar e se aproximar de uma fêmea, ele avalia a sua receptividade. Se a fêmea estiver em estro (imobilidade) o macho continua a sua sequência de comportamentos pré-coitais (cortejo) que culmina com a cópula. Nesse trabalho, o comportamento sexual mostrou variação sazonal somente para os atos de bater e raspar o casco no chão, de exteriorizar e retraindo a língua, e do reflexo de monta. Esses comportamentos podem ter sido mais frequentes durante a estação reprodutiva devido ao maior estímulo causado pelos feromônios de cabras em estro natural nos machos, permitindo, assim, maiores excitações e atos de cortejo pré-cópula. A presença da maioria dos comportamentos também durante a estação não-reprodutiva pode ser devido aos animais já estarem condicionados às pessoas, ao local e manejo da coleta utilizando uma vagina artificial, ou por já estarem adaptados ao clima tropical.

Assim, quanto maior a latitude da região, maior será a variação dos parâmetros reprodutivos das espécies sazonais entre as estações de reprodução e não-reprodutiva (AGUIRRE et al., 2007) devido a influência do fotoperíodo anual. Quando esses animais são explorados em regiões tropicais algumas características fisiológicas sensíveis à diminuição do fotoperíodo, como a síntese dos hormônios gonadotróficos, podem permanecer. Porém, como observado nesse trabalho, a aproximação à Linha do Equador e, conseqüentemente, a ocorrência de menores variações de fotoperíodos durante o ano, não levou a alterações significativas na qualidade seminal. Sendo assim, poderia ser considerado que os animais com origem em regiões temperadas têm sua fisiologia reprodutiva adaptada ao clima tropical. A ocorrência de algumas variações na quantidade e qualidade seminal, no perfil hormonal e em alguns comportamentos durante o cortejo e a cópula, não devem ser

consideradas como impedimento para utilização dos machos caprinos da raça Alpina no manejo reprodutivo ao longo do ano. Da mesma forma que verificado em outros trabalhos (ROCA et al., 1992; KARAGIANNIDIS et al., 2000; KAFI et al., 2004; AGUIRRE et al., 2007; SARLÓS et al., 2013), a variação de alguns parâmetros reprodutivos do macho caprino da raça Alpina em clima tropical de altitude (Viçosa, MG – Brasil) durante o ano, não compromete a sua capacidade de fertilização.

4. Conclusão

A existência de variações mensais da biometria testicular, de alguns parâmetros seminais (volume e concentração), da síntese dos hormônios sexuais e do comportamento sexual dos bodes Alpinos criados em condições de clima tropical, não devem ser considerada como um impedimento para utilização desses animais como reprodutores durante todo o ano. Essas variações estão correlacionadas à frequência de cobertura das fêmeas e, ou, influência do fotoperíodo, e não levam a alterações no sêmen que possam comprometer a capacidade de fertilização desses animais.

5. Referências bibliográficas

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.130, p. 173-179, 2012.

AGUIRRE, V.; ORIHUELA, A.; VAZQUEZ, R. Effect of semen frequency on seasonal variation in sexual behavior, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair sheep (*Ovis aries*). **Tropical Animal Health and Production**, v.39, n.4, p.271-277, 2007.

ALLER, J. F.; AGUILAR, D.; VERA, T.; ALMEIDA, G. P.; ALBERIO, R. H. Seasonal variation in sexual behavior, plasma testosterone and semen characteristics of Argentine Pampinta and Corriedale rams. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.10, n.2, 345-352, 2012.

AMMAN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **American Journal of Anatomy**, v.110, p.69-78, 1962.

AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-

173, 1987.

AVDI, M.; BANOS, G.; STEFOS, K.; CHEMINEAU, P. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. **Theriogenology**, v.62, p.275-282, 2004.

AX, R. L.; DALLY, M.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Avaliação do sêmen. In: HAFEZ, B. e HAFEZ, E. S. E. (Org.). **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Editora Manole, 2004. Cap.25, p.369-379.

AZEVÊDO, D. M. M. R.; MARTINS FILHO, R.; ALVES, A. A.; ARAÚJO, A. A.; LÔBO, R. N. B. Comportamento sexual de ovinos e caprinos machos: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n.6, 2008.

BAILEY, T. L.; HUDSON, R. S.; POWE, T. A.; RIDDELL, M. G.; WOLFE, D. F.; CARSON R. L. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, p.581-594, 1998.

BARBOSA, S. B. P.; MARTINS FILHO, R.; MARTINS, G. A. et al. Aspectos genéticos e de ambiente em características de crescimento em bovinos de raça Nelore, no estado de Pernambuco. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais... Porto Alegre**: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.147.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. **Manuel de formation pour l.insemination artificielle chez les ovins et les caprins**. (FAO. Etude FAO Production et Sante Animales, 83). Roma: FAO, 1993. 231p.

BARKAWI, A. H.; ELSAYED, E. H.; ASHOUR, G.; SHEHATA, E. Seasonal changes in sêmen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. **Small Ruminant Research**, v.66, p.209-213, 2006.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p.213-218, 2005.

BLOM, E. The ultra structure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, p.383-391, 1973.

BRACKETT, B. G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 38, p.623-643.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y., GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **Animal Production and Health Paper**, Roma: FAO, 1991.

CHENOWETH, P. J. Libido and mating behavior in bulls, boars and rams. A review. **Theriogenology**, v.16, p.155-177, 1981.

COELHO, L. A.; SASA, A.; BICUDO, S. D.; BALIEIRO, J. C. C. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em bodes submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1338-1345, 2008.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA., 1998. 53p.

COLOMA, M. A.; TOLEDANO-DÍAZ, CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; GÓMEZ-BRUNET, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. Seasonal variation in reproductive physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaiaca*) and its relationship with sperm freezability. **Theriogenology**, v.76, 1695-1705, 2011.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Sidney: Butterworths, 1987. 194p.

GARDNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, B. e HAFEZ, E.

S. E. (Org.). **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri/SP: Editora Manole, 2004. Cap. 7, p.97-110.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. P. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p.721-31, 1997.

GODFREY, R. W.; COLLINS, J. R.; GRAY, M. L. Evaluation of sexual behavior of hair sheep rams in a tropical environment. **Journal of Animal Science**, v.76, p.714-717, 1998.

GOLDMAN, B. D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **Journal of Biological Rhythms**, v.16, n.4, p.283-301, 2001.

GOODMAN, R. L.; INSKEEP, E. K. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. In: NEILL, J. D. e KNOBIL, E. (Org.). **Physiology of Reproduction**. 3. ed. London: Elsevier, 2006. Cap. 44, p.2389-2428.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p. 47-58, 2000.

HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; LEE, Y. P.; TSOU, H. L.; LIN, E. C.; LEE, W. C. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.231-240, 2000.

KAFI, M.; SAFDARIAN, M.; HASHEMI, M. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. **Small Ruminant Research**, v.53, p.133-139, 2004.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; ALEXOPOULOS, C.; AMARANTIDIS, I. I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Research**, v.37, p.125-130, 2000.

