Camila Eduardo Marinho

A cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae) como modelo experimental para o estudo do envolvimento de peptidases na sobrevivência de espermatozóides

São Paulo

2007

Camila Eduardo Marinho

A cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae) como modelo experimental para o estudo do envolvimento de peptidases na sobrevivência de espermatozoides

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira**

Co-orientadora: **Prof^a. Dr^a. Selma Maria Almeida Santos**

São Paulo

2007

Marinho, Camila Eduardo

A cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae) como modelo experimental para o estudo do envolvimento de peptidases na sobrevida de espermatozóides
115 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

1. Peptidases 2. espermatozóides 3.
Crotalus durissus terrificus I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira
Orientador

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (bolsa de mestrado 08/2005 a 06/2006) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (bolsa de mestrado 07/2006 a 06/2007, processo nº 05/03745-0 e auxílio à pesquisa, processo nº 04/14971-9).

Dedico este trabalho à minha mãe **Sueli Eduardo Marinho**, por seu amor diário, que me fortaleceu na construção desta dissertação, ao meu pai **Marco de Jesus Marinho**, por me ajudar a concluir este sonho e a minha irmã **Daniela Eduardo Marinho**, que sempre me apóia em meus objetivos. Estas três pessoas foram de fundamental importância para minha persistência em direção aos meus ideais.

Dedico especialmente a minha fé em **Deus** que me ajudou a trilhar esse lindo percurso.

“Se você crê firmemente numa coisa, ela acontece; e é a crença na coisa que a leva a acontecer”

Frank Lloyd Wright

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Flávio Silveira** que sempre me ensinou a compreender desde a pesquisa básica até o próprio sentido da vida, seja na reflexão crítica dos próprios ideais ou na conquista destes, o que veio a se tornar um lema em minha vida, colaborando significativamente no resultado dos objetivos por mim alcançados. Aprendi a priorizar meus ideais e a construção do meu futuro, sempre semeando no presente.

À minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Selma Maria Almeida-Santos** por seu valioso conhecimento científico e, principalmente, por seu amor a profissão, motivo pelo qual me inspirou a construção de uma carreira científica.

“A verdadeira educação consiste em pôr a descoberto ou fazer atualizar o melhor de uma pessoa. Que livro melhor que o livro da humanidade?”

Mahatma Gandhi

“São três as coisas que preenchem a existência humana: a vontade, o trabalho e o sucesso. A vontade abre a porta para o sucesso. O trabalho passa por essa porta e no fim da jornada o sucesso entra para coroar os esforços do indivíduo”

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. José Eduardo P. W. Bicudo, por sua receptividade que me proporcionou atuar no Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo (USP).

Ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, coordenador da pós-graduação, por sua presteza nas minhas diversas dúvidas para a conclusão desta dissertação.

Ao Prof. Sávio S'antanna, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por estar sempre disposto a me ajudar, desde o momento em que selecionava as cascavéis até amenizar as dúvidas surgidas sobre estes animais.

À Prof^a. Dr^a. Sylvia Mendes Carneiro, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por colaborar na obtenção do prostassoma-símile.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Breno, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, por sua paciência ao me ensinar os cuidados básicos do manuseio de serpentes e por seu constante apoio profissional e pessoal.

À Rafaela Fadoni Alponi Vendrame, amiga especial, presente em meu cotidiano de laboratório e que sempre estará ao meu lado com sua fiel amizade.

Ao Leonardo Zambotti Villela, pessoa de virtuosa paciência, inteligência e boa vontade, a quem eu agradeço muito, pois colaborou significativamente no desenvolvimento desta dissertação.

À Joyce Siqueira Villarroel, companheira de laboratório muito especial, que me ajudou muito na última etapa desta dissertação.

À Simone Cristina Yamasaki e Juliana Marton Barone, pela companhia diária no laboratório.

À Renata do Amaral Olivo, por sua disposição em me auxiliar nas dúvidas que surgiram no decorrer do desenvolvimento desta dissertação.

À Milene Schmidt Luna, grande amiga que sempre me apóia e me incentiva em meus objetivos profissionais.

Ao Leandro de Magalhães, valioso amigo, por nossas constantes conversas sempre produtivas.

Ao Gustavo Yuzo Ujikawa e Wyara Aparecida, por sua amizade.

À Joana Darc Carvalho Vieira, secretária do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, e Roseli Silva Santos, secretária da Fisiologia do IB/USP, pela dedicação e auxílio.

Aos integrantes da Unidade de Inflamação, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, em especial, Cristina Maria Fernandez, Marlos Carlos Sampaio, Márcio Hideki Matsubara, Sérgio Augusto de Lima, Vanessa Moreira, Elbio Leiguez Junior, Neide Galvão do Nascimento e Pollyana C.M. de Castro Souto.

Aos técnicos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Valdir José Germano, João Carlos Ferreira dos Santos e Antônio Carlos Barbosa por sua dedicação, profissionalismo e cuidado com as cascavéis utilizadas nesta dissertação.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, Wilson de Barros D Àvila, Wanda Regina Carrella da Silva, Maria Zelma da Silva, Maria Aparecida da Silva e todos os demais que fizeram parte da minha rotina e que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

RESUMO

MARINHO, C.E. A cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae) como modelo experimental para o estudo do envolvimento de peptidases na sobrevivência de espermatozóides. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Na cascavel *Crotalus durissus terrificus* ocorre o armazenamento de longo prazo do esperma (LTSS), no trato genital da fêmea, durante o intervalo entre a cópula (outono) e a ovulação (primavera). Peptídeos e peptidases estão entre os principais componentes que influenciam a atividade espermática em mamíferos. O presente estudo objetivou caracterizar a presença de peptidases em *C. d. terrificus*, com esta função reconhecida em mamíferos e/ou que clivam peptídeos atuantes nesta função, bem como avaliar a hipótese do envolvimento destas peptidases na preservação dos espermatozóides desta serpente. O aspecto morfo-funcional dos espermatozóides foi comparado na presença dos peptídeos angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP) e hormônio liberador de tireotrofina (TRH). Caracterizamos os efeitos de agentes quelante, tiol-redutor, cofator e inibidores, bem como dos peptídeos supracitados, sobre as atividades enzimáticas relacionadas, quais sejam: aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil sensível (APN-PS) e insensível à puromicina (APN-PI), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I) e prolil-imino- (PIP), bem como da prolil endopeptidase (POP), em frações solúvel (FS) e/ou de membrana solubilizada (FM) do sêmen proveniente do ducto deferente, assim como deste próprio tecido e dos tecidos uterino e vaginal de *C. d. terrificus*, ou seja, tecidos por onde passam ou armazenam-se os espermatozóides. Verificamos a variação sazonal destas mesmas atividades, nestes tecidos, incluindo o sêmen armazenado no útero durante o LTSS. O sêmen coletado do ducto deferente foi fracionado para avaliação da distribuição destas atividades peptidásicas. Nossos dados mostraram características de liquefação do sêmen e movimento dos espermatozóides da cascavel que os diferenciam do padrão humano. FPP com cálcio e BK melhoraram a preservação da viabilidade espermática, similarmente ao que ocorre em mamíferos. Em todos os tecidos e no sêmen as atividades APB, PIP e POP foram detectadas apenas da FS, enquanto as demais estão presentes em FS e FM, seguindo um padrão de distribuição observado na maioria dos tecidos de mamíferos. Amastatina e bestatina inibiram APB e APN, enquanto a

diprotina A foi o inibidor mais eficiente para a DPPIV em FM. PAP-I e PIP foram inibidas, respectivamente, por bestatina e puromicina. Este perfil de inibição também é similar ao encontrado para as aminopeptidases em tecidos de mamíferos. Todas as atividades peptidásicas foram influenciadas por algum dos peptídeos estudados, sugerindo que tais peptídeos são substratos potenciais e/ou moduladores destas atividades na cascavel. As atividades APB e APN foram caracterizadas como metalopeptidases. APB, CAP e DPPIV foram inibidas por $MnCl_2$. CAP e PAP-I foram caracterizadas como enzimas sulfidril-dependentes. As atividades APB, APN-PI e APN-PS predominaram, em relação às demais peptidases, em todas as estações e na maioria dos tecidos e no sêmen, sugerindo sua maior relevância na fisiologia reprodutiva da *C. d. terrificus*. Os níveis de todas as atividades peptidásicas estudadas variaram sazonalmente, sugerindo que sua ação moduladora sobre peptídeos susceptíveis está integrada ao ciclo reprodutivo desta serpente. O fracionamento do sêmen do ducto deferente revelou a presença de fluido seminal e espermatozóides, bem como de uma estrutura prostassoma-símile, até então somente identificada em mamíferos. Em todas estas frações há atividade peptidásica, predominando a APN-PI no prostassoma-símile e no fluido seminal, e APN-PS e APN-PI na FS e FM dos espermatozóides, caracterizando um envolvimento com a redução da motilidade espermática, tal qual ocorre em mamíferos. Concluimos que as atividades peptidásicas estudadas apresentam características sazonais e tecido-específicas que sugerem uma atuação relevante na preservação dos espermatozóides de *C.d. terrificus*.

Palavras-chaves: peptidases, peptídeos, espermatozóides, reprodução, cascavel, serpentes, répteis.

ABSTRACT

MARINHO, C.E. **The rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae) as an experimental model to study the involvement of peptidases in the survival of spermatozooids.** 2007. 114 f. Dissertation (Master in Physiology) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

In the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* occurs the long-term sperm storage (LTSS), in the female tract, during the interval between mating (autumn) and ovulation (spring). Peptides and peptidases are among the main components that influence the spermatogenic activity in mammals. The present study aimed to characterize the presence of peptidases in *C. d. terrificus*, that are well-recognized to exert this function and/or that have the ability to hydrolyze peptides that exert this function in mammals, as well to evaluate whether these peptidases are related to the preservation of spermatozooids in this snake. The morphological and functional characteristics of spermatozooids were compared in the presence of angiotensin II (AngII), arginine-vasotocin (AVT), bradykinin (BK), fertilization promoting peptide (FPP) and thyrotropin-releasing hormone (TRH). We have checked the effect of chelating and thiol-reducing agents, cofactor and inhibitors, as well the effect of aforementioned peptides on related enzyme activities such as acid (APA), basic (APB), puromycin-sensitive (APN-PS) and puromycin-insensitive alanyl (APN-PI), cystyl (CAP), pyroglutamyl type 1 (PAP-I) and prolyl-imino (PIP) aminopeptidases, and dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV), as well as on prolyl endopeptidase (POP), in soluble (FS) and/or solubilized membrane-bound (FM) fractions of semen from vas deferens, of this own tissue, and vagina and uterus tissues of *C. d. terrificus*, i.e. tissues where spermatozooids pass through or where they are stored. The seasonal variation of these peptidase activities, in all tissues, including the semen stored in uterus during the LTSS, were evaluated. The semen from vas deferens was fractioned in order to know the distribution of these peptidase activities. The features of seminal liquefaction and movement of spermatozooids were different between the rattlesnake and human. Similar to mammals, FPP plus calcium and BK improved the preservation of the viability of spermatozooids from *C. d. terrificus*. In all tissues and semen, the APB, PIP and POP activities were detected only in FS, while others peptidases were present in FS and FM, following a similar pattern of distribution usually observed in mammalian tissues. Amastatin and bestatin inhibited APB and APN activities, while diprotin A was the most efficient inhibitor of DPPIV

in FM. PAP-I and PIP activities were inhibited by bestatin and puromycin, respectively. This inhibition profile was similar to that of mammalian tissues. All peptidase activities were influenced at least by one of the peptides under study, suggesting these peptides as potential substrates and/or modulators for these peptidases of the rattlesnake. The APB and APN activities were characterized as metallopeptidases. APB, CAP and DPPIV were inhibited by $MnCl_2$. CAP and PAP-I were characterized as sulfhydryl-dependent enzymes. The APB, APN-PI and APN-PS activities were predominant, in relation to the other examined peptidases, in all seasons and in most tissues and semen, suggesting their great relevance in the reproductive physiology of the *C. d. terrificus*. The levels of all studied peptidase activities were seasonally variable, suggesting that their modulator actions on susceptible peptides are integrated to the reproductive cycle of this snake. The fractionation of *C. d. terrificus* semen revealed the presence of seminal fluid and spermatozooids, as well a prostasome-like structure, until then identified only in mammals. In all of these fractions, there are peptidase activities, predominating the APN-PI in prostasome and seminal fluid, and the APN-PS and APN-PI in FS and FM of spermatozooids, suggesting their involvement in the reduction of the spermatic mobility, such as in mammals. In conclusion, the studied peptidase activities present seasonal and tissue-specific characteristics, which suggest a relevant role in the preservation of the spermatozooids of *C. d. terrificus*.