LODHI, L.A.; ZUBAIR, M.; QURESHI, Z. I.; AHMAD, I.; JAMIL, H. Correlation between hypo-

osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh nili-ravi buffalo and sahiwal cow bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v.28, p.186-188, 2008.

MARTINS, L. F.; PEREIRA, M. C. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; SILVEIRA, T. S.; TORRES, C. A. A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1653-1659, 2006.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. 6. ed., v.2, Porto Alegre: Sulina, 1987. 701p.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academy Press, 2007. 362p.

NUNES, J. F.; RIERA, G. S.; SILVA, A. E. F. D.; PONCE DE LEON, B. F. A.; LIMA F. A. M. **Características espermáticas de caprinos Moxotó de acordo com a morfologia escrotal**. (Circular técnica, 6), Sobral: EMBRAPA/CNPCaprinos, 1983. 11p.

ON - Observatório Nacional. **Anuário interativo do Observatório Nacional**. Disponível em: <<http://www.on.br>> Acessado em 07/03/2013.

PACHECO, A.; QUIRINO, C. R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.87-97, 2010.

PELLETIER, J.; ALMEIDA, G. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.34, p.215-226, 1987.

ROCA, J.; MARTINEZ, E.; VAZQUEZ, J. M.; COY, P. Characteristics and seasonal variations in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.255-262, 1992.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, n.3, p.155-171, 2003.

SALLES, M. G. F. **Parâmetros fisiológicos e reprodutivos de machos caprinos Saanen criados em clima tropical**. 2010. 159f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, 2010.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; ROVAY, H. Parâmetros reprodutivos de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p. 1926-1933, 2006.

SANTIAGO-MORENO, J.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; CASTAÑO, C.; COLOMA, M. A.; ESTESO, M. C.; PRIETO, M. T.; DELGADILLO, J. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Photoperiod and melatonin treatments for controlling sperm parameters, testicular and accessory sex glands size in male Iberian ibex: a model for captive mountain ruminants. **Animal Reproduction Science**, v.139, p.45-52, 2013.

SARLÓS, P.; EGERSEZGI, I.; BALOGH, O.; MOLNÁR, A.; CSEH, S.; RÁTKY, J. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. **Small Ruminant Research**, v.111, p.90-95, 2013.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SHARPE, R. M. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v.125, p.769-784, 2003.

SOUZA, J. A. T.; CAMPELO, J. E. G.; LEAL, T. M.; SOUSA JÚNIOR, A.; MEDEIROS, R. M.; MACEDO, R. C. Biometria testicular, características seminais, libido e concentrações de testosterona em ovino da raça Santa Inês, na Microrregião de Campo Maior, PI. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.10, p.21-28, 2007.

THIÉRY, J. C.; CHEMINEAU, P.; HERNANDEZ, X.; MIGAUD, M.; MALPAUX, B. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.87-100, 2002.

THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETE, J. M. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology and**

Reproduction, v.58, p.786-793, 1998.

ZAMIRI, M. J.; KHODAEI, H. R. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.245-255, 2005.

ZAMIRI, M. J.; Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. **Small Ruminant Research**, v.94, p.132-136, 2010.

ZARAZAGA, L. A.; GUZMÁN, J. L.; DOMÍNGUEZ, C.; PÉREZ, M. C.; PRIETO, R. Effects of season and feeding level on reproductive activity and sêmen quality in Payoya buck goats. **Theriogenology**, v.71, p.1316-1325, 2009.

Variações sazonais na composição do plasma seminal caprino*Seasonal variations in the composition of goat seminal plasma*

Resumo: Esse trabalho avaliou as mudanças mensais no perfil proteico e bioquímico do plasma seminal de bodes da raça Alpina criados em condições de clima tropical de altitude. A avaliação da motilidade progressiva dos espermatozoides foi realizada no sêmen fresco e descongelado, enquanto a avaliação da funcionalidade da membrana (Teste Hiposmótico) foi realizada após o descongelamento. Após a avaliação do sêmen coletado, ele foi centrifugado e o plasma seminal congelado. No final do período experimental (12 meses) o plasma seminal foi submetido à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10 e 14%, em paralelo com as análises dos seus parâmetros bioquímicos. No gel de poliacrilamida de 10% foram identificadas 22 bandas proteicas com pesos moleculares de 25 a 181 kDa, enquanto no gel de 14%, foram identificados 16 bandas proteicas com pesos moleculares de 5,7-165 kDa. Somente as frações proteicas de 5,7 e 34,3-34,5 kDa apresentaram um perfil variável com a sazonalidade reprodutiva da espécie caprina, com aumento da produção durante o período da estação reprodutiva. Nas análises dos parâmetros bioquímicos, foi observado que as concentrações do cálcio, fósforo e colesterol também apresentaram variação sazonal durante o período experimental. No entanto, as análises da motilidade progressiva do semen fresco e descongelado, assim como do teste hiposmótico no semen descongelado não apresentaram variação durante o período experimental ($P>0,05$). Estes resultados indicam que as mudanças no perfil proteico e bioquímico do plasma seminal durante o ano, não alterou a qualidade do sêmen fresco e descongelado de caprinos da raça Alpina criados em condições de clima tropical de altitude.

Palavras chaves: eletroforese, espermatozoide, macho caprino, minerais, proteínas.

Abstract: This study evaluated the monthly changes in the protein and biochemical profiles of seminal plasma of Alpine goats bred in a tropical climate of altitude. The assessment of progressive motility of spermatozoa was performed in fresh and thawed semen, while evaluating the functionality of the membrane (hyposmotic test) was performed after thawing. After evaluation of semen collected, it was centrifuged and frozen seminal plasma.

At the end of the experimental period (12 months), the seminal plasma was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of 10 and 14%, parallel with the analysis of their biochemical parameters. At a 10% polyacrylamide gel were identified 22 protein bands with molecular weights of 25-181 kDa, while the 14% gel were identified 16 protein bands with molecular weights of 5.7 to 165 kDa. Just the protein fractions of 5.7 and 34.3 to 34.5 kDa showed a varying profile with the reproductive seasonality of goats, with increased production during the breeding season. In the analysis of biochemical parameters was observed that the concentrations of calcium, phosphorus and cholesterol also showed seasonal variation during the experimental period. However, analysis of the progressive motility of fresh and thawed semen, as well as the hyposmotic test in thawed semen showed no change during the experimental period ($P>0,05$). These results indicate that changes in the protein and biochemical profiles of seminal plasma during the year did not alter the quality of fresh and thawed semen of Alpine goats raised in tropical climate of altitude.

Keywords: electroforesis, male goat, minerals, proteins, sperm.

1. Introdução

O plasma seminal é uma mistura complexa secretada pelos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, que pode influenciar a célula espermática na sua morfologia e congelabilidade (JOBIM et al., 2004), motilidade (VISON et al., 1996), capacitação, reação acrossômica (ROLDAN & SHI, 2007), além da sua capacidade de fertilização e o desenvolvimento embrionário (MONACO et al., 2009). Além das ações diretamente ligadas a regulação da função espermática, o plasma seminal também auxilia na proteção, manutenção e fornecimento de substratos metabolizáveis aos espermatozoides. Isso é possível, devido a sua composição molecular complexa e ainda pouco conhecida (YUE et al., 2009) que varia entre as espécies (RODGER, 1975).