Key-words: peptidases, peptides, spermatozooids, reproduction, rattlesnake, reptile

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang	angiotensina
APA	aminopeptidase ácida
APB	aminopeptidase básica
APN-PI	alanil aminopeptidase insensível à puromicinina
APN-PS	alanil aminopeptidase sensível à puromicinina
AVP	arginina vasopressina
AVT	arginina vasotocina
BK	bradiginina
BSA	albumina de soro bovino
CAP	cistil aminopeptidase
CC	comprimento caudal
CRC	comprimento rostro-caudal
DMSO	dimetil-sulfóxido
DPPIV	dipeptidil-peptidase IV
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
FM	fração de membrana solubilizada
FPP	peptídeo promotor da fecundação
FS	fração solúvel
GHRH	hormônio liberador do hormônio do crescimento
GLUT4	transportador de glicose 4
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IRAP	aminopeptidase regulada pela insulina
LAP	leucina aminopeptidase
LDH	desidrogenase láctica
LTSS	armazenamento de longo prazo do esperma
MST	mesotocina
NADH	β -nicotinamida adenina di-nucleotídeo, forma reduzida
OXT	ocitocina
PAP	piroglutamil aminopeptidase
PIP	prolil iminopeptidase
POP	prolil endopeptidase
PR	prostassoma
PSA	antígeno específico da próstata
SE	fluido seminal
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
UMT	convulsão muscular crônica que comprime o lúmen do útero
Vo	volume morto
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Padrão físico-químico e morfológico do sêmen do ducto deferente, coletado no outono, e do sêmen armazenado no útero, durante o inverno, da cascavel <i>C. d. terrificus</i> , comparativamente ao sêmen humano.....	36
Tabela 2.	Viabilidade dos espermatozóides do sêmen coletado, no outono, do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i> , após incubação (30 min, 25°C) com meio de cultura RPMI-1640 (controle - 100%) e com cada um dos seguintes peptídeos: angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)] e hormônio liberador de tireotrofina (TRH).....	38
Tabela 3.	Atividade remanescente de aminopeptidase básica (APB) no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a inibidores clássicos de aminopeptidases...	42
Tabela 4.	Atividade remanescente de aminopeptidase neutra (APN), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.....	43
Tabela 5.	Atividade remanescente de cistil aminopeptidase (CAP), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente, coletado no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.....	44
Tabela 6.	Atividade remanescente de dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.....	45
Tabela 7.	Atividade remanescente de piroglutamil aminopeptidase tipo 1 (PAP-I), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a inibidores clássicos de aminopeptidases...	46
Tabela 8.	Atividade remanescente de prolil iminopeptidase (PIP) nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.....	47
Tabela 9.	Atividade remanescente de aminopeptidase básica (APB) no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	49
Tabela 10.	Atividade remanescente de aminopeptidase neutra (APN), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	50

Tabela 11.	Atividade remanescente de cistil aminopeptidase (CAP), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente, coletado no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	51
Tabela 12.	Atividade remanescente de dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	52
Tabela 13.	Atividade remanescente de piroglutamil aminopeptidase tipo 1 (PAP-I), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	53
Tabela 14.	Atividade remanescente de prolil iminopeptidase (PIP) nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	54
Tabela 15.	Atividade remanescente de prolil endopeptidase (POP) no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de <i>C. d. terrificus</i> , frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl ₂	55
Tabela 16.	Atividades (média ± E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), piroglutamil tipo 1 (PAP-I) e dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) em frações solúvel e de membrana solubilizada e de aminopeptidases básica (APB), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do sêmen armazenado no útero de <i>C. d. terrificus</i> no inverno.....	76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Convolução muscular crônica que comprime o lúmen do útero (UMT) em <i>C. d. terrificus</i>	5
Figura 2.	Dissecção do trato genital masculino de <i>C. d. terrificus</i>	8
Figura 3.	Hemipênis de <i>C. d. terrificus</i>	8
Figura 4.	Ritual combate entre machos de <i>C. d. terrificus</i>	8
Figura 5.	Classificação das peptidases.....	12
Figura 6.	Fotomicrografia de espermatozóides e estruturas não identificadas do sêmen, coletado no outono, do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i>	37
Figura 7.	Atividade de desidrogenase láctica (média $\pm$ E.P.M) das frações solúvel (barras brancas) e de membrana solubilizada (barras escuras) do sêmen do ducto deferente e dos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, e do sêmen armazenado (no inverno) no útero de <i>C. d. terrificus</i>	41
Figura 8.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	59
Figura 9.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	61
Figura 10.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do sêmen coletado do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	63
Figura 11.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada do sêmen coletado do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	65
Figura 12.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do útero de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	67
Figura 13.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada do útero de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	69

Figura 14.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel da vagina de <i>C. d. terrificus</i> na estação chuvosa (primavera/verão) e seca (outono/ inverno).....	71
Figura 15.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada da vagina de <i>C. d.</i> na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).....	73
Figura 16.	Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em frações solúvel (FS) e/ou de membrana solubilizada (FM) dos sêmens de <i>C. d. terrificus</i> coletados do ducto deferente do macho, ao longo do ano, e do útero da fêmea, no inverno.	75
Figura 17.	Cromatografia de filtração molecular em resina Sephadex G-200, equilibrada e lavada com tampão Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4, sob fluxo de 0,16 mL/min.....	78
Figura 18.	Atividades de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) nas frações seminais, fluido seminal, prostassoma, fração solúvel e de membrana solubilizada dos espermatozóides.....	79
Figura 19.	Fotomicrografia eletrônica de prostassoma-símile obtida do sêmen coletado do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i> , no outono.....	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biologia reprodutiva de répteis, com ênfase na cascavel <i>Crotalus durissus terrificus</i>	2
1.2. Capacidade fertilizadora de espermatozóides.....	10
1.3. Peptídeos e peptidases.....	11
2. OBJETIVO.....	19
3. ESTRATÉGIAS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Reagentes.....	22
4.2. Soluções de rotina.....	24
4.3. Animais.....	25
4.4. Coleta dos tecidos e/ou fluidos seminais de <i>C. d.terrificus</i>	25
4.5. Avaliação morfo-funcional dos espermatozóides e incubação com peptídeos.....	26
4.6. Preparo das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) dos tecidos e do sêmen total de <i>C. d. terrificus</i>	26
4.7. Medida de desidrogenase láctica (LDH).....	27
4.8. Quantificação da proteína.....	28
4.9. Atividades peptidásicas.....	28
4.10. Caracterização das atividades peptidásicas	30
4.10.1. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.....	30
4.10.2. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a peptídeos e outros agentes.....	30
4.11. Obtenção do fluido seminal (SE), do prostassoma (PR) e FS e FM dos espermatozóides do sêmen coletado do ducto deferente de <i>C. d. terrificus</i>	31
4.12. Microscopia eletrônica da fração PR	33
4.13. Análise dos resultados.....	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1. Avaliação morfo-funcional dos espermatozóides e incubação com peptídeos.....	35
5.2. Medida de desidrogenase láctica.....	39
5.3. Caracterização das atividades peptidásicas.....	39
5.3.1. Atividades peptidásicas dos tecidos e do sêmen total coletado do ducto deferente ou do útero.....	39
5.3.2. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.....	39
5.3.3. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a peptídeos e outros agentes.....	48
5.4. Variação sazonal das atividades peptidásicas	56
5.5. Fracionamento seminal.....	77
6. DISCUSSÃO.....	81
6.1. Morfo-funcionalidade dos espermatozóides sob efeito de peptídeos.....	81
6.2. Caracterização das atividades peptidásicas nas frações solúvel e de membrana solubilizada e perfil frente a diferentes agentes.....	84
6.3. Ciclo reprodutivo e sazonalidade das atividades peptidásicas.....	88
6.4. Frações do sêmen de <i>C. d. terrificus</i>	97
7. CONCLUSÕES.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

Os répteis estão inclusos no Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Reptilia, que subdivide-se na Ordem Chelonia (tartarugas), Ordem Crocodylia (crocodilos e jacarés) e Ordem Squamata (anfíbios, lagartos e serpentes). Uma das características dos répteis é a ectotermia, animais que obtêm o calor necessário para elevar sua temperatura corpórea a partir do meio externo (POUGH, 1999).

As serpentes compreendem aproximadamente 2.700 espécies, distribuídas por todo o globo terrestre, exceto nas calotas polares e regiões de grande altitude (GREENE, 1997). As cascavéis pertencem a Sub-Ordem Ophidea, Família Viperidae, Subfamília Crotalinae, Gênero *Crotalus*, que além desse gênero, com 30 espécies, possui mais 15 gêneros e 118 espécies, todas peçonhentas. Essa família é caracterizada pela presença de um órgão termorreceptor de cada lado da cabeça, entre o olho e a narina, denominado fosseta loreal (CAMPBELL & LAMAR, 2004). Dentre desse gênero, apenas *Crotalus durissus* ocorre na maior parte da América do Sul. Todas as demais espécies são encontradas no extremo norte da América do Sul, América Central e Estados Unidos. No Brasil, há 5 espécies, das quais 3 são mais conhecidas: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collineatus*. A *C. d. terrificus* habita os campos, matas da região sul, sudeste e centro oeste, e áreas de Mata Atlântica (CAMPBELL & LAMAR, 2004). Sua característica mais peculiar é a presença do chocalho ou guizo na extremidade da cauda. O corpo apresenta um colorido de fundo castanho claro, com tonalidades variáveis, sobre o qual se destaca uma fileira de manchas dorsais em forma de losangos marrons escuros, margeadas de branco ou amarelo (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

De modo geral, as serpentes podem apresentar atividade diurna ou noturna, mas há espécies que são ativas nos dois períodos. Essa atividade pode estar relacionada com a

termorregulação, procura de alimento e parceiro para acasalamento, esta última para a qual os machos são mais ativos. A cascavel apresenta atividade predominantemente noturna, em conformidade com sua atividade predatória, principalmente sobre roedores dos gêneros *Cavia*, *Rattus* e *Mus* e, também, sobre aves (SALOMÃO *et al.*, 1995). As fêmeas alteram sua atividade quando estão prenhes, na desova ou para parir, bem como durante a vitelogênese (aumento folicular). Geralmente, as vitelogênicas apresentam maior atividade diurna, concomitantemente ao aumento da ingestão de alimentos (SALOMÃO *et al.*, 1995).

1.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE RÉPTEIS, COM ÊNFASE NA CASCABEL *C. d. terrificus*

Os Squamata empregam uma variedade de sinais auditivos, químicos e táteis nos comportamentos que utilizam para manter os territórios e para escolha de parceiros sexuais. Os Iguania (lagartos) utilizam principalmente sinais visuais, alguns Gekkota (lagartixas) utilizam vocalizações e as serpentes utilizam feromônios. Os comportamentos sociais de Squamata parecem ser limitados se comparados com aqueles dos Crocodylia, mas muitas espécies apresentam hierarquias de dominância ou territorialidade. Os lagartos Iguania utilizam, principalmente, exibições visuais durante suas interações sociais. O gênero *Anolis* possui apêndices gulares, áreas de pele, abaixo do mento, que podem ser distendidas pelo aparelho hióide durante as exibições visuais, constituindo dispositivos de sinalização conspícuos, utilizados em conjunto com movimentos da cabeça e do corpo. A comunicação por feromônios, mediada pelo órgão vomeronasal, provavelmente ocorre em várias linhagens de lagartos e de serpentes (POUGH, 1999).

As fêmeas de répteis possuem o oviduto diretamente relacionado ao modo de paridade, ou à forma de fornecimento de nutrientes para os embriões (GIRLING, 2002). A oviparidade é definida como postura de ovos contendo embriões que requerem um período de

desenvolvimento fora do trato reprodutivo das fêmeas, enquanto que na viviparidade ocorre a retenção do embrião dentro do útero da mãe até o desenvolvimento completo e o nascimento (GUILLETTE, 1993). As funções do oviduto reptiliano incluem: produção de albúmen, produção da casca do ovo, placentação, ovipostura ou parturição e armazenagem de esperma (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Os ovos dos amniotas, após a ovulação, percorrem todo o oviduto tubular, que é derivado do ducto Mülleriano embrionário (WAKE, 1985; MOSSMAN, 1987). Durante essa passagem, o ovo é fertilizado e vários envoltórios são depositados pelo oviduto. O tempo que o ovo permanece no oviduto varia entre as espécies (STEWART & THOMPSON, 2000). Embriões de amniotas diferem dos não amniotas pela presença das membranas extra-embrionárias: córion, âmnion, alantóide e saco vitelínico, que são características de ovíparos e vivíparos (LUCKETT, 1977; WAKE, 1985; STEWART, 1997). A relação estrutural entre o oviduto e as membranas extra-embrionárias evoluiu para um quinto anexo embrionário, a placenta, que é uma fusão dos órgãos fetais ao tecido materno para trocas fisiológicas (MOSSMAN, 1937). Esta estrutura também é encontrada em anfisbenídeos, lagartos e serpentes (STEWART & THOMPSON, 2000). Nos ovos de répteis, o corioalantóide reveste o hemisfério dorsal do ovo (MOSSMAN, 1937). A justaposição do útero com o corioalantóide, constitui a alantoplacenta. Dada à necessidade de trocas gasosas dos ovos no oviduto, como também a aposição do corioalantóide e útero e a delgada membrana da casca, uma alantoplacentação funcional parece ser um aspecto comum em répteis vivíparos (BLACKBURN, 1993), tal como observado na serpente *C. d. terrificus*.

Na ordem Squamata o armazenamento de longo prazo do esperma (LTSS) e a manutenção de sua capacidade fertilizadora no trato genital da fêmea são consideradas estratégias reprodutivas (WOODWARD, 1933; FUKADA, 1986; ISOGAWA & KATO, 1995; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997), sendo melhor documentada em viperídeos (SCHUETT, 1992; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b). O LTSS ocorre nos receptáculos

seminais ou na porção caudal do oviduto, também chamado de útero posterior, tendo sido relacionado à assincronia entre o episódio de cópula e a ovulação (SCHUETT, 1992; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997) o qual, por sua vez, é considerado como um fator de adaptação em serpentes de região temperada (SHINE, 1977). No entanto, a *C. d. terrificus* exibe um padrão de armazenagem similar às serpentes desse clima, mesmo vivendo em uma região (tropical) onde a armazenagem parece não ser necessária (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b). A manutenção desta estratégia reprodutiva pode ser um importante fator adicional na análise de questões filogenéticas deste grupo, ou uma adaptação a outros fatores fisiológicos (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b).