Os componentes orgânicos mais pesquisados no plasma seminal são as proteínas, das quais muitas já foram identificadas, isoladas e caracterizadas (JOBIM et al. 2009; MOURA et al., 2011). A principal categoria de proteínas são aquelas secretadas pelas glândulas sexuais acessórias que se ligam a superfície (fosfolípidios) dos espermatozoides, modulam suas funções fisiológicas (MOURA et al., 2011) e preservam a membrana espermática durante o processo da congelamento seminal (JOBIM et., 2009). Essas proteínas são chamadas coletivamente de BSP (*Binder of Sperm Proteins*) e já foram identificadas em bovinos (JOBIM

et al., 2004), caprinos (VILLEMURE et al., 2003), ovinos (JOBIM et al., 2005), equinos (BRANDON et al., 1999) e suínos (SANZ et al., 1993). No entanto, outras proteínas também podem estar envolvidas na proteção das células espermáticas como antioxidantes (SCHÖNECK et al., 1996), ou relacionadas ao processo de motilidade (BAAS et al., 1983), maturação e capacitação espermática (SYLVESTER et al., 1991), e fertilização (GONÇALVES et al., 2007).

Os outros compostos que podem ser destacados no plasma seminal são os minerais. Eles são considerados como elementos essenciais ao sêmen, pois além de manterem o equilíbrio eletrolítico do plasma, participam da capacitação e maturação espermática (VISCONTI et al., 1998) e de diversos processos metabólicos agindo como cofatores enzimáticos (CATUNDA et al., 2009) ou como ativadores/reguladores de proteínas (VISCONTI et al., 1998).

No entanto, a estrutura do espermatozoide e o seu potencial de fertilização depende não só das proteínas seminais e minerais, mas também de sua composição lipídica na membrana plasmática e no plasma seminal. O colesterol é o composto lipídico em maior concentração no sêmen ejaculado de mamíferos, porém é encontrado principalmente nas membranas plasmáticas das células espermáticas (YEAGLE, 1993). Durante a maturação espermática, o epidídimo sintetiza altas quantidades de colesterol, o qual é transportado para as membranas plasmáticas, dando maior estabilidade e proteção contra o choque térmico e osmótico (YANAGIMACHI, 1994), e após a ejaculação, no trato reprodutivo da fêmea, é retirado da membrana permitindo que ocorra a capacitação espermática (VISCONTI et al., 1998). Portanto, a morfologia espermática, assim como, a sua viabilidade, maturação, funções e potencial de fertilização dependem da composição lipídica da membrana plasmática e do plasma seminal (BEER-LJUBIC et al., 2009).

Apesar da importância do plasma seminal na fertilização, poucos estudos detalham a presença e as possíveis funções dos componentes do plasma seminal caprino nas estações reprodutivas e não-reprodutivas. Esses elementos, e principalmente as proteínas, poderiam ser identificados como marcadores da capacidade reprodutiva do macho.

O conhecimento dos componentes bioquímicos do sêmen pode auxiliar na identificação de marcadores da capacidade reprodutiva do macho, permitindo assim, a melhor avaliação da fertilidade dos reprodutores e seleção de bodes doadores de sêmen. Além disso, como a espécie caprina apresenta sazonalidade reprodutiva, trabalhos nessa linha ajudam a definir a época do ano mais adequada para conservação do sêmen, e

também, desenvolver técnicas diagnósticas e terapêuticas na área de reprodução animal.

Assim, o objetivo com este trabalho foi avaliar se há variação sazonal anual dos minerais cálcio, fósforo e magnésio, das proteínas e do colesterol no plasma seminal de caprinos da raça Alpina criados em condições de clima tropical de altitude.

2. Material e métodos

2.1 Localização e animais

O experimento foi realizado durante doze meses (março/2012 a fevereiro/2013) no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (20°45'S, 42°52'W), Brasil, sob condições de iluminação natural. O clima da região é o de tropical de altitude do tipo Cwa (inverno seco e verão chuvoso), pela classificação climática de Köppen-Geiger, com temperatura média de 20,9 °C e índice pluviométrico de 1.221 mm³/ano. A amplitude do fotoperíodo foi de 13 horas e 50 minutos de luz para 10 horas e 50 minutos de escuridão no solstício de verão e 10 horas e 57 minutos de luz e 13 horas e 3 minutos de escuridão no solstício de inverno, havendo uma diferença de 2 horas e 13 minutos entre o “dia mais longo” e o “dia mais curto” no período experimental (ON, 2013). Nesta região, a estação reprodutiva é de março a julho (outono-inverno) (JAINUDEEN et al., 2004; THOMPSON, 2006).

Quatro machos adultos da raça Parda Alpina com idade de $3,4 \pm 1,9$ anos, e com fertilidade comprovada por monta natural foram criados em baias individuais, recebendo durante todo o período experimental a mesma alimentação volumosa composta de silagem de milho e concentrado proteico e energético, bem como sal mineral e água *ad libitum*, atendendo às exigências nutricionais da categoria de acordo com o National Research Council – NRC (2007).

2.2 Avaliação do sêmen e preparação do plasma seminal

Os ejaculados de todos os animais foram coletados quinzenalmente com o auxílio de uma vagina artificial sempre pela parte da manhã (7-8 h), utilizando como manequim um fêmea em estro, totalizando no fim do período experimental 108 ejaculados. A avaliação da motilidade progressiva do semen e o teste hiposmótico para avaliação da funcionalidade da membrana foram realizados de acordo com Yue et al. (2009) e Bittencourt et al. (2005), respectivamente.

Após a avaliação, o sêmen foi centrifugado a 1500 x G, por 10 minutos, em

temperatura ambiente, e em seguida, o sobrenadante foi centrifugado novamente nas mesmas condições. Posteriormente, as amostras de plasma de cada animal e de cada coleta foram acondicionadas em palhetas de plástico para congelação de sêmem (0,25 mL; IMV®) e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). No momento da avaliação, as palhetas foram descongeladas a 37 °C por dez segundos e separadas em doze tubos de polietileno de 2 mL. Assim, cada tubo continha um *pool* de plasma seminal de todos animais coletados no mesmo mês.

2.3 Determinação das concentrações de proteínas totais, minerais e hormônios sexuais no plasma seminal

Para a determinação das concentrações (mg/dL) de Ca^{+2} , P^{+6} , Mg^{+2} , colesterol e proteína total foram utilizado o método de calorimetria, com a utilização de *kits* comerciais da Invicto® (In Vitro Diagnóstica, Brasil) e um fotômetro Humalyzer Primus® (Human Diagnostics Worldwide, Alemanha), conforme as especificações do fabricante.