Muitos relatos de LTSS devem ser reavaliados, principalmente aqueles de fêmeas que geram prole quando isoladas de machos por mais de dois anos (SCHUETT *et al.*, 1997), pois a existência de partenogênese já foi sugerida ou relatada para algumas serpentes (SCHUETT *et al.*, 1997). Essa plasticidade reprodutiva indica uma alternância entre a reprodução sexuada e assexuada, dependendo da viabilidade de cópula (WATTS *et al.*, 2006). Em répteis, a partenogênese foi identificada em seis famílias de lagartos e uma de serpente (POUGH, 1999). Pode ser uma adaptação a uma rápida mudança de ambiente, estratégia para a fêmea habitar novos territórios, ou devido a falta de machos em sua população (POUGH, 1999).

O LTSS, em *C. d. terrificus*, poderia ser facilitado pela contração uterina que ocorre após a cópula, no outono, promovendo uma convulsão muscular crônica que comprime o lúmen deste órgão (UMT) (Figura 1) (ANDRÉN & NILSON, 1987; SCHUETT, 1992; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997), ali retendo o sêmen até a ovulação e subsequente fertilização na primavera (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997) e/ou bloqueando a parte posterior uterina para nova entrada de espermatozóides (ANDRÉN *et al.*, 1997). Essa contração da musculatura uterina da *C. d. terrificus* foi recentemente descrita como resultado da ação direta da vasotocina (AVT) e da modulação dos níveis plasmáticos de estradiol e de progesterona

durante a vitelogênese (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004a). Já a manutenção desta contração parece depender especialmente da presença de níveis elevados de estradiol e de baixos níveis de vasotocinase (cistil aminopeptidase, CAP), negativamente modulada pelo estradiol (YAMANOUYE *et al.*, 2004). Na serpente *Vipera berus* foi observada a ocorrência de contração do útero induzida pela secreção do segmento sexual renal do macho, o que sugere a contribuição, possivelmente de caráter agudo, de componentes presentes neste segmento na formação desta modalidade de contração uterina (NILSON & ANDRÉN, 1982). No entanto, são ainda desconhecidos os fatores que contribuem na manutenção da sobrevida dos espermatozóides armazenados na cascavel *C. d. terrificus* e em outras espécies onde o fenômeno da LTSS tem sido detectado.

Figura 1. Convolução muscular crônica que comprime o lúmen do útero (UMT) em *C. d. terrificus*. V, vagina; I, intestino. Barra: 39mm. Foto: (YAMANOUYE *et al.* 2004)

A cascavel *C. d. terrificus* ovula na primavera, fase correspondente a um ciclo gametogênico pós-nupcial (LANGLADA *et al.*, 1973; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997), já que a cópula ocorre durante o outono (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 1990). O nascimento ocorre no verão, após um período gestacional em torno de 4 - 5 meses. Conseqüentemente, os espermatozóides permanecem armazenados e com sua viabilidade

mantida durante o inverno (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b). Então, relativamente aos mamíferos, nos quais é, geralmente, de 1 a 30 dias (KUMARI *et al.*, 1990; BIRKHEAD & MÜLLER, 1993), esse tempo de armazenamento do esperma nesta serpente é bastante elevado. Em peixes vivíparos registra-se a armazenagem de esperma por um ano (FOX, 1956), enquanto algumas salamandras apresentam fertilização retardada, utilizando-se de esperma estocado desde algumas horas até um período de dois anos (ZUG, 1993). Aves podem estocar esperma nos ovidutos por 6 a 117 dias, marsupiais 0,5 a 16 dias, morcegos 16 a 1988 dias, lagomorfos 1 a 30 dias, roedores 0,5 a 23 dias, carnívoros 5 a 11 dias, ungulados 2 a 6 dias e primatas até 5 dias (BIRKHEAD & MÜLLER, 1993). Em tartarugas e terrapinas a armazenagem de esperma pode durar entre 3 e 49 meses (GIST & JONES, 1989; BIRKHEAD & MÜLLER, 1993), em lagartos de 1 a 18 meses (KUMARI *et al.*, 1990) e em crocodilianos cerca de 7 dias (BIRKHEAD & MÜLLER, 1993). Então, esta armazenagem de esperma de médio a longo prazo não é exclusiva de serpentes e, inclusive, parece ser um fenômeno relativamente disseminado nos vertebrados. No entanto, como mencionado anteriormente, muitos destes relatos sobre LTSS não têm caráter conclusivo e podemos considerar que é na *C. d. terrificus* que este fenômeno está melhor caracterizado, até o momento (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Do ponto de vista morfológico e anatômico, o sistema reprodutor de fêmeas de *C. d. terrificus* é composto por dois ovários e dois ovidutos, dispostos bilateralmente de forma assimétrica (GHELMAN, 1998). Os ovidutos se dividem em: infundíbulo, útero (anterior e posterior) e vagina. O infundíbulo, porção mais cranial do oviduto, é uma estrutura fina em forma de funil, com muitas dobras, e que recebe os folículos durante a ovulação (ALMEIDA-SANTOS & ORSI, 2002). O ciclo ovariano classifica-se em duas fases: vitelogênese primária e secundária (ALDRIDGE, 1979). A vitelogênese primária é denominada fase quiescente, em que os folículos são esbranquiçados ou transparentes (menores que 10 mm). Na vitelogênese

secundária, fase ativa do desenvolvimento folicular, os folículos tornam-se amarelados, com intensidade progressiva, na medida em que ganham vitelo. Esses folículos atingem entre 10 a 30 mm de comprimento, conforme o ciclo avança (ALMEIDA-SANTOS & ORSI, 2002), ocorrendo rápido aumento de sua massa, em função do acréscimo de íons, sais minerais e vitelo (ALDRIDGE, 1979). O vitelo é transportado pelo sangue para os oócitos, promovendo o crescimento folicular (CREWS & GARSTKA, 1982). Exemplares de *C. d. terrificus*, em vitelogênese primária, podem ser encontrados durante todo o ano, enquanto que a vitelogênese secundária predomina no outono e no inverno (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 2002).

O sistema reprodutor dos machos da ordem Squamata é composto por dois testículos e dois ductos deferentes, epidídimo e hemipênis. Os testículos dos répteis estão localizados na cavidade celomática, sendo o direito mais cranial que o esquerdo. Em geral, os testículos são uma massa ovóide composta por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sangüíneos, envolvidos por tecido conjuntivo de túnica própria (DeNARDO, 1996; NORRIS, 1996). Os ductos deferentes ligam o testículo com a papila genital na cloaca, próximo à base dos hemipênis, já que os répteis não possuem uretra peniana (Figura 2) (VASSE, 1994). O epidídimo de serpentes é composto de duas partes: dúctulos e ducto do epidídimo. O dúctulo do epidídimo possui células com cílios longos, predominando microvilos. Estes dúctulos se inserem no ducto do epidídimo, sendo que este último possui epitélio não ciliado (ALMEIDA-SANTOS, 2005). O hemipênis de serpentes é um órgão copulatório duplo, dos quais apenas um par é utilizado na cópula (Figura 3) (FOX, 1977), apresentando características similares a de lagartos, mas diferentes dos demais répteis (LANCE, 2003). O segmento sexual renal, órgão acessório masculino, localizado nos túbulos do néfron posterior, encontrado em lagartos e em serpentes, é andrógeno-dependente e secreta um complexo de glicogênio, mucopolissacarídeos, mucoproteínas, lipídeos e fosfatase ácida (KÜHNEL &

KRISCH, 1974). Segundo SANYAL & PRASAD (1966) essa secreção se mistura com o esperma na cloaca do macho, sendo transferida para a cloaca da fêmea, durante a cópula.

Figura 2. Dissecção do trato genital masculino de *C. d. terrificus*. Setas - ducto deferente; t, testículo; K, rim; c: cloaca. Barra: 0,5 cm. Foto: (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004).

Figura 3. Hemipênis de *C. d. terrificus*.

Registra-se, no outono, o combate ritualizado (Figura 4) entre os machos (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 1990), período em que há um pico de testosterona (SALOMÃO *et al.*, 1995; ZACARIOTTI, 2004). O combate ritualizado pode ser considerado uma estratégia de competição espermática, definido por PARKER (1997) como “competição entre o esperma de dois ou mais machos para a fertilização do óvulo”.

Foto: Paulo Cicchi

Figura 4. Ritual combate entre machos de *C. d. terrificus*.

A espermatogênese de *C. d. terrificus* inicia-se na primavera (setembro) e tem um pico no verão (janeiro), estando sob regulação hipotalâmica-hipofisária-gonadal. A hipófise controla, por meio de gonadotrofinas, a produção de testosterona pelas células de Leydig. O tamanho corpóreo mínimo encontrado para machos em maturidade sexual tem sido de 56 cm (SALOMÃO & ALMEIDA-SANTOS, 2002).

Enquanto o ciclo reprodutivo da fêmea é bienal (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997), o do macho da *C. d. terrificus* é anual (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b). O número de espermatozóides de *C. d. terrificus* apresenta-se aumentado no verão e outono (assim relacionado ao período de cópula na metade do outono), comparativamente ao inverno (período pós-cópula) (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b). Durante todo o ano, espermatozóides de *C. d. terrificus* podem ser encontrados no ducto deferente. Pela compressão dos dois ductos deferentes pode-se obter em média 0,8 – 1,0 mL de sêmen; contudo a obtenção dessa quantidade é relativa, pois há uma variação inter-específica, além da influência da fase reprodutiva do animal. SAINT-GIRONS (1982) e SCHUETT (1992) categorizam esse ciclo reprodutivo como tipo I (aestival ou pós nupcial).

Os parâmetros morfo-funcionais do esperma da cascavel *C. d. terrificus* são normais imediatamente após a ejaculação (ZACARIOTTI, 2004). Os espermatozóides (não diluídos) retirados de serpentes mortas, mantidas sob -10° C, por 24 h, mantêm sua motilidade por cerca de 8 horas, em temperatura ambiente (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b), sugerindo que, nestas condições, componentes do próprio esperma (ou provenientes do ducto deferente) atuam na preservação da viabilidade dos espermatozóides. Embora tenham sido observadas variações sazonais qualitativas da motilidade do esperma de *C. d. terrificus* (ZACARIOTTI, 2004), estas não foram estudadas quanto a uma possível variação quantitativa. Ainda, convém enfatizar que essa preservação observada na cascavel é muito mais efetiva que aquela

observada em espermatozóides humanos manipulados sob as mesmas condições (aproximadamente 90 min) (OLIVEIRA LIMA *et al.*, 1977).

No lagarto iguanídeo *Anolis carolinensis* um suposto nutriente para a armazenagem do esperma no órgão acessório masculino parece ser suprido pelo segmento sexual renal, enquanto a fosfatase ácida, presente nesta mesma secreção, foi sugerida como ativadora do esperma (CUELLAR *et al.*, 1972). Já na tartaruga *Trachemys scripta*, produtos secretados pelo segmento sexual renal inibiriam a motilidade espermática antes do período de nascimento dos filhotes, o qual prolongaria a sobrevivência dos espermatozóides (GARSTKA & GROSS, 1990), indicando uma importância do segmento sexual renal no sentido de facilitar a transferência de esperma (ALDRIDGE *et al.*, 1990). O lagarto *Hemidactylus brooki* parece utilizar proteínas seminais para a motilidade dos espermatozóides (HAMID & AKBARSHA, 1989). Alguns autores sugerem que o próprio útero também propiciaria fatores de preservação dos espermatozóides (HOFFMAN & WIMSATT, 1972; HALPERT *et al.*, 1982). Uma substância mucosa, observada na serpente *Thamnophis sirtalis parietalis* (HALPERT *et al.*, 1982) e em tartarugas (MOTZ & CALLARD, 1991), é produzida pelas células do epitélio uterino, parecendo auxiliar no transporte do esperma e como fonte nutricional para os espermatozóides durante a armazenagem.

1.2. CAPACIDADE FERTILIZADORA DE ESPERMATOZÓIDES

A capacidade fertilizadora do espermatozóide é uma condição nativa e normal. O termo capacidade aqui refere-se a uma potencialidade em exercer uma função biológica. No caso dos espermatozóides, determinados parâmetros morfo-funcionais podem estimar o grau de probabilidade de que esta potencialidade possa efetivar-se, resultando na fertilização do óvulo. No entanto, constata-se que, embora a fertilização do óvulo possa ocorrer com uma probabilidade maior que 95% nos animais férteis, isto não significa que o resultado dessa

concepção gerará uma prole. Por outro lado, dentro de uma população de espermatozóides de um ejaculado, em que estes parâmetros estão dentro da normalidade e, portanto, refletindo uma capacidade fertilizadora íntegra, somente alguns poucos efetivamente alcançam o óvulo e exercem essa capacidade. Dada sua importância, a identificação dos fatores que distinguem esses espermatozóides bem sucedidos tem sido objeto de intensos estudos.