2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi realizado para determinar o perfil proteico durante doze meses e o peso molecular das proteínas do plasma seminal de caprinos. As doze amostras do plasma seminal foram submetidas ao SDS-PAGE de acordo com o método previamente descrito (HAMES, 1981) usando géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10% e 14%. As amostras foram misturadas a um tampão de amostra contendo Tris base 0,1 M, SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), glicerol 12% e β -mercaptoetanol 10%, e, aproximadamente, 30 μg de proteína de cada amostra foi aplicada no gel. Foram produzidos dois géis para cada concentração (10 % e 14%), os quais correram ao mesmo tempo em um sistema de eletroforese Mini-PROTEAN® (BIO-RAD®, Richmond, USA), sendo o primeiro composto pelas amostras dos meses que compõem o período de estação reprodutiva (março a agosto), e o segundo, composto pelas amostras que compõem o período de estação não-reprodutiva (setembro-fevereiro). Nos dois géis, foi adicionado ainda um marcador padrão de peso molecular Broad Range® (BIO-RAD, Richmond, USA) composto por miosina (200 kDa), β -galactosidade (116,2 kDa), glicogênio fosforilase b (97,4 kDa), soro albumina bovina (BSA) (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

Após a migração eletroforética, os géis foram imersos em solução fixadora contendo ácido acético glacial 10% (v/v) e metanol 50% (v/v), por trinta minutos. Posteriormente, eles foram corados em solução contendo de sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8% (v/v), Coomassie Brilliant Blue G-250 0,08% e metanol 30% (v/v) por 40 minutos, e descorados em solução contendo ácido acético 5% (v/v) durante 72 horas.

2.5 Aquisição da imagem e análise dos dados

As imagens dos géis foram analisadas para determinar o peso molecular das proteínas seminais usando o programa computacional Quantity One® (version 4.6, Bio-Rad, USA).

3. Resultados e discussão

Na Figura e Tabela 1, foram apresentados os pesos moleculares aproximados da proteínas do plasma seminal de caprinos da raça Alpina durante o período experimental em géis de poliacrilamida de 10 e 14%. A diferença entre a distribuição e separação das bandas eletroforéticas nos géis A-B e os géis C-D é devido as percentagens das malhas dos géis. Assim, os géis de poliacrilamida de 10% (imagens A-B) separam e destacam com maior nitidez as bandas de maior peso molecular, enquanto os géis de 14 % (imagens C-D) separam aquelas de menor peso molecular.

Os resultados da avaliação o plasma seminal mostram que um total de 22 bandas protéicas foram identificadas nos géis de poliacrilamidade de 10% com pesos moleculares entre 25,1 e 181,9 kDa, enquanto nos géis de 14% foram identificadas 16 bandas proteicas com pesos moleculares entre 5,7 e e 165,2 kDa. As proteínas com peso molecular abaixo de 30 kDa foram minorias, diferentemente do verificado por Jobim et al. (2005) e Yue et al. (2009) ao trabalharem com ovino. No entanto, os dados obtidos nesse trabalho assemelham-se com os de Barrios et al. (2000), que trabalhando com ovinos verificaram 20 proteínas no plasma seminal, sendo a maioria abaixo de 70 kDa. Segundo Yue et al. (2009) as diferenças encontradas nos pesos moleculares pode ser influência não só da estação reprodutiva, mas também da raça e dos métodos de coleta e preparação do plasma seminal.

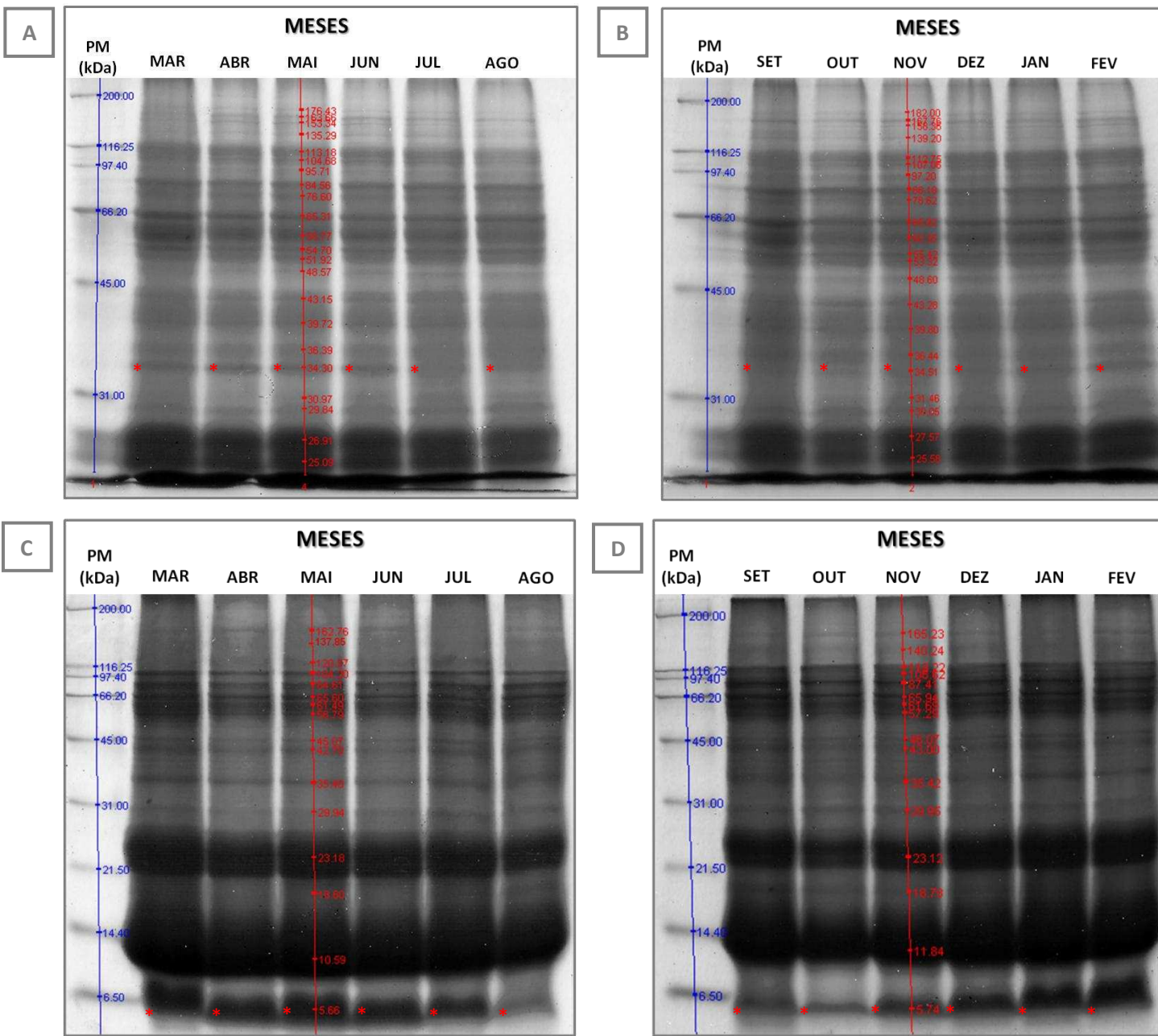


Figura 1: perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos durante doze meses em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 10 e 14 % (SDS-PAGE). A: gel 10% com os meses de março, abril, maio, junho, julho e agosto; B: gel 10% com os de meses setembro, outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro; C: gel 14% com os meses de março, abril, maio, junho, julho e agosto; D: gel 14% com os meses de setembro, outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro. À esquerda de cada imagem encontram-se as proteínas com os pesos moleculares (PM; kDa) conhecidos do marcador padrão Broad Range® (BIO-RAD, Richmond, USA). Os géis SDS-PAGE foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Padrões de peso molecular Broad Range® (BIO-RAD, Richmond, USA): miosina (200 KDa), β -galactosidade (116,2 KDa), glicogênio fosforilase b (97,4 KDa), soro albumina bovina (BSA) (66,2 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 KDa) e lisozima (14,4 KDa).

Tabela 1 - Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos durante doze meses em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 10% (SDS-PAGE)

Géis SDS-PAGE 10 %													
PM (kDa)	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	PM (kDa)	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV
176,4	+	+	+	+	+	+	182,0	+	+	+	+	+	+
163,7	+	+	+	+	+	+	167,8	+	+	+	+	+	+
153,3	+	+	+	+	+	+	158,3	+	+	+	+	+	+
135,3	+	+	+	+	+	+	139,2	+	+	+	+	+	+
113,2	++	++	++	++	++	++	112,8	++	++	++	++	++	++
104,7	+	+	+	+	+	+	107,1	+	+	+	+	+	+
95,7	+	+	+	+	+	+	97,2	++	++	++	++	++	++
84,6	++	++	++	++	++	++	86,2	++	++	++	++	++	++
76,6	++	++	++	++	++	++	78,6	++	++	++	++	++	++
65,3	++	++	++	++	++	++	65,8	++	++	++	++	++	++
58,8	++	++	++	++	++	++	60,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
54,7	+	+	+	+	+	+	55,4	+	+	+	+	+	+
51,9	++	++	++	++	++	++	53,3	++	++	++	++	++	++
48,6	+	+	+	+	+	+	48,6	+	+	+	+	+	+
43,2	++	++	++	++	++	++	43,3	++	++	++	++	++	++
39,7	++	++	++	++	++	++	39,8	++	++	++	++	++	++
36,4	++	++	++	++	++	++	36,4	++	++	++	++	++	++
34,3	++	++	++	++	+	+	34,5	+	+	+	++	++	++
30,9	+	+	+	+	+	+	31,5	+	+	+	+	+	+
29,8	++	++	++	++	++	++	30,1	++	++	++	++	++	++
26,9	++++	++++	++++	++++	++++	++++	27,6	++++	++++	++++	++++	++++	++++
25,1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	25,6	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Tabela 2 - Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal de caprinos durante doze meses em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio 14 % (SDS-PAGE)

Géis SDS-PAGE 14 %													
PM (kDa)	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	PM (kDa)	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV
162,8	+	+	+	+	+	+	165,2	+	+	+	+	+	+
137,9	+	+	+	+	+	+	140,2	+	+	+	+	+	+
120,6	+	+	+	+	+	+	119,2	+	+	+	+	+	+
104,2	+	+	+	+	+	+	106,6	+	+	+	+	+	+
84,6	+	+	+	+	+	+	87,4	+	+	+	+	+	+
65,6	+	+	+	+	+	+	65,9	+	+	+	+	+	+
61,5	+	+	+	+	+	+	61,7	+	+	+	+	+	+
56,8	+	+	+	+	+	+	57,3	+	+	+	+	+	+
45,1	+	+	+	+	+	+	46,1	+	+	+	+	+	+
42,7	+	+	+	+	+	+	43,0	+	+	+	+	+	+
35,4	+	+	+	+	+	+	35,4	+	+	+	+	+	+
29,9	+	+	+	+	+	+	29,9	+	+	+	+	+	+
23,2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	23,1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
18,6	+	+	+	+	+	+	18,8	+	+	+	+	+	+
10,6	++++	++++	++++	++++	++++	++++	11,8	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5,7	+++	+++	+++	+++	+++	+	5,7	+	+	++	++	+++	+++

Na tabela 3, são apresentados a luminosidade (h) na região de Viçosa/MG-Brasil (20°45'20''S e 42°52'40''W), as divisões das estações sexuais entre os meses nessa região, os valores de motilidade progressiva (0-100%) do sêmen fresco e descongelado, e os valores do teste hiposmótico (%) do sêmen descongelado.

Analisando as imagens da Figura 1, pode-se observar que todas as frações protéicas identificadas são observadas durante todo o período experimental. No entanto, a banda de peso molecular 5,7 kDa, que pode ser visualizada nas imagens C e D (Figura 1), apresentou uma produção irregular durante o ano, destacando-se durante o período de Estação Reprodutiva (março-agosto; Tabela 2). As proteínas decapacitantes possuem massa molecular em torno de 5-10 kDa e evitam a capacitação espermática causada precocemente pelo congelamento dos espermatozoides, pois previnem o aumento da concentração de cálcio no interior dos espermatozoides (FLESCH & GADELLA, 2000). Para Jobim et al. (2003), proteínas de baixa massa molecular (<15kDa) estão envolvidas na manutenção da motilidade espermática, e segundo Ashworth et al. (1994), o efeito protetor do plasma seminal em ovinos é determinado pelas proteínas que possuem peso molecular de 5-10 kDa.

Nesse trabalho, foi identificada uma banda proteica de 10,6-11,8 kDa, podendo se destacar a sua grande concentração durante todo o período experimental conforme a Figura 1 (Imagem C-D). Uma das proteínas responsáveis pela ação protetora das células espermáticas, destaca-se a proteína ácida do fluído seminal (aSFP; 11-12 kDa), a qual possui ação antioxidante na peroxidação lipídica da membrana plasmática, e assim, preserva a viabilidade dos espermatozoides (SCHÖNECK et al., 1996; JOBIM et al., 2003). Além disso, as aSFP possuem um papel de “proteção” dos receptores dos espermatozoides que se ligam a zona pelúcida, e devem ser retirados da membrana plasmática antes da interação dos gametas (DOSTALOVA et al., 1994).