Seguimos, atualmente, sem dispor de um parâmetro claro indicativo da fertilidade dos espermatozóides, tanto em mamíferos como em outros vertebrados. As pesquisas inicialmente detiveram-se nos aspectos morfológicos (forma, vitalidade, densidade e motilidade) (FISHMAN *et al.*, 1975) e, recentemente, voltam-se mais para aspectos bioquímicos dos espermatozóides e para a busca de um possível marcador de fertilidade. Nos parâmetros decorrentes destas pesquisas baseia-se o critério vigente de normalidade seminal humana, adotado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999), ainda bastante restrito a indicadores morfológicos e, por meio dos quais, todavia, não são detectadas todas as situações em que ocorre déficit reprodutivo (COLLINS & CROSIGNANI, 1992; OMBELET *et al.*, 1995).

1.3. PEPTÍDEOS E PEPTIDASES

Os peptídeos são degradados por um limitado número de enzimas com uma especificidade de substrato relativamente ampla (ROQUES *et al.*, 1993). As enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas são conhecidas como peptidases ou proteases. O termo peptidase é recomendado para descrever o subconjunto de hidrolases de peptídeos, sub-classe EC 3.4/ International Union of Biochemical Molecular Biology – IUBMB (McDONALD & BARRET, 1986).

As peptidases compreendem dois grupos: exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-24 e EC 3.4.99). As exopeptidases atuam sobre as ligações peptídicas localizadas

em regiões próximas ao N-terminal e podem ser classificadas como: aminopeptidases (EC 3.4.11), dipeptidil peptidases e tripeptidil peptidases (EC 3.4.14) e omega peptidases (EC 3.4.19). Esta última se diferencia por remover resíduos terminais que são substituídos, ciclados ou ligados por ligações de isopeptídeos. As exopeptidases, que agem em regiões próximas ao C-terminal, são as peptidil dipeptidases (EC 3.4.15), as carboxipeptidases (EC 3.4.16-18) e as dipeptidases (EC 3.4.13). As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serino-carboxipeptidase (EC 3.4.16), metalo-carboxipeptidase (EC 3.4.17) e cisteíno-carboxipeptidases (EC 3.4.18). As endopeptidases clivam ligações peptídicas no interior da cadeia e podem ser classificadas em serino-endopeptidases (EC 3.4.21), cisteíno-endopeptidases (EC 3.4.22), aspártico-endopeptidases (EC 3.4.23), metaloendopeptidases (EC 3.4.24) e treonina endopeptidases (EC 3.4.25). As endopeptidases que não puderam ser classificadas em nenhuma destas subclasses citadas foram agrupadas na subclasse (EC 3.4.99) (Figura 5) (McDONALD & BARRET, 1986).

Figura 5. Classificação das peptidases.

Vários peptídeos e algumas peptidases vêm sendo relacionados com a fisiologia espermática em mamíferos. Na *C. d. terrificus* podemos considerar que estes mesmos peptídeos ou seus homólogos podem ter suas atividades moduladas por peptidases no próprio sêmen e/ou nos tecidos por onde passam ou se armazenam os espermatozóides, i.e. o ducto deferente, vagina e útero posterior dessa serpente.

O sistema renina-angiotensina (RAS) é um dos sistemas envolvidos na modulação da função espermática. Em particular, o receptor tipo 1 (AT1) da angiotensina (Ang) II tem sido detectado durante o desenvolvimento de espermátides e no espermatozóide maduro de ratos, sendo também presente no espermatozóide humano (VINSON *et al.*, 1995; KÖHN *et al.*, 1998). A AngII aumenta a motilidade, hiperativa e capacita o espermatozóide (VINSON *et al.*, 1996), porém não inibe a perda espontânea do acrossoma, tanto em espermatozóides humanos quanto de ratos (MEDEDOVIC & FRASER, 2005). A AngII eleva a concentração de AMPc em espermatozóides capacitados e incapacitados (MEDEDOVIC & FRASER, 2004). A AngII é hidrolisada por aminopeptidase ácida (APA) (KUGLER, 1982) e prolil endopeptidase (POP) (RAWLINGS *et al.*, 1998). A APA (EC 3.4.11.7) também hidrolisa AngI (KUGLER, 1982) e colecistocinina (CCK) (MIGAUD *et al.*, 1999), pela remoção de resíduos ácidos glutamyl e aspartil da porção N-terminal (RAWLINGS *et al.*, 1998). A aminopeptidase neutra (APN) hidrolisa AngIII, formando AngIV (KUGLER, 1982) e converte calidina em bradicinina (BK) (MIZUTANI *et al.*, 1993). A POP (EC 3.4.21.26) hidrolisa a ligação Pro-Xaa de uma ampla gama de peptídeos que possuem uma sequência Yaa-Pro-Xaa, tais como substância P, ocitocina (OXT), vasopressina (AVP), BK, neurotensina, hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) (RAWLINGS *et al.*, 1998), hormônio liberador de tireotrofina: pGlu-His-Pro-NH₂ (TRH) e peptídeo promotor da fecundação: pGlu-Glu-Pro-NH₂ (FPP) (VALVIDIA *et al.*, 2004).

TRH e análogos foram encontrados na próstata (GKONOS *et al.* 1994, LINDEN *et al.* 1996) e plasma seminal humano (COCKLE *et al.*, 1994; LINDEN *et al.*, 1996). Estes peptídeos, especialmente o FPP, estimulam *in vitro*, na presença de cálcio extracelular, a capacidade fertilizadora dos espermatozóides (GREEN *et al.*, 1996a,b). Evidências indicam que o FPP também atuaria *in vivo*, via receptor específico, modulando a atividade da adenilato ciclase (FRASER *et al.*, 1997a,b, 1998; ADEYOA-OSIGUWA, 1998). O FPP, em espermatozóides de mamíferos, *in vitro*, estimula a capacitação e habilidade fertilizadora em células incapacitadas e impede essa capacitação em células capacitadas, resultando na inibição espontânea da reação acrossômica (FRASER *et al.*, 2001). Sob a ação do FPP, ocorre um estímulo de produção de AMPc em células incapacitadas e uma inibição de produção de AMPc em células capacitadas (FRASER *et al.*, 2003). Tanto o TRH como o FPP e a encefalina são degradados pela POP (SIVITER & COCKLE, 1995). Embora a piroglutamil aminopeptidase (PAP) seja potencialmente mais relacionada ao TRH e FPP, ainda não há provas conclusivas de que esses peptídeos sejam fisiologicamente degradados pela PAP no sêmen. Sabe-se que a PAP-I (EC 3.4.19.3) degrada uma variedade de pGlu-peptídeos como LHRH, neurotensina e bombesina (VALVIDIA *et al.*, 2004). A atividade de PAP-II (E.C.3.4.19.6) (FRIEDMAN & WILK, 1985) parece não ser relevante no sêmen humano (VALVIDIA *et al.*, 2004).

É comumente conhecido que o plasma seminal de mamíferos contém todos os componentes do sistema calicreína-cinina, e que as cininas são as efetoras deste sistema, podendo desenvolver um importante papel na ativação e manutenção da atividade motora do espermatozóide pós-ejaculação (SCHILL & HABERLAND, 1974; SCHILL *et al.*, 1989). As cininas alteram a motilidade e o metabolismo espermático, sendo que *in vitro* apresentam efeitos positivos na motilidade, velocidade e penetração no muco cervical. As duas principais cininas são: BK e calidina (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2000), sendo que a BK possui um

efeito benéfico na motilidade de espermatozóides de humanos (SATO & SCHILL, 1987) e de bovinos pós-congelamento (SOMLEV & SUBEV, 1998). Foram detectados receptores específicos da BK nas células espermáticas das espécies de mamíferos estudados (MISKA & SCHILL, 1990). BK, calidina, metionina-encefalina e somatostatina são hidrolisados pela aminopeptidase básica (APB, EC 3.4.11.6), enzima citoplasmática da família M1 das metalopeptidases, a qual remove resíduos de arginina e lisina da porção N-terminal (RAWLINGS *et al.*, 1998). A APB possui natureza bifuncional, pois apresenta tanto essa atividade aminopeptidásica como capacidade de hidrolisar o leucotrieno A₄, o que ocorre devido à semelhança estrutural com a leucotrieno A₄ hidrolase (FOULON *et al.*, 1999). Além das suas funções imunológicas, o leucotrieno A₄ pode estar envolvido na ovulação (YOSMURA *et al.*, 1991), formação do corpo lúteo e início da gravidez (HATTORI *et al.*, 1998).

As encefalinas são pentapeptídeos opióides endógenos amplamente distribuídos nos órgãos reprodutivos masculinos, como epidídimo, próstata, vesícula seminal e testículo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002) sendo expressas também em espermatozóides (KEW *et al.*, 1990). Um possível papel desses peptídeos na espermatogênese tem sido sugerido (KEW *et al.*, 1990). É bem provável que o sistema opióide esteja envolvido no controle do movimento espermático, porque a redução da motilidade (astenozoospermia) é frequentemente encontrada em adictos a drogas opiáceas (RAGNI *et al.*, 1988). Tem sido registrado que camundongos com expressão de encefalina alterada apresentam alterações na motilidade espermática (O'HARA *et al.*, 1994). As encefalinas e outros opióides aumentam a sobrevivência celular e protegem as células da necrose e apoptose (HAYASHI *et al.*, 2002). Receptores de opióides do tipo δ , κ e μ foram detectados em espermatozóides humanos (AGIRREGOITIA *et al.*, 2006). A APN foi detectada em frações solúvel e de membrana no fluido seminal e nos prostassomas (vesículas de origem prostáticas) do sêmen humano,

predominantemente na forma insensível à puromicina (APN-PI) (E.C 3.4.11.2) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Alterações nos níveis de APN do sêmen humano foram associadas a diferentes anormalidades dos espermatozóides em pacientes subférteis (IRAZUSTA *et al.*, 2004). A alanil aminopeptidase sensível a puromicina (APN-PS, E.C 3.4.11.14) e a APN-PI são algumas das peptidases que hidrolisam encefalina (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Foi sugerido que as aminopeptidases podem atuar nas encefalinas que estão estocadas no acrossoma, sendo esgotadas após a reação acrossômica (KEW *et al.*, 1990). A substância P é um peptídeo relacionado com o processo reprodutivo e é encontrada no epidídimo do rato (SASTRY *et al.*, 1991). Segundo SASTRY *et al.* (1991), a incubação da substância P com espermatozóides de ratos causa aumento da motilidade destas células. A dipeptidil-peptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5) remove dipeptídeos da porção N-terminal de peptídeos contendo prolina ou alanina como penúltimo aminoácido (HEGEN *et al.*, 1990). Dentre os peptídeos clivados pela DPPIV, estão a substância P, o neuropeptídeo Y, peptídeo YY, endorfina-2, hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), enterostatina e peptídeo glucagon-símile tipo 1 (GLP-1) (RAWLINGS *et al.*, 1998).

A OXT e a AVP, bem como seus análogos reptilianos, respectivamente, a mesotocina (MST) e a AVT, têm um envolvimento bem estabelecido no processo reprodutivo. Todas as atividades biológicas da AVT, detectadas até o momento, apresentam-se com uma potência intermediária entre OXT e AVP, sendo ainda desconhecido um papel específico da MST (reconhecido apenas como quantitativamente diferente dos efeitos da AVT) em répteis. A AVP e a AVT são conhecidas pela maior potência em estimular a reabsorção renal de água, enquanto que a OXT, a AVT e a MST são conhecidas por induzir ovoposição ou parturição em todos os vertebrados estudados, e natriurese, no caso da OXT. A OXT também causa ejeção de leite durante a amamentação, efeitos parácrinos no testículo e no ovário, e controle sobre o comportamento maternal e sexual em mamíferos (NISHIMURA, 1985; LENG *et al.*,

1988; FIGLER *et al.*, 1989; NISHIMORI *et al.*, 1996; MEDINA *et al.*, 1998; STAM *et al.*, 1998; BRADSHAW & BRADSHAW, 2002; NIELSEN *et al.*, 2002). Inclusive, foi sugerido que a contração do túbulo seminífero, induzida por OXT exógena, promove a espermiacção em ratos (ASSINDER *et al.*, 2002). A cistil aminopeptidase (CAP, EC 3.4.11.3) hidrolisa a ligação entre hemicistina amino-terminal e resíduos de tirosina desses peptídeos. É bem estabelecido que essa aminopeptidase circulante tem um papel na regulação de peptídeos neuro-hipofisários durante a gravidez de primatas (DAVISON *et al.*, 1993). Além disso, o nível dessa atividade foi relacionado com o estradiol em *C. d. terrificus* (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004a; YAMANOUYE *et al.*, 2004). A atividade PIP (EC 3.4.11.5) vem sendo atribuída à atividade de leucina aminopeptidase (LAP)/CAP (EC 3.4.11.1) (TURZYNSKI & MENTLEIN, 1990), tendo sido raramente estudada em vertebrados.

As atividades de aminopeptidase e de amilase também foram descritas como principais agentes de liquefação do coágulo do sêmen humano ejaculado (CHATTERJEE *et al.*, 1997). Além disso, os inibidores de aminopeptidases, bestatina e puromicina, são capazes de diminuir a proliferação e viabilidade celular em mamíferos (TAKAHASHI *et al.*, 1989, CONSTAM *et al.*, 1995). Sabe-se, no entanto, que a bestatina pode restaurar e promover crescimento folicular e ovulação suprimidos por estresse (NAKAMURA *et al.*, 1998).

Outro fator relevante relacionado à presença de peptidases no sêmen é a associação de algumas das enzimas mencionadas com processos infecciosos e resposta imune, os quais, por sua vez, entre outras conseqüências, podem levar ao comprometimento da capacidade fertilizadora (número, qualidade e/ou integridade dos espermatozóides). Assim, temos que a APN/CD13 é molécula receptora para algumas linhagens de RNA-viroses (SODERBERG *et al.*, 1993). Linfócitos T que expressam DPPIV/CD26 são preferencialmente infectados e depletados em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OHTSUKI *et al.*,

2000) e a elevação do número de leucócitos e de DNA pró-viral HIV-1 estão correlacionadas no sêmen de pacientes aids (BALL *et al.*, 1999).