As bandas de peso molecular entre 18,6-18,8 e 23,1-23,2 kDa (Imagens C e D) podem corresponder as proteínas ligadoras de fosfolipídios, coletivamente nomeadas de BSPs (*Binder of Sperm Proteins*), as quais possuem peso molecular entre 15-17 kDa (BSP A1/A2) e são encontradas no plasma seminal de reprodutores bovinos de alta congelabilidade (JOBIM et al., 2004). Villemure et al. (2003) verificou quatro bandas protéicas homólogas às BSPs no sêmen caprinos com pesos moleculares de 14, 15, 20 e 22 kDa e as denominou de GSPs. As BSPs são sintetizadas pelas glândulas acessórias e, no momento da ejaculação, se ligam aos espermatozoides para posteriormente promover a capacitação com a retirada de colesterol

Tabela 3 - Médias e desvio padrão da luminosidade (h), motilidade progressiva (0-100%) dos sêmens fresco e congelado, na região de Viçosa/MG-Brasil (20°45'20''S e 42°52'40'' W), durante o período experimental (Médias $\pm$ SE)

Período	Luminosidade (20°45'20''S e 42°52'40'' W)	Estação Sexual*	Sêmen fresco	Sêmen descongelado	
			Motilidade (0-100 %)	Motilidade (0-100 %)	Hiposmótico (%)
Março	12,23 $\pm$ 0,03 ^f	Reprodutiva	85,8 $\pm$ 1,49 ^a	45,4 $\pm$ 2,42 ^a	42,91 $\pm$ 4,61 ^a
Abril	11,63 $\pm$ 0,03 ^h	Reprodutiva	84,4 $\pm$ 1,75 ^a	45,0 $\pm$ 4,12 ^a	44,43 $\pm$ 5,80 ^a
Maio	11,15 $\pm$ 0,02 ⁱ	Reprodutiva	85,0 $\pm$ 1,89 ^a	46,3 $\pm$ 3,87 ^a	33,88 $\pm$ 2,81 ^a
Junho	10,91 $\pm$ 0,01 ^l	Reprodutiva	83,8 $\pm$ 1,57 ^a	40,6 $\pm$ 3,95 ^a	42,57 $\pm$ 5,21 ^a
Julho	11,05 $\pm$ 0,02 ^k	Reprodutiva	80,7 $\pm$ 2,02 ^a	41,4 $\pm$ 5,95 ^a	42,50 $\pm$ 4,41 ^a
Agosto	11,46 $\pm$ 0,03 ⁱ	Reprodutiva	84,6 $\pm$ 1,79 ^a	43,2 $\pm$ 4,92 ^a	41,22 $\pm$ 5,95 ^a
Setembro	12,02 $\pm$ 0,03 ^g	Não-reprodutiva	84,4 $\pm$ 2,74 ^a	41,9 $\pm$ 2,66 ^a	38,90 $\pm$ 5,91 ^a
Outubro	12,62 $\pm$ 0,03 ^e	Não-reprodutiva	82,5 $\pm$ 2,83 ^a	43,8 $\pm$ 3,75 ^a	43,43 $\pm$ 3,98 ^a
Novembro	13,14 $\pm$ 0,02 ^c	Não-reprodutiva	80,0 $\pm$ 2,11 ^a	35,6 $\pm$ 3,71 ^a	37,25 $\pm$ 5,09 ^a
Dezembro	13,39 $\pm$ 0,00 ^a	Não-reprodutiva	80,0 $\pm$ 2,50 ^a	36,3 $\pm$ 4,20 ^a	41,14 $\pm$ 6,62 ^a
Janeiro	13,26 $\pm$ 0,02 ^b	Não-reprodutiva	79,6 $\pm$ 2,08 ^a	41,7 $\pm$ 2,97 ^a	42,44 $\pm$ 5,31 ^a
Fevereiro	12,80 $\pm$ 0,03 ^d	Não-reprodutiva	85,0 $\pm$ 2,50 ^a	48,1 $\pm$ 3,77 ^a	47,75 $\pm$ 5,50 ^a

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (P<0,05);

*Conforme Jainudeen et al. (2004), Thompson (2006) e observações do autor.

Tabela 4 - Médias mensais dos parâmetros bioquímicos e do perfil proteico do plasma seminal de caprinos da raça Parda Alpina durante doze meses

Parâmetros	Estação reprodutiva							Estação não-reprodutiva						
	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	Média	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	Média
Ca ⁺² (mg/dL)	14,1	15,1	15,0	15,4	14,2	10,1	14,0	11,8	10,9	10,7	11,5	13,4	14,2	12,1
P ⁺⁶ (mg/dL)	9,0	6,8	7,8	7,3	9,3	7,4	7,9	6,9	11,4	11,3	8,5	9,1	9,3	9,4
Mg ⁺² (mg/dL)	5,3	5,2	5,3	5,3	5,5	5,5	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,3	5,4	5,4
CLT (mg/dL)	41,0	42,0	44,0	49,0	60,0	58,0	49	55,0	76,0	77,0	65,0	59,0	54,0	64
PT (g/dL)	4,2	4,3	4,1	4,1	3,8	2,8	3,9	2,9	4,2	3,9	3,7	4,1	3,7	3,8

CLT: colesterol; PT: proteínas totais;

e fosfolipídios da membrana plasmática (THÉRIEN et al., 1999). Yue et al. (2009) e Rueda et al. (2013) obtiveram correlação ($r = 0,47$ e $r = 0,64$, respectivamente) das bandas protéicas 18,7 e 16,2 kDa do plasma seminal com viabilidade espermática. Segundo Jobim et al. (2009) as BSPs podem ainda proteger as propriedades da membrana espermática durante o processo de criopreservação, auxiliando na recuperação da permeabilidade da membrana plasmática, após ser submetida ao choque pelo frio (BARRIOS et al., 2000).

Chacur & Machado Neto (2007) trabalhando com bovinos verificaram uma banda protéica de 26 kDa durante o verão, porém de acordo com os dados apresentados na Figura 1 (Imagens A-B) as bandas protéicas próximas a esse valor (25,1-26,9 kDa) observadas no plasma seminal caprino foram presentes durante todo o período experimental. Essa banda pode ser a proteína prostaglandina D sintase, classe lipocalina, de 25-26 kDa que foi apontada como um indicador de baixa congelabilidade no semen bovino (JOBIM et al. 2009). Yue et al. (2009) encontraram correlações de $r = -0,535$ e $r = -0,398$ entre uma banda protéica de 25,37 kDa e a motilidade e o pH espermático ovino, respectivamente, sendo que os autores lembram que proteínas que diminuem os valores do pH seminal são prejudiciais à sobrevivência espermática. Por outro lado, segundo alguns autores, a proteína clusterina também possui peso molecular próximo à 25,35 kDa e seu efeito não seria prejudicial às células espermáticas (PANKHURST et al., 1998). Essa proteína estaria responsável pela redistribuição lipídica na membrana plasmática e, portanto, envolvida nos processos de maturação espermática (SYLVESTER et al., 1991) e proteção na criopreservação (JOBIM et al., 2004).

A banda protéica de 34,3-34,5 kDa da mesma forma que a 5,7 kDa apresentou uma produção irregular durante o ano, diminuindo sua concentração durante uma parte do período não-reprodutivo (agosto a outubro) (Figura 1; imagens A-B). No entanto, não se observa ausência completa dessa banda em nenhum mês, mas apenas uma diminuição da sua concentração, e consequentemente, menor visualização de agosto à fevereiro (Tabela 2). As frações protéicas de 5,7 e 34,3-34,5 kDa parecem ser influenciadas pela sazonalidade do fotoperíodo, o que poderia ter grande influência sobre a qualidade seminal durante o ano. Porém, de acordo com os dados de motilidade progressiva tanto do sêmen fresco quanto descongelado (Tabela 2), não se observou alterações nesse parâmetro ($P > 0,05$) durante o período experimental.

Nas imagens A, B, C e D da Figura 1 pode-se observar a presença das bandas protéicas de 65,6-65,9 kDa, as quais podem corresponder à proteína albumina seminal que

possui peso molecular de 66 kDa. Para essa proteína são atribuídas várias ações no sêmen, como, estimulação da motilidade espermática (BAAS et al., 1983), antioxidante como a aSFP e auxílio a capacitação espermática como as BSPs (THÉRIEN et al., 1999). A capacitação espermática é um processo essencial e necessário que os espermatozoides têm que passar para fecundar os oócitos eficientemente. Dentre as proteínas do plasma seminal que estão relacionadas ao processo de fertilização destaca-se a osteopontina (OPN; 55 kDa), que na imagem A-B da Figura 1, poderia ser considerada a banda protéica de 54,7-55,4 kDa. Ela permite a interação do espermatozoide e oócito (GONÇALVES et al., 2007), fertilização e desenvolvimento embrionário (MOURA et al., 2006; MONACO et al., 2009)

A perda da integridade da membrana plasmática do espermatozoide, principalmente durante o processo de criopreservação e descongelamento, pode levar a uma queda da motilidade espermática (HOLT, 2000). Somado a isso, a sazonalidade reprodutiva pode também interferir na síntese e liberação no plasma seminal das proteínas que têm a função de proteger (SCHÖNECK et al., 1996), estimular (BAAS et al., 1983) e auxiliar as funções espermáticas (GONÇALVES et al., 2007). Segundo Correa et al. (1997), a motilidade e o vigor são os principais e mais comuns parâmetros utilizados na avaliação andrológica para prever a qualidade seminal, pois apresentam correlação positiva com a fertilidade do sêmen (CORREA et al., 1997). De acordo com os dados da Tabela 3, a motilidade progressiva do sêmen fresco e descongelado não demonstrou diferença ($P > 0,05$) entre os meses, assim como teste hiposmótico após o descongelamento, o qual avaliou funcionalidade da membrana plasmática. Assim, devido à sazonalidade ocorreram algumas mudanças no perfil proteico do plasma seminal caprino, porém não houve registro de prejuízos da qualidade tanto do sêmen fresco quanto do descongelado (Tabela 3).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e do perfil protéico verificados no plasma seminal de caprinos da raça Alpina durante doze meses estão apresentados na Tabela 4.

O mineral em maior concentração foi o cálcio, seguido pelo fósforo e depois pelo magnésio. Na Tabela 4, pode ser observado uma variação sazonal do cálcio durante o ano, com maiores concentrações durante a estação reprodutiva (março-agosto) e menores durante o anestro (setembro-fevereiro). Essa maior concentração durante a estação reprodutiva das fêmeas pode ser devido as diversas funções que o cálcio têm na fisiologia reprodutiva, como por exemplo, na ativação de proteínas que participam do processo de mobilização de energia nas células espermáticas (POZZAN et al., 1994), e também na capacitação e reação acrossomal do espermatozoide que são processos essenciais para que

ocorra a fertilização (VISCONTI et al., 1998).

Nesse trabalho, o fósforo apresentou maior média durante a estação de anestro (Tabela 4). A deficiência de fósforo pode ocasionar infertilidade, pois este mineral participa do metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BACILA, 1980). Assim, a sua diminuição na concentração durante o período reprodutivo pode ser devido a grande utilização do fósforo nos processos metabólicos durante esse período. Já o magnésio além de auxiliar na estabilidade da membrana espermática (PINHEIRO et al., 1996b), também atua como cofator enzimático em diversas reações do metabolismo energético e síntese de ácidos nucleicos (CATUNDA et al., 2009), porém, manteve-se estável no plasma seminal durante todo o ano (Tabela 4).

Catunda et. al (2009) e Aguiar et al. (2013) trabalhando com caprinos criados em clima tropical também verificaram maiores concentrações de cálcio em relação ao fósforo e magnésio, porém não foi observada diferenças entre as estações reprodutivas como neste trabalho, mas sim entre as estações chuvosas e secas. Pinheiro et al. (1996b) também sugerem que o índice pluviométrico pode influenciar o equilíbrio eletrolítico do semen caprino, correlacionando o período chuvoso e a produção de pastagens em maior quantidade e qualidade. Já Rodrigues (1997) e Kaya et al. (2002) comentam que o método de coleta (vagina artificial e eletroejaculador) e a frequência de coleta é que poderiam influenciar nas variações bioquímicas do plasma seminal de caprinos e ovinos. No entanto, nesse trabalho, a alimentação foi balanceada, controlada e padronizada durante todo o período experimental, assim como todas as coletas seminais foram realizadas com uma mesma metodologia, por meio de vagina artificial. Assim, pode-se inferir que as alterações dos parâmetros bioquímicos e do perfil proteico do plasma seminal de caprinos da raça Alpina durante os doze meses do ano pode ter sido, em parte, devido à outros fatores ambientais, como temperatura ambiente, umidade relativa e, principalmente, fotoperíodo.

A diminuição das concentrações do colesterol no plasma seminal (Tabela 4) durante a estação reprodutiva também pode ser devido ao aumento da produção e proteção das células espermáticas, que tendem a ter maior qualidade nesta período. O colesterol mantém a estabilidade das membranas e é responsável pela resistência da mesma ao choque pelo frio conforme a razão colesterol:fosfolipídio existente. Assim, a concentração de colesterol nas membranas plasmáticas dos espermatozoides poderia estar maior que no meio (plasma seminal), uma vez que algumas proteínas presentes no semen, como a clusterina, têm a função de transportar os lipídios e redistribuí-los na membrana plasmática (PANKHURST et

al., 1998; JOBIM et al., 2004)

Os valores de proteína total no plasma seminal durante a estação reprodutiva não foram superiores verificados entre as estações reprodutivas, assim como registrado por Pinheiro et al. (1996a) e diferente dos dados apresentados por Aguiar et al. (2013). De acordo com a Tabela 3 e Figura 1 (Imagnes C-D), a diminuição da presença das proteínas de baixo peso molecular no plasma seminal (5,6-5,7 kDa) pode ter contribuído para as menores concentrações protéicas do plasma nos meses de agosto e setembro. No entanto, como descrito anteriormente, as mudanças no perfil proteico do plasma seminal caprino durante o período experimental, não alterou a qualidade do sêmen fresco e descongelado (Tabela 2).

4. Conclusão

Nos géis de poli-acrilamida de 10 e 14% foram identificadas, respectivamente, 22 e 16 bandas protéicas no plasma seminal, e somente aquelas de peso molecular 7,5 e 34,3-34,5 kDa apresentaram sazonalidade e aumento da produção durante o período da estação reprodutiva. As concentrações do cálcio, fósforo e colesterol também apresentaram variação sazonal durante o período experimental. No entanto, as mudanças no perfil proteico e bioquímico do plasma seminal durante o ano, não prejudicaram a qualidade do sêmen fresco e descongelado dos caprinos da raça Alpina criados em condições de clima tropical de altitude.