O(s) fator(es) que permitem a manutenção da sobrevivência dos espermatozoides da cascavel são ainda desconhecidos. Há um evidente interesse neste tema relacionado aos problemas da infertilidade e no desenvolvimento de produto anticoncepcional masculino, bem como de novos espermicidas, fatores preservativos destinados à crio-armazenagem de espermatozoides e agentes anti-virais associados ou não à espermicidas. O estudo quantitativo de peptidases representativas, e de suas especificidades sobre alguns peptídeos relacionados à viabilidade dos espermatozoides, poderia contribuir na elucidação dos problemas mencionados anteriormente. Sobretudo, tais peptidases ainda não foram estudadas em tecidos e no sêmen da cascavel *C. d. terrificus*, e sua exploração, neste réptil, propicia um valioso modelo experimental, que pode suprir informações de interesse comparativo no campo da reprodução.

2. OBJETIVO

Prover respostas às seguintes questões:

1- As atividades peptidásicas de APA, APB, APN-PS, APN-PI, CAP, DPPIV, PAP-I, PIP e POP existem, em FS e/ou FM, no sêmen armazenado no útero posterior e no ducto deferente, assim como nestes próprios tecidos e no tecido vaginal de *C. d. terrificus* ?

2- As atividades supracitadas estariam entre os fatores endógenos envolvidos na capacidade peculiar de manutenção da sobrevivência dos espermatozoides desta serpente ?

3. ESTRATÉGIAS

1. Avaliar parâmetros físico-químico e morfológicos de sêmen do ducto deferente, coletado no outono (período da cópula), e do sêmen armazenado, durante o inverno (período do LTSS), no útero posterior de *C. d. terrificus* comparativamente ao sêmen humano.
2. Avaliar, sazonalmente, os níveis das atividades peptidásicas supracitadas no sêmen total proveniente do ducto deferente, e nos tecidos do ducto deferente, útero posterior e vagina, relacionando-os entre si e com características conhecidas do ciclo reprodutivo de *C. d. terrificus*.
3. Comparar os níveis das atividades peptidásicas supracitadas entre o sêmen total proveniente do ducto deferente nas diferentes estações e o sêmen armazenado na fêmea durante o LTSS.
4. Avaliar efeitos *in vitro* de substratos peptídicos naturais e potenciais das peptidases sob estudo, quais sejam: AngII, AVT, BK, FPP, FPP+ Ca(2+) e TRH, sobre parâmetros de qualidade dos espermatozóides de *C. d. terrificus* coletados do ducto deferente no outono.
5. Caracterizar os efeitos de agentes quelante, tiol-redutor, cofator, inibidores, bem como dos substratos supracitados sobre as atividades peptidásicas sob estudo, quais sejam: APA, APB, APN-PI, APN-PS, CAP, PAP-I, DPPIV, PIP e POP em FS e/ou FM, no sêmen total proveniente do ducto deferente, e nos tecidos do ducto deferente, útero posterior e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*.

6. Quantificar a distribuição destas atividades peptidásicas em frações seminais (líquido seminal, prostassoma-símile e espermatozóides) provenientes do sêmen, coletado no outono, do ducto deferente de *C. d. terrificus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

β -naftilamida (Sigma Chemical Company, EUA)

β -nicotinamida adenina di-nucleotídio forma reduzida - NADH (Sigma Chemical Company, EUA)

Ácido acético glacial (Merck, Brasil)

Ácido etilenediaminetetraacético-EDTA (Merck, Brasil)

Albumina bovina (Sigma Chemical Company, EUA)

Amastatina (Bachem Bioscience Inc., USA)

Angiotensina II (Sigma Chemical Company, EUA)

Arginina vasotocina (Sigma Chemical Company, EUA)

Azul de tripan (Sigma Chemical Company, EUA)

Bestatina (Bachem Bioscience Inc., USA)

Blue Dextran (Sigma Chemical Company, EUA)

Bradicinina (Sigma Chemical Company, EUA)

Cloreto de cálcio - CaCl_2 (Sigma Chemical Company, EUA)

Cloreto de hidrogênio - HCl (Merck, Alemanha)

Cloreto de magnésio - MnCl_2 (Sigma Chemical Company, EUA)

Cloreto de sódio - NaCl (Sigma Chemical Company, EUA)

Dimetil sulfóxido – DMSO (Sigma Chemical Company, EUA)

Diprotina A (Bachem Bioscience Inc., USA)

DL-ditiotreitol-DTT (Sigma Chemical Company, EUA)

Fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Sigma Chemical Company, EUA)

Fosfato de sódio monobásico (Sigma Chemical Company, EUA)

Glicil-L-prolina-4-metoxi- β -naftilamida (Peninsula Laboratories Inc., USA)

Hialuronidase (Sigma Chemical Company, EUA)

H-Cys-4-metoxi- β -naftilamida (Bachem Bioscience Inc., USA)

Hormônio liberador de tireotrofina (Sigma Chemical Company, EUA)

L-ácido aspártico α -(β -naftilamida) (Sigma Chemical Company, EUA)

L-ácido piroglutâmico- β -naftilamida (Sigma Chemical Company, EUA)

L-alanina- β -naftilamida (Sigma Chemical Company, EUA)

L-arginina- β -naftilamida (Sigma Chemical Company, EUA)

L-prolina- β -naftilamida (Sigma Chemical Company, EUA)

Meio de cultura para células RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, EUA)

Metoxi- β -naftilamida (Sigma Chemical Company, EUA)

Peptídeo promotor da fecundação (Sigma Chemical Company, EUA)

Piruvato (Sigma Chemical Company, EUA)

Protein Assay kit (BioRad Laboratories, EUA)

Puromicina (Sigma Chemical Company, EUA)

Sephadex G-200 (Sigma Chemical Company, EUA)

Triton X-100 (Union Carbide, EUA)

Trizma base (Sigma Chemical Company, EUA)

Z-Gly-Pro- β -naftilamida (Bachem Bioscience Inc., USA)

4.2. Soluções de rotina

Solução do kit BioRad

Solução BioRad4 mL

Água destilada q.s.p. 20 mL

Tampão Fosfato

Solução A 9,5 mL

Solução B 40,5 mL

Albumina 0,02 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

Solução A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 28 g

Água destiladaq.s.p. 1000 mL

Solução B

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 54 g

Água destiladaq.s.p. 1000 mL

Tampão Tris/HCl pH 8,3

Solução A12,5 mL

Solução B 4,2 mL

Água destilada q.s.p. 50 mL

Solução A

$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 24,2 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Solução B

HCl 6,2 mL

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Tampão Tris/Ácido Maleato pH 5,9

Solução estoque..... 7,5 mL

Albumina 0,003 g

Água destilada q.s.p. 10 mL

Solução estoque

Trizma.....24,2 g

Anidrido maleico..... 19,6 g

NaOH 1N200 mL

Água destiladaq.s.p. 1000 mL

4.3. Animais

O uso de serpentes foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob o protocolo nº 193/04, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA). Para a realização deste estudo foram utilizadas serpentes adultas (*C. d. terrificus*, Serpentes, Viperidae, Crotalinae), coletadas da natureza do estado de São Paulo e Minas Gerais, identificadas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Estas serpentes foram mantidas em caixas individuais de madeira (comprimento x largura x altura 35 x 26 x 22 cm) e aclimatadas a condições controladas de temperatura (25°C), umidade relativa de $65 \pm 0,9\%$ e fotoperíodo 12:12 claro/escuro (início do período claro às 6:00h am), em uma sala com acesso restrito por cerca de 10 dias.

Em todos os procedimentos experimentais as serpentes foram anestesiadas por exposição ao CO₂, por 5 min, em recipiente apropriado. Registra-se o comprimento rostro-cloacal – CRC (cm), comprimento caudal – CC (cm) e a massa corporal (g) de cada espécime estudado. Após dissecação ventral, as serpentes tiveram o trato genital examinado macroscopicamente. As serpentes prenhes foram eliminadas do estudo. Do macho foi coletado o ducto deferente e o sêmen contido em seu interior. Da fêmea foram coletados o útero posterior, a vagina e o sêmen eventualmente armazenado no útero.

4.4. Coleta dos tecidos e/ou fluidos seminais de *C. d. terrificus*

Os ductos deferentes e os segmentos uterinos contraídos (com sêmen em seu lúmen) foram removidos por laparotomia (LANGLADA, 1973; LANGLADA *et al.* 1994) de serpentes anestesiadas, estirados em placa de poliestireno e raspados para retirada do esperma alojado em seu interior. Os tecidos foram, então, lavados com solução tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, por infusão lenta, através de seringa, no interior desses segmentos, a fim de

assegurar que estivessem livres de esperma. Os segmentos uterinos (livres de sêmen) e o segmento vaginal também foram removidos de serpentes anestesiadas. Procedeu-se a lavagem do útero, por infusão lenta, e do tecido vaginal, com a mesma solução tampão supracitada, para a retirada do muco contido nestes tecidos.

4.5. Avaliação morfo-funcional dos espermatozóides e incubação com peptídeos

Do esperma coletado do ducto deferente, no outono (n=18), ou que estava alojado no tecido uterino, no inverno (n=6), foi realizada medida de pH e análise morfológica (aspecto e tipo de motilidade, observados, em uma gota de sêmen, ao microscópio de luz). Estes dados foram avaliados de acordo com as normas clínico-laboratoriais preconizadas pela WHO (1999).

Parte do sêmen coletado do ducto deferente, no outono (n=5), foi previamente diluído em 5 mL de meio de cultura de células (RPMI-1640) e posteriormente incubado, por 30 min, 25°C, na ausência (controle) ou com os seguintes peptídeos: 0,315 μ M AngII, 0,314 μ M AVT, 0,310 μ M BK, 0,94 μ M FPP, 0,94 μ M FPP + 1,8 mM CaCl₂ e 0,911 μ M TRH. Após, foi efetuado o teste de exclusão pelo azul de tripan (0,4%) nesses incubados. O índice de viabilidade foi determinado pela contagem do número de espermatozóides não corados, num total de 100 espermatozóides/campo em relação aos corados (espermatozóides inviáveis), em hemocitômetro de Neubauer, ao microscópio de luz. A viabilidade foi expressa em porcentagem relativa ao controle (100%).

4.6. Preparo das frações solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM) dos tecidos e do sêmen total de *C. d. terrificus*

Para a obtenção das FS e FM, amostras individuais do ducto deferente e do segmento uterino foram homogeneizados em 10 volumes e o tecido vaginal em 5 volumes (peso em g/

volume em mL), enquanto amostras individuais de sêmen total foram ressuspensas em 1 mL de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, com haste de teflon e potter de vidro, por 2 min a 800 rpm e, então, ultracentrifugados a 100.000 X g por 35 min (Hitachi modelo HIMAC CP56GII). Os sobrenadantes resultantes contêm a FS. Para evitar a contaminação com FS, os pellets obtidos foram lavados 3 vezes com 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 e, então, homogeneizados por 2 min a 800 rpm em 10 mM tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,1% Triton X-100 e ultracentrifugados a 100.000 X g por 35 min. Os sobrenadantes assim obtidos correspondem a FM. Todos os passos foram realizados a 4°C. Após a obtenção de FS e FM, o material homogeneizado foi transferido para tubos de poliestireno e armazenado a -80°C para posterior utilização nas medidas de desidrogenase láctica (conforme item 4.7), teor protéico (conforme item 4.8), atividades peptidásicas (conforme item 4.9) e para procedimentos de incubação (conforme item 4.10).

4.7. Medida de desidrogenase láctica (LDH)

Como marcador do procedimento de separação de FS e FM, dos diferentes tecidos e fluidos, determinou-se a atividade de LDH (BERGMEYER & BRENT, 1972), incubando-se 3 µL de FS ou FM, em triplicata, com 297 µL de NADH (β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida) dissolvida em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 1,6 mM de piruvato e 200 mM NaCl. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços (Corning, Co., USA), utilizando leitura dos incubados a 340 nm, nos tempos de 0 e 10 min, em espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X[®]. O decréscimo dos valores obtidos, em relação ao tempo zero, foram extrapolados pela comparação com a curva-padrão de NADH, dissolvido em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo 200 mM NaCl. A atividade da LDH foi expressa em mmol de NADH oxidado/min/mg de proteína.

4.8. Quantificação da proteína

O teor protéico (frações seminais, FS e FM dos tecidos e sêmen total) foi medido a 630 nm, em triplicata, pelo kit Bio-Rad (BRADFORD, 1976), usando espectrofotômetro leitor de microplaca Bio-Tek Power Wave X[®]. O conteúdo de proteína foi extrapolado pela comparação com as respectivas curvas-padrão de albumina de soro bovino (BSA) dissolvida nos mesmos diluentes da amostra.