5. Referências bibliográficas

AGUIAR, G. V.; VAN TILBURG, M. F.; CATUNDA, A. G. V.; CELES, C. K. S.; LIMA, I. C. S.; CAMPOS, A. C. N.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.1, p.6-12, 2013.

ASHWORTH, P. J.; HARRISON, R. A.; MILLER, N. G.; PLUMMER, J. M.; WATSON, P. F. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction and Fertility and Development**, v.6, n.2, p.173-180, 1994.

BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the

viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.68, p.275-280, 1983.

BACILA, M. Bioquímica da reprodução In: BACILA, M. (Org.). **Bioquímica veterinária**. São Paulo: J. M. Varela Livros, 1980. p.395-423.

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

BEER-LJUBIC. B.; ALADROVIC, J.; MARENJAK, T. S.; LASKAJ, R.; MAJIC-BALIC, I.; MILINKOVIC-TUR, S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. **Theriogenology**, v.72, p.1132–40, 2009.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p.213-218, 2005.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A.; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, n.5, p.863-873, 1999.

CATUNDA, A. G. V.; CAMPOS, A. C. N.; PEREIRA, J. F.; LIMA, I. C. S.; ARAÚJO, A. A.; MARTINS, G. A. Variação mensal nas concentrações de macroelementos no plasma seminal de caprinos criados em clima tropical úmido. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, p.1177-1185, 2009.

CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros limousin. **Veterinária Notícias**, v.13, n.1, p.47-53, 2007.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. P. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-31, 1997.

DOSTALOVA, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; HETTEL, C.; RIEDEL, D.; SCHONECK, C.; EINSPANIER, R.; TOPFER-PETERSEN, E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacited bull spermatozoa. **Biological Chemistry**, v.375, p.457-461, 1994.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.

GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. D.; KILLIAN, G. J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α_v and α_5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.468-474, 2007.

HAMES, B. D. **An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. Gel electrophoresis of proteins.** Oxford: IRL Press, 1981. p.1-92.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3–22, 2000.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E. S. E. e HAFEZ, B. (Org.). **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole. Cap.12, p.173-182, 2004.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O. G.; WALD, V. B.; MATTOS, R. C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n.1, p.21-30, 2003.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255-266, 2004.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; HORN, A. P.; MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v.63, p.2053–2062, 2005.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas à congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.25-31, 2009.

KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. **Small Ruminant Research**, v.44, p.153-158, 2002.

MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, v.71, p.450-457, 2009.

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

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.139-144, 2011.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academy Press, 2007. 362p.

ON - Observatório Nacional. **Anuário interativo do Observatório Nacional**. Disponível em: <<http://www.on.br>> Acessado em 07/03/2013.

PANKHURST, J. G.; BENNET, C. A.; EASTERBROOK-SMITH, S. B. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. **Biochemistry**, v.7, p.4823-4830, 1998.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de 3 tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33, 1996, Fortaleza, CE. **Anais ... Fortaleza: SBZ**, p.416-

418, 1996a.

PINHEIRO, R. R.; MALHADO, R.; PINHEIRO, A. A.; SIMPLÍCIO, A. A. Níveis de cálcio, fósforo, magnésio e pH do sêmen de caprino no Nordeste do Brasil In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 33, 1996, Fortaleza, CE. **Anais ... Fortaleza: SBZ**, p.419-420. 1996b.

POZZAN, T.; RIZZUTO, R.; VOLPE, P.; MELDOLESI, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. **Physiological Reviews**, v.74, n.3, p.595-636, 1994.

RODGER, J. C. Seminal plasma, an unnecessary evil? **Theriogenology**, v.3, n.6, p.237-247, 1975.

RODRIGUES, L. F. S. **Efeito do método de colheita sobre os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de caprinos mestiços e ovinos deslanados da raça Santa Inês criados no Estado do Ceará**. 1997. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 1997.

ROLDAN, E. R.; SHI, Q. X. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v.2, p.89-104, 2007.

RUEDA, F. L.; HERRERA, R. F.; ARBELÁEZ, L. F.; GARCÉS, T.; VELASQUEZ, H.; PEÑA, M. A.; CARDOZO, J. A. Increase in post-thaw viability by adding seminal plasma proteins to Sanmartinero and Zebu sperm. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.26, n.2, p.98-107, 2013.

SANZ, L.; CALVETE, J. J.; MANN, K.; GABIUS, H. J.; TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of heparin binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.35, p.37–43, 1993.

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

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

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.59, p.768-776, 1999.

THOMPSON, F. N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: REECE, W. O. (Org.). **Dukes-Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 39, p.644-669.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, 39–50, 2003.

VINSON, G. P.; MEHTA, J.; EVANS, S.; MATTHEWS, S.; PUDDEFOOT, J. R.; SARIDOGAN, E.; HOLT, W. V.; DJAHANBAKHCH, O. Angiotensin II stimulates sperm motility. **Regulatory Peptides**, v.67, p.131-135, 1996.

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G. D.; BAILEY, J. L.; NING, X. P.; FORNES, M.; KOPF, G. S. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v.19, p.242-248, 1998.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J. D. (Org.). **Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press Ltda, 1994. p.189-317.

YEAGLE, P. L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.822, p.267-87, 1993.

YUE, W.; SHI, L.; BAI, Z.; REN, Y.; ZHAO, Y. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of RAM seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.386-391, 2009.

CONCLUSÕES GERAIS

O fotoperíodo é uma variável ambiental de grande importância na fisiologia reprodutiva e o seu correto controle pode permitir ganhos na produção animal. Outros fatores, como a nutrição, temperaturas e interações sociais são considerados apenas como moduladores da reprodução. Dessa forma, é possível utilizar as espécies sazonais de interesse zootécnico em programas de iluminação artificial, permitindo um manejo reprodutivo que leve a uma produção de produtos de origem animal dessas espécies sem periodicidade anual.

Os mecanismos fisiológicos que são responsáveis pelas alterações endócrinas, reprodutivas e comportamentais nos animais sazonais conforme as variações anuais do fotoperíodo ainda não estão totalmente esclarecidas. No entanto, sabe-se que a melatonina é um hormônio sintetizado principalmente durante o período de escuro e pode influenciar na fisiologia reprodutiva desses animais de forma direta ou indireta. Esse hormônio pode tanto regular a síntese de gonadotrofinas e estas agirem nos testículos estimulando a esteroidogênese e gametogênese, quanto pode agir diretamente nos órgãos reprodutores, plasma seminal/espermatozoides e folículos.

A síntese de melatonina aumenta durante a estação reprodutiva dos caprinos e ovinos, a qual segue um padrão sazonal anual regulada pelo fotoperíodo. Apesar do volume seminal, da qualidade seminal e da concentração de testosterona serem maiores na estação reprodutiva (final do verão e outono), os menores valores destes parâmetros nas outras épocas do ano não são responsáveis por mudanças na qualidade e quantidade do sêmen que possam prejudicar a fertilização. No entanto, o conhecimento destas variações sazonais auxilia nas tomadas de decisões zootécnicas.