4.9. Atividades peptidásicas

As atividades peptidásicas foram quantificadas pela medida de liberação de 4-metoxi- β -naftilamina (para DPPIV e CAP) ou β -naftilamina (para as demais peptidases) (GASPARELLO-CLEMENTE & SILVEIRA, 2002; GASPARELLO-CLEMENTE *et al.*, 2003; IRAZUSTA *et al.*, 2001; IRAZUSTA *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2001; VARONA *et al.*, 2003). Essa liberação representa o resultado da incubação, em microplacas de 96 poços, por 30 min, 37°C, de volumes entre 20 - 50 μ L de FS e FM dos tecidos e do sêmen total (conforme item 4.6), bem como do fluido seminal (SE), prostassoma (PR) e FS e FM dos espermatozóides (conforme item 4.11), com volumes (suficientes para completar 300 μ L de volume total) de substratos previamente aquecidos e diluídos para 0,125 mM (APA, APN-PS, APN-PI, CAP, PAP, PIP e POP), ou para 0,2 mM (DPPIV), ou para 0,5 mM (APB) em 0,05M do tampão correspondente, contendo 0,1 mg/mL de BSA. O conteúdo de compostos de naftilamina foi estimado fluorimetricamente (fluorímetro leitor de microplaca Bio-Tek FL600FA) no comprimento de onda de 460/40nm de emissão, com uma excitação de 360/40nm. A fluorescência, obtida no tempo zero (branco), foi descontada e, então, a fluorescência relativa pode ser convertida em picomoles de β -naftilamina ou metoxi- β -naftilamina, pela comparação com as respectivas curvas-padrão de β -naftilamina ou metoxi- β -naftilamina dissolvidas no mesmo diluente utilizado na incubação.

As atividades das peptidases foram expressas como picomoles de substrato hidrolisado por min (UP) por miligrama de proteína tendo, como pré-condição, a existência da relação linear do ensaio fluorimétrico em função do tempo de hidrólise e do conteúdo protéico. Como as medidas de atividade enzimática têm caráter comparativo, a possível interferência da degradação inespecífica durante a homogenização não foi considerada.

Os seguintes substratos e condições foram utilizados:

- **APA**, L-ácido aspártico α -(β -naftilamida) (solubilizada em 0,012 N NaOH) em tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1 mM MnCl_2 ;
- **APB**, L-arginina- β -naftilamida (solubilizada em H_2O) em tampão fosfato, pH 6,5, contendo 150 mM de NaCl, e 0,02 mM de puromicina;
- **APN**, L-alanina- β -naftilamida (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 1 mM DL-ditiotreitol (DTT) na presença e ausência de 0,02 mM de puromicina – a atividade *APN-PI* é aquela resultante da incubação na presença de puromicina, enquanto a atividade *APN-PS* é aquela resultante da subtração dos valores da atividade obtida na presença de puromicina daqueles da atividade obtida na ausência de puromicina;
- **CAP**, H-Cys-4-metoxi- β -naftilamida (solubilizada em 0,012 N HCl) em tampão Tris maleato, pH 5,9;
- **DPPIV**, glicil-L-prolina-4-metoxi- β -naftilamida (solubilizada em dimetil-sulfóxido, DMSO) em tampão Tris-HCl, pH 8,3;
- **PAP-I**, L-ácido piroglutâmico- β -naftilamida (solubilizada em DMSO) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 2 mM DTT [o DTT inibe a PAP-II e ativa a PAP-I (O'CUINN *et al.* 1990)] e 2 mM ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA);
- **PIP**, L-prolina- β -naftilamida (solubilizada em DMSO) em tampão fosfato, pH 7,4;
- **POP**, Z-Gly-Pro- β -naftilamida (solubilizada em DMSO) em tampão fosfato, pH 7,4, contendo 2 mM DTT.

4.10. Caracterização das atividades peptidásicas

4.10.1. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases

Foram avaliadas, comparativamente, a susceptibilidade das atividades peptidásicas APB, APN, CAP, DPPIV, PAP-I e PIP, em FS e/ou FM, do sêmen do ducto deferente, assim como neste tecido, no útero e na vagina, coletados no outono (pool de 11 animais), frente a:

- **Amastatina** ([[(2S,3R)-3-Amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil]-Val-Val-Asp-OH.HCl): 0,026 mM em ácido acético 8%;
- **Bestatina** ([[(2S,3R)-3-Amino-2-hidroxi-4-fenilbutiril]-L-leucina): 0,026 mM em ácido acético 8%;
- **Diprotina A** (H-Lle-Pro-Lle-OH): 0,026 mM em água deionizada;
- **Puromicina** (3'-[α -Amino-p-metoxihidrocinnamamido]-3-deoxi-N,N dimetiladenosina): 0,026 mM em água deionizada.

As amostras foram incubadas na presença ou ausência destes compostos, por 30 min, 25°C, e as atividades peptidásicas foram quantificadas (conforme item 4.9).

4.10.2. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a peptídeos e outros agentes

Foram avaliadas, comparativamente, a susceptibilidade das atividades peptidásicas, APA, APB, APN, CAP, DPPIV, PAP-I, PIP e POP, em FS e/ou FM, do sêmen do ducto deferente, assim como neste tecido, no útero e na vagina, coletados no outono (pool de 11 animais), frente a:

- 0,315 μ M AngII;
- 0,314 μ M AVT;
- 0,310 μ M BK;
- 0,94 μ M FPP;
- 0,94 μ M FPP + 1,8 mM CaCl_2 ;
- 0,911 μ M TRH;
- 0,97 mM DTT;
- 2 mM EDTA ;
- 1 mM MnCl_2 (ativador da APA).

As amostras foram incubadas na presença ou ausência destes compostos, por 30 min, 25°C, e as atividades peptidásicas foram quantificadas (conforme item 4.9).

4.11. Obtenção do fluido seminal (SE), do prostassoma (PR) e FS e FM dos espermatozóides do sêmen coletado do ducto deferente de *C. d. terrificus*

Para obtenção do SE e do PR e preparação das FS e FM dos espermatozóides, o sêmen total foi coletado do ducto deferente de 5 animais, no outono, e agrupado num pool. O procedimento seguiu a metodologia descrita por FERNÁNDEZ *et al.* (2002) para sêmen humano. O pool de sêmen foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris-salina (Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4) e centrifugado a 600 X g, 20 min (ultracentrífuga Hitachi modelo HIMAC CP56GII). O sobrenadante obtido contém o SE e os PR, sendo separado para utilização posterior, enquanto os espermatozóides são encontrados no pellet. Para evitar a contaminação com o SE, este pellet foi lavado com 1 mL, ressuspensão 2,5 mL de Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4 e centrifugado a 600 X g, 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 2,5 mL, ressuspensão em 2,5 mL de Tris e centrifugado a 1.000 X g, 15 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet resultante contém os

espermatozóides puros. O pellet de espermatozóides puros foi homogeneizado em 2,5 mL de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, por 2 min a 800 rpm e armazenado a -80°C , até o uso. Então, foi incubado a 4°C , 60 min e sonicado (6 pulsos de 30 s, com intervalos de 15 s) e ultracentrifugado a $100.000 \times g$, 4°C por 35 min. O pellet foi armazenado, momentaneamente, e o sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a $100.000 \times g$, 4°C por 35 min, sendo que, após descarte do pellet obtido, este sobrenadante foi considerado a FS dos espermatozóides. O pellet da primeira ultracentrifugação ($100.000 \times g$, 4°C por 35 min) foi, então, homogeneizado a 800 rpm, 2 min, em 1 mL de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, e centrifugado a $100.000 \times g$ por 35 min. Após descarte do sobrenadante desta centrifugação, o pellet foi novamente homogeneizado a 800 rpm, 2 min, em 1 mL de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, considerando-o como a FM dos espermatozóides.

O sobrenadante da primeira centrifugação (contendo o SE e os PR) foi, então, centrifugado a $1.000 \times g$, 4°C por 20 min, para eliminar células debris e espermatozóides residuais. O pellet foi descartado e o sobrenadante obtido foi congelado a -80°C . Após descongelamento, este sobrenadante foi centrifugado a $100.000 \times g$, 4°C por 120 min. O pellet obtido foi separado e o sobrenadante novamente ultracentrifugado nas mesmas condições. Então, este último sobrenadante contém o SE. Este último pellet, bem como o primeiro destas centrifugações, foram lavados com 0,6 mL de Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4, ressuspensos em igual volume deste tampão e misturados. O volume de 1,2 mL desta ressuspensão foi submetido ao processo de cromatografia de filtração molecular em resina Sephadex G-200 (1,5 x 30 cm), sob fluxo de 0,16 mL/min. Antes de ser aplicado nesta coluna, a qual foi equilibrada neste mesmo tampão Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4, esta ressuspensão foi filtrada em membrana de poro $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro (Millipore). Os PR não são retidos na coluna (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002) e, portanto, foram coletados no volume morto (V_0), constituindo a fração PR. O V_0 foi determinado pela passagem de Blue dextran.

O PR obtido foi centrifugado por 100.000 X g, 120 min e o pellet resultante, foi homogeneizado em 1 mL com Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4, constituindo a fração de PR. Todos os passos foram realizados a temperatura de 4°C. Após a obtenção de SE, PR, FS e FM dos espermatozóides, o material foi transferido para tubos de poliestireno e armazenado a -80°C para posterior utilização nas medidas de desidrogenase láctica (conforme item 4.7), teor protéico (conforme item 4.8) e atividades peptidásicas (conforme item 4.9). Parte da fração PR foi destinada à microscopia eletrônica, conforme descrito no item 4.12.

4.12. Microscopia eletrônica da fração PR

Quinze µL da suspensão PR foram aplicados sobre grades de cobre recobertas com filme de parlódio e de carbono. Após 2 min, o excesso do líquido foi removido com auxílio de papel de filtro e imediatamente colocou-se 15 µL de solução aquosa de ácido fosfotúngstico 2%, pH 7,2. Retirou-se totalmente a solução contrastante com um papel de filtro, após 5-10 segundos. As grades foram, então, examinadas e micrografadas (Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss, EM9S, do Laboratório de Genética do Instituto Butantan).

4.13. Análise dos resultados

Os dados foram analisados estatisticamente usando os programas computacionais GraphPad InStat™ e GraphPad Prism™. A análise de regressão foi utilizada para obter as curvas-padrão de proteína, β-naftilamina e metoxi-β-naftilamina. A análise de variância (ANOVA) seguida, pelo teste de Bonferroni, compara os valores de cada peptidase, em cada tecido ou no sêmen, nas estações do ano e entre todas as peptidases numa mesma estação do ano. O teste t de Student foi utilizado para comparar valores pareados para LDH das FS e FM de uma mesma origem, para as atividades peptidásicas de FS ou FM do sêmen coletado do macho e da fêmea e para comparar valores pareados de FS ou FM dos tecidos e do sêmen

total na presença ou na ausência (controle) dos inibidores de aminopeptidases, substratos peptídicos e outros agentes. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação morfo-funcional dos espermatozóides e incubação com peptídeos

As serpentes utilizadas neste estudo apresentaram (média $\pm$ E.P.M), machos: CRC=90,18 $\pm$ 1,72 cm, CC= 10,28 $\pm$ 0,35 cm e 589,91 $\pm$ 42,10 g massa corporal (n=44); fêmeas: CRC=87,66 $\pm$ 2,02 cm, CC=6,50 $\pm$ 0,12 cm e 633,42 $\pm$ 42,50 g massa corporal (n=43). Estes valores correspondem ao padrão morfométrico adulto. O CC é significativamente maior em machos que em fêmeas (teste t de Student, não-pareado, bicaudal, $P < 0,0001$).

O pH do sêmen coletado no ducto deferente (n=18) variou entre 7,0 e 7,5, enquanto que o do sêmen armazenado na fêmea foi de 7,0 (n=6). O aspecto do sêmen, de ambas as coletas, é viscoso, como gel, e a coloração varia de branco a marfim. Não ocorreu liquefação deste sêmen até 120 min de observação (Tabela 1). A liquefação é entendida como a mudança do estado gelatinoso para líquido.

Os espermatozóides de *C. d. terrificus* possuem o acrossoma em forma pontiaguda. Notou-se que, imediatamente após a coleta, o sêmen, em estado gelatinoso (e que não foram diluídos), mantêm um movimento circular que, em seguida, passa a ser retilíneo, até a aglutinação dos mesmos, lateralmente, com alinhamento cabeça-cabeça. No sêmen armazenado no útero o pH foi menos variável e a presença de outras células, além dos espermatozóides, não foi detectada (Tabela 1). Esses espermatozóides também agregam-se, pela cabeça, com estruturas não identificadas, conforme mostra a Figura 6. Foram encontrados espermatozóides no ducto deferente em todas as estações do ano.

A Tabela 2 mostra a ação de peptídeos, considerados substratos naturais das peptidases sob estudo, sobre a viabilidade espermática do sêmen coletado no outono. A porcentagem de espermatozóides viáveis no controle variou entre 53-60%. A preservação da viabilidade ocorreu na seguinte ordem: AngII < TRH < FPP < AVT < controle < FPP+Ca(2+) < BK.

Tabela 1. Padrão físico-químico e morfológico do sêmen do ducto deferente, coletado no outono (n=18), e do sêmen armazenado no útero, durante o inverno (n=6), da cascavel *C. d. terrificus*, comparativamente ao sêmen humano.

	Sêmen humano •	Sêmen coletado do ducto deferente	Sêmen armazenado no útero
Liquefação	Até 60 min	Não ocorre	Não ocorre
Coloração	Cinza opalescente	Branco a marfim	Branco a marfim
pH	7,2-8,0	7,0-7,5	7,0
Aglutinação	Cabeça-cabeça Cauda-cauda Cabeça-cauda	Cabeça-cabeça	Não ocorre
Agregação	Células debris	Células não identificadas	Não ocorre
Movimento dos espermatozóides	Retilíneo	Retilíneo e circular	Retilíneo e circular
Acrossoma	Oval	Pontiagudo	Pontiagudo

• Dados da Organização Mundial da Saúde, 1999

Figura 6. Fotomicrografia de espermatozóides (★) e estruturas não identificadas (→) do sêmen, coletado no outono, do ducto deferente de *C. d. terrificus*. Aumento: 200X.

Tabela 2. Viabilidade dos espermatozóides do sêmen coletado, no outono, do ducto deferente de *C. d. terrificus*, após incubação (30 min, 25° C) com meio de cultura RPMI-1640 (controle - 100%) e com cada um dos seguintes peptídeos: angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)] e hormônio liberador de tireotrofina (TRH).

Peptídeos	% de espermatozóides viáveis em relação ao controle (100%)
AngII	80,15
AVT	98,68
BK	108,22
FPP	88,81
FPP + Ca(2+)	107,07
TRH	83,32

Número de animais = 5

Os espermatozóides viáveis são os que não se coram pelo azul de tripan (0,4%).

5.2. Medida de desidrogenase láctica

A Figura 7 mostra que, considerando todos os tecidos e sêmens examinados, a atividade de LDH variou entre $0,56 \pm 0,07$ a $1,67 \pm 0,19$ mmol de NADH oxidado/min/mg de proteína na FS e entre $0,20 \pm 0,02$ a $0,51 \pm 0,07$ mmol de NADH oxidado/min/mg de proteína na FM, sendo sempre maior na FS que na FM (cerca de seis vezes no sêmen armazenado no útero e três vezes nos tecidos estudados e no sêmen coletado do ducto deferente).

5.3. Caracterização das atividades peptidásicas

5.3.1. Atividades peptidásicas dos tecidos e do sêmen total coletado do ducto deferente ou do útero

As Figuras 8 - 16 mostram que, em geral, independentemente das flutuações sazonais, as atividades peptidásicas detectáveis foram APA, APB, APN-PI, APN-PS, CAP, DPPIV, PAP, PIP e POP em FS, enquanto as atividades de APA, APN-PI, APN-PS, CAP, DPPIV e PAP existem na FS e FM. Ainda, em geral, independentemente das flutuações sazonais, as atividades APN-PI e APN-PS (em FS e FM) e APB foram predominantes em todos os tecidos e nos sêmens examinados, sendo a APN-PI a que destacou-se tanto em FS quanto em FM.

5.3.2. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases

A reduzida atividade APA, em todos os tecidos e no sêmen, impossibilitou a determinação do efeito dos inibidores utilizados. A atividade POP, por ser, caracteristicamente, uma endopeptidase (a única aqui sob estudo), não foi avaliada frente aos inibidores clássicos de aminopeptidases.

As Tabelas 3 - 7 mostram que, considerando-se, conjuntamente, a maioria dos tecidos e fluidos estudados, em geral as atividades de APB e APN foram inibidas, com maior eficiência, pela amastatina e bestatina, enquanto a diprotina A foi o inibidor mais eficiente para a DPPIV em FM. A atividade DPPIV em FS e a atividade de CAP em FM decresceram na presença de qualquer dos inibidores avaliados. Bestatina e puromicina pareceram ser, respectivamente, os melhores inibidores para a PAP-I e PIP.

Figura 7. Atividade de desidrogenase láctica (média $\pm$ E.P.M) das frações solúvel (barras brancas) e de membrana solubilizada (barras escuras) do sêmen do ducto deferente e dos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, e do sêmen armazenado (no inverno) no útero de *C. d. terrificus*. Número de animais entre parênteses.

* $P < 0,0003$ relativamente à fração solúvel (teste t-Student não pareado, bicaudal)

Tabela 3. Atividade remanescente de aminopeptidase básica (APB) no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.

Inibidores	Atividade APB remanescente (% do controle)			
	Sêmen	Ducto deferente	Útero	Vagina
Amastatina	4,90	6,43	4,98	16,54
Bestatina	6,93	5,66	13,36	15,94
Diprotina A	112,22	96,45	102,81	108,10
Puromicina	95,42	57,02	64,06	85,55

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
Controle (sem inibidor) = 100%

Tabela 4. Atividade remanescente de aminopeptidase neutra (APN), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.

Inibidores	Atividade APN remanescente (% do controle)							
	Sêmen		Ducto deferente		Útero		Vagina	
	FS	FM	FS	FM	FS	FM	FS	FM
Amastatina	9,30	14,04	0	0,66	0,55	1,40	5,17	0,29
Bestatina	69,31	21,41	31,84	10,70	34,78	38,46	35,34	40,63
Diprotina A	100,58	54,36	79,54	53,59	111,75	90,11	90,44	100,07
Puromicina	93,59	45,15	54,82	46,04	50,92	82,79	59,08	95,96

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
 Controle (sem inibidor) = 100%

Tabela 5. Atividade remanescente de cistil aminopeptidase (CAP), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente, coletado no outono, de *C. d. terrificus*, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.

Inibidores	Atividade CAP remanescente (% do controle)	
	FS	FM
Amastatina	82,89	0
Bestatina	7,89	0
Diprotina A	48,02	0
Puromicina	34,20	11,25

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais

Controle (sem inibidor) = 100%

A reduzida atividade CAP, nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, impossibilitou a determinação do efeito dos agentes utilizados.

Tabela 6. Atividade remanescente de dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.

Inibidores	Atividade DPPIV remanescente (% do controle)							
	Sêmen		Ducto deferente		Útero		Vagina	
	FS	FM	FS	FM	FS	FM	FS	FM
Amastatina	51,42	89,34	88,05	50,38	47,16	78,46	60,66	62,06
Bestatina	52,26	91,45	62,70	78,06	54,14	83,83	58,57	63,84
Diprotina A	51,15	68,32	52,11	46,08	52,80	60,95	62,88	41,86
Puromicina	68,83	91,17	79,42	84,98	72,02	29,43	75,70	1,41

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
 Controle (sem inibidor) = 100%

Tabela 7. Atividade remanescente de piroglutamil aminopeptidase tipo 1 (PAP-I), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.

Inibidores	Atividade PAP-I remanescente (% do controle)				
	Sêmen	Ducto deferente	Útero		Vagina
	FS	FS	FS	FM	FS
Amastatina	78,42	0	18,78	137,51	12,50
Bestatina	55,68	0	24,82	22,51	43,75
Diprotina A	96,59	0	86,57	197,52	162,50
Puromicina	55,68	8,96	40,93	7,50	185,44

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais

Controle (sem inibidor) = 100%

A reduzida atividade PAP-I, na FM do sêmen e dos tecidos do ducto deferente e vagina, impossibilitou a determinação do efeito dos agentes utilizados.

Tabela 8. Atividade remanescente de prolil iminopeptidase (PIP) nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a inibidores clássicos de aminopeptidases.

Inibidores	Atividade PIP remanescente (% do controle)		
	Ducto deferente	Útero	Vagina
Amastatina	140,00	20,55	2,54
Bestatina	120,00	39,52	0
Diprotina A	141,40	75,50	0
Puromicina	0	3,56	0

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais

Controle (sem inibidor) = 100%

A reduzida atividade PIP do sêmen impossibilitou a determinação do efeito dos agentes utilizados.

5.3.3. Perfil de atividade peptidásica dos tecidos e do sêmen total, frente a peptídeos e outros agentes

A reduzida atividade APA, em todos os tecidos e no sêmen, impossibilitou a avaliação do efeito dos agentes utilizados. Considerando-se, conjuntamente, a maioria dos tecidos e fluidos estudados, as Tabelas 9 - 15 mostram, em geral, que o EDTA decresceu as atividades de APB e APN, o DTT favoreceu as atividades de CAP e PAP-I, e o $MnCl_2$ decresceu as atividades de APB, CAP e DPPIV. Em geral, os peptídeos apresentaram efeito variável, dependendo do tecido considerado, sobre as atividades peptidásicas. Todos os peptídeos avaliados apresentaram um padrão comum de diminuição da atividade APB no útero (Tabela 9), das atividades APN, em FM (Tabela 10), e DPPIV, em FS (Tabela 12), do sêmen, ducto deferente e útero, da atividade CAP, em FS e FM, do sêmen (Tabela 11), da atividade DPPIV, em FM, do sêmen, ducto e vagina (Tabela 12), da atividade PAP-I, em FS, do ducto deferente (Tabela 13) e das atividades PIP (Tabela 14) e POP (Tabela 15) no útero e vagina (Tabela 15). O FPP+Ca(2+) promoveu uma diminuição da atividade DPPIV, em FS e FM, de todos os tecidos e sêmen avaliados (Tabela 12). A atividade PAP-I, em FS e FM, de todos os tecidos e do sêmen, foi diminuída por FPP, FPP+Ca(2+) e TRH (Tabela 13). A resposta da atividade PIP aos peptídeos avaliados distinguiu-se no ducto deferente em relação ao útero e vagina (Tabela 14). A atividade POP do sêmen foi incrementada por todos os peptídeos avaliados (Tabela 15).

Tabela 9. Atividade remanescente de aminopeptidase básica (APB) no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradiginina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade APB remanescente (% do controle)			
	Sêmen	Ducto deferente	Útero	Vagina
AngII	104,74	101,18	40,29	136,79
AVT	111,71	82,60	74,09	95,92
BK	94,83	99,23	68,39	98,89
FPP	98,86	92,23	57,13	91,43
FPP+Ca(2+)	102,00	55,28	70,64	80,36
TRH	100,64	86,36	80,49	84,29
DTT	42,43	98,04	53,39	94,95
EDTA	38,72	33,81	14,27	58,87
MnCl₂	86,49	46,99	56,09	76,72

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
 Controle (salina 0,9%) = 100%

Tabela 10. Atividade remanescente de aminopeptidase neutra (APN), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade APN remanescente (% do controle)							
	Sêmen		Ducto deferente		Útero		Vagina	
	FS	FM	FS	FM	FS	FM	FS	FM
AngII	103,61	83,69	94,13	75,15	106,76	90,17	88,51	101,74
AVT	104,75	79,94	84,48	78,08	114,84	95,75	90,58	102,98
BK	102,37	84,21	91,54	76,23	117,12	83,57	94,48	96,91
FPP	104,83	88,41	84,03	73,35	116,96	98,40	94,14	102,61
FPP+Ca(2+)	104,32	87,30	57,97	58,85	120,90	73,58	87,66	88,96
TRH	101,93	84,03	87,32	69,65	122,24	91,05	86,15	102,21
DTT	106,01	87,62	97,38	61,81	120,45	81,24	102,64	96,25
EDTA	74,14	15,62	21,12	1,53	21,05	1,79	31,41	1,15
MnCl₂	107,25	70,52	83,45	66,40	114,09	87,06	96,54	114,44

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
 Controle (salina 0,9%) = 100%

Tabela 11. Atividade remanescente de cistil aminopeptidase (CAP), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente, coletado no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradisinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditioneitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade CAP remanescente (% do controle)	
	FS	FM
AngII	19,74	0
AVT	28,28	0
BK	0	0
FPP	36,18	0
FPP+Ca(2+)	9,87	0
TRH	0	0
DTT	2509,71	7586,54
EDTA	122,36	236,22
MnCl₂	84,21	0

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais

Controle (salina 0,9%) = 100%

A reduzida atividade CAP, nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, impossibilitou a determinação do efeito dos agentes utilizados.

Tabela 12. Atividade remanescente de dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade DPPIV remanescente (% do controle)							
	Sêmen		Ducto deferente		Útero		Vagina	
	FS	FM	FS	FM	FS	FM	FS	FM
AngII	89,15	85,39	87,60	64,13	78,32	98,57	108,72	81,26
AVT	97,32	93,83	85,82	72,66	89,90	102,25	109,70	71,91
BK	90,95	92,45	87,55	83,88	84,83	101,99	99,60	80,30
FPP	84,50	90,83	74,06	74,01	94,25	100,91	93,72	81,87
FPP+Ca(2+)	72,19	82,42	76,28	74,94	69,82	92,59	65,46	62,24
TRH	86,43	89,03	76,51	51,90	88,24	96,49	100,27	73,55
DTT	88,15	82,88	73,88	76,46	85,60	104,77	106,36	87,78
EDTA	94,60	86,26	97,14	77,05	85,52	106,33	96,31	88,60
MnCl₂	66,52	72,82	69,51	55,61	63,74	90,33	62,79	73,05

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
 Controle (salina 0,9%) = 100%

Tabela 13. Atividade remanescente de piroglutamil aminopeptidase tipo 1 (PAP-I), em fração solúvel (FS) e de membrana solubilizada (FM), no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade PAP-I remanescente (% do controle)				
	Sêmen	Ducto deferente	Útero		Vagina
	FS	FS	FS	FM	FS
AngII	94,34	0	12,08	7,50	139,56
AVT	198,87	0	57,72	242,54	145,81
BK	59,09	0	106,04	205,03	197,94
FPP	0	0	86,57	37,58	18,75
FPP+Ca(2+)	17,05	0	42,94	0	66,69
TRH	62,50	4,48	48,98	0	91,69
DTT	113,64	195,57	139,58	169,99	3477,07
EDTA	80,70	19,39	102,01	227,53	3725,00
MnCl₂	0	101,52	14,76	0	3522,94

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais

Controle (salina 0,9%) = 100%

A reduzida atividade PAP-I, na FM do sêmen e dos tecidos do ducto deferente e vagina, impossibilitou a determinação do efeito dos agentes utilizados.

Tabela 14. . Atividade remanescente de prolil iminopeptidase (PIP) nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradicinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade PIP remanescente (% do controle)		
	Ducto deferente	Útero	Vagina
AngII	20,00	21,74	60,18
AVT	120,00	37,15	30,91
BK	140,00	88,94	13,55
FPP	40,000	36,37	0
FPP+Ca(2+)	196,30	33,59	93,41
TRH	166,60	28,85	0
DTT	406,60	54,16	90,69
EDTA	286,600	20,55	0
MnCl₂	426,60	84,19	166,11

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais

Controle (salina 0,9%) = 100%

A reduzida atividade PIP do sêmen impossibilitou a determinação do efeito dos agentes utilizados.

Tabela 15. Atividade remanescente de prolil endopeptidase (POP) no sêmen do ducto deferente e nos tecidos do ducto deferente, útero e vagina, coletados no outono, de *C. d. terrificus*, frente a angiotensina II (AngII), arginina vasotocina (AVT), bradisinina (BK), peptídeo promotor da fecundação (FPP), peptídeo promotor da fecundação com cálcio [FPP + Ca(2+)], hormônio liberador de tireotrofina (TRH), DL-ditiotreitol (DTT), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e MnCl₂.

Agentes	Atividade POP remanescente (% do controle)			
	Sêmen	Ducto deferente	Útero	Vagina
AngII	118,45	112,56	54,83	78,06
AVT	139,97	90,58	86,66	74,89
BK	140,05	98,34	79,83	77,36
FPP	149,31	86,45	71,32	75,46
FPP+Ca(2+)	151,51	102,83	88,13	66,43
TRH	160,61	94,09	85,08	66,08
DTT	127,91	88,30	78,20	75,86
EDTA	103,21	95,44	91,33	87,31
MnCl₂	117,05	83,81	94,22	86,26

Valores são a média de triplicata de uma mesma amostra de um pool de 11 animais
 Controle (salina 0,9%) = 100%

5.4. Variação sazonal das atividades peptidásicas

De um total de 43 fêmeas não-prenhes amostradas durante o estudo (18 meses), encontrou-se sêmen armazenado no útero em 8 delas, sendo em 6, durante o inverno, e apenas em 2, durante o outono. Das 43 fêmeas, 23,26% foram amostradas na primavera, 13,95% no verão, 37,21% no outono e 25,58% no inverno. De fato, estas atividades foram mensuradas ao longo de 18 meses, pois o que se deve abranger são as estações do ano, ou seja, ao longo de um mesmo ano, as chances de amostrar fêmeas em vitelogênese primária, as quais, então, obrigatoriamente, haviam estado em vitelogênese secundária no ano anterior, são as mesmas de amostrar exemplares em vitelogênese secundária, os quais, então, obrigatoriamente, haviam estado em vitelogênese primária no ano anterior. Isso porque o ciclo da fêmea *C. d. terrificus* é bienal e, assim, há sempre, em cada ano, 50% de fêmeas reprodutivas ou em vitelogênese secundária.

As atividades APA, APB, APN-PI, APN-PS, CAP, DPPIV, PAP e POP em FS e, APA, APN-PI, APN-PS e DPPIV em FM, variam sazonalmente em alguns tecidos e/ou no sêmen (Figuras 8-15). No ducto deferente, em FS, a atividade APA é maior no outono em relação a primavera, a DPPIV é maior no inverno em relação ao verão, enquanto que a PAP-I é maior no verão em relação a primavera e ao inverno (Figura 8). Ainda, no ducto deferente, em FM, as atividades APN-PI, APN-PS e DPPIV são maiores no outono que nas outras estações, enquanto as demais atividades peptidásicas permanecem inalteradas ao longo de todas as estações (Figura 9). Em FS do sêmen do ducto deferente, as atividades APB e POP são maiores no verão que nas demais estações, enquanto que a atividade APA é maior no inverno em relação as demais estações (Figura 10). Ainda, APN-PS é maior no inverno que nas demais estações e APN-PI é maior no inverno em relação a primavera (Figura 10). A Figura 11 mostra que a atividade APN-PI, em FM do sêmen do ducto deferente, é maior no inverno em relação a primavera, enquanto APN-PS é maior no inverno em relação as demais estações.

A atividade DPPIV é maior no outono em relação ao verão (Figura 11). Em FS do útero, a atividade de APA é maior no inverno em relação ao outono (Figura 12). Na FM do útero, a atividade APA é maior no inverno em relação as demais estações (Figura 13). A atividade de APN-PS em FS do útero é maior no inverno em relação ao outono (Figura 12). Em FM uterina, a atividade de APN-PI foi maior no inverno que no outono (Figura 13). A Figura 14 mostra que na FS do tecido vaginal as atividades APA, APB e PAP são maiores no inverno que nas demais estações, enquanto que APN-PS é maior no inverno em relação ao outono. A atividade CAP na FS é maior no inverno em relação a primavera e verão (Figura 14). Na Figura 15 observa-se que, na FM do tecido vaginal, a atividade APA é maior no inverno em relação as demais estações, enquanto que a atividade de APN-PS é maior no inverno em relação ao verão.

A Figura 16 mostra que, no sêmen coletado no útero, as atividades de APN-PS e APB têm maior nível que as demais atividades, sob estudo, em FS. Não há diferença estatística, quanto ao nível de atividade, entre as peptidases, sob estudo, em FM do sêmen coletado no útero (Figura 16).

Na Tabela 16, são comparados os níveis de atividade peptidásica do sêmen do ducto deferente, coletado ao longo do ano, em relação ao sêmen coletado do útero da fêmea no inverno. Há diferenças entre ambos quanto aos níveis de atividade APN-PS, DPPIV e PAP-I, em FS e FM, APA e APN-PI, em FS, CAP, em FM, e PIP e POP. Na primavera, APA-FS, APN-PS em FS, DPPIV-FM, PAP-I (FS e FM), PIP e POP foram menores, enquanto a APN-PI em FS foi maior no sêmen do ducto deferente, comparativamente ao sêmen armazenado no útero. No verão, a APN-PI em FS foi maior, enquanto a APN-PS em FS foi menor que no sêmen do útero. No outono, foram menores as atividades de APN-PS em FS, CAP-FM, DPPIV-FM, PAP-I (FS e FM), e PIP, enquanto as atividades de APN-PI em FS e APN-PS em FM foram maiores no sêmen do ducto que no sêmen armazenado no útero. No inverno, APN-

PI em FS e APN-PS (em FS e FM) foram maiores, enquanto CAP-FM, DPPIV (FS e FM), PAP-I em FM e PIP foram menores no sêmen do ducto deferente que no sêmen armazenado no útero.

FIGURA 8

Figura 8. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do ducto deferente de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença em uma mesma estação em relação a: # todas atividades; Δ todas atividades, exceto APB; + todas atividades, exceto APN-PS; - todas atividades, exceto APN-PS, POP, APA; $\blacklozenge$ todas atividades, exceto APB, POP (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

FIGURA 9

Figura 9. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada do ducto deferente de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença em uma mesma estação em relação a: # todas atividades; ○ todas atividades, exceto PAP (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

FIGURA 10

Figura 10. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do sêmen coletado do ducto deferente de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença, em uma mesma estação, em relação a: # todas atividades; Δ todas atividades, exceto APB; + todas atividades, exceto APN-PS; $\blacklozenge$ todas atividades, exceto APN-PI; θ todas atividades, exceto POP (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

FIGURA 11

Figura 11. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada do sêmen coletado do ducto deferente de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença, em uma mesma estação, em relação a: # todas atividades; + todas atividades, exceto APN-PS; ♦ todas atividades, exceto APN-PI (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

FIGURA 12

Figura 12. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do útero de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença, em uma mesma estação, em relação a: # todas atividades; θ todas atividades, exceto APB, APN-PS; + todas atividades, exceto APN-PS; $\circ$ todas atividades, exceto APB, APN-PI; Δ todas atividades, exceto APB; $\bullet$ todas atividades, exceto APA, APN-PI, APN-PS (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

Verão

FIGURA 13

Inverno

Figura 13. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada do útero de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

diferença em relação a todas atividades em uma mesma estação (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

FIGURA 14

Figura 14. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel da vagina de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença, em uma mesma estação, em relação a: # todas atividades; Δ todas atividades, exceto APB; $\blacklozenge$ todas atividades, exceto APN-PI; + todas atividades, exceto APN-PS; $\circ$ todas atividades, exceto APB, APN-PI; ∞ todas atividades, exceto APB, DPPIV, PAP, POP; $\bullet$ DPPIV, CAP; $\square$ todas atividades, exceto APN-PI, APN-PS; θ todas atividades, exceto APB, APN-PS (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra).

FIGURA 15

Figura 15. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) e piroglutamil tipo 1 (PAP-I) em fração de membrana solubilizada da vagina de *C. d. terrificus* na estação chuvosa (primavera/ verão) e seca (outono/ inverno).

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Letras diferentes indicam diferenças sazonais de uma mesma atividade peptidásica (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni $P < 0,05$)

Diferença, em uma mesma estação, em relação a: # todas atividades; □ DPPIV, PAP e CAP (análise de variância ANOVA $P < 0,05$, Bonferroni, P indicado cima da barra).

Fração solúvel

FIGURA 16

Fração de membrana solubilizada

Figura 16. Atividades (média $\pm$ E.P.M) de aminopeptidases ácida (APA), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), piroglutamil tipo 1 (PAP-I) e dipeptidil-peptidase IV (DPPIV) em frações solúvel e de membrana solubilizada e de aminopeptidases básica (APB), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em fração solúvel do sêmen armazenado no útero de *C. d. terrificus* no inverno.

Número de animais entre parênteses.

UP= pmoles de substrato hidrolisado/min.

Diferença, nessa fração, em relação a: ■ DPPIV, PAP e CAP; θ todas atividades, exceto APB, PIP (análise de variância ANOVA $P<0,05$, Bonferroni, P indicado acima da barra)

Tabela 16. Atividades (UP/mg de proteína) de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), pirolutamil tipo 1 (PAP-I), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) em frações solúvel (FS) e/ou de membrana solubilizada (FM) dos sêmens de *C. d. terrificus* coletados do ducto deferente do macho, ao longo do ano, e do útero da fêmea, no inverno.

Atividades	Sêmen do ducto deferente (Primavera)	Sêmen do ducto deferente (Verão)	Sêmen do ducto deferente (Outono)	Sêmen do ducto deferente (Inverno)	Sêmen armazenado no útero (Inverno)
APA (FS)	302,51 ± 111,31*** (12)	488,46 ± 110,92 (4)	690,99 ± 179,58 (16)	2750,01 ± 1105,10 (9)	4805,91 ± 3822,90 (6)
APA (FM)	224,76 ± 85,02 (10)	453,77 ± 266,45 (4)	837,53 ± 229,01 (16)	3366,35 ± 1437,90 (12)	36814,75 ± 33717,00 (5)
APB (FS)	13786,22 ± 2054,60 (10)	35907,06 ± 7308,30 (4)	18549,43 ± 3227,30 (15)	12410,84 ± 2.617,50 (10)	16790,57 ± 6004,20 (5)
APN-PI (FS)	24605,48 ± 2451,30*** (10)	32065,38 ± 3936,20*** (4)	30372,25 ± 3107,80*** (13)	40584,13 ± 3372,00*** (11)	3993,46 ± 873,22 (6)
APN-PI (FM)	14864,89 ± 3426,30 (11)	22719,36 ± 3038,90 (4)	23865,78 ± 1937,70 (13)	26478,50 ± 3363,50 (11)	26272,97 ± 10960,00 (5)
APN-PS (FS)	7853,17 ± 1766,20** (11)	113,20 ± 113,20** (4)	9018,50 ± 1132,80** (10)	50395,03 ± 6492,10** (11)	19711,91 ± 3995,60 (5)
APN-PS (FM)	8972,13 ± 1618,80 (11)	7103,04 ± 1080,70 (4)	12636,71 ± 1290,40* (11)	40399,89 ± 5481,60 ** (11)	5730,68 ± 2808,60 (5)
CAP (FS)	23,87 ± 15,25 (12)	125,36 ± 51,37 (4)	30,55 ± 14,45 (14)	109,99 ± 35,15 (12)	24,10 ± 24,10 (6)
CAP (FM)	117,88 ± 67,22* (12)	37,65 ± 10,39 (4)	30,26 ± 12,81 ** (15)	138,40 ± 50,33* (11)	1510,47 ± 770,66 (5)
DPPIV (FS)	336,43 ± 106,16 (12)	0 (4)	233,64 ± 57,20 (13)	136,01 ± 26,79** (8)	371,41 ± 82,48 (5)
DPPIV (FM)	301,49 ± 69,23** (12)	0 (4)	559,54 ± 152,72* (11)	443,07 ± 77,25* (11)	6624,74 ± 3484,00 (5)
PAP-I (FS)	93,72 ± 18,76*** (11)	214,51 ± 67,87 (4)	260,79 ± 33,92** (14)	288,54 ± 102,04 (14)	598,77 ± 131,18 (6)
PAP-I (FM)	7,06 ± 3,27** (10)	38,18 ± 28,54 (4)	231,02 ± 70,82** (16)	98,52 ± 61,34** (11)	1178,98 ± 525,59 (5)
PIP (FS)	172,77 ± 45,64* (9)	421,35 ± 111,64 (4)	256,99 ± 65,53** (15)	252,53 ± 61,71 * (8)	2019,49 ± 1624,49 (2)
POP (FS)	1075,52 ± 133,56** (10)	3330,85 ± 294,71 (4)	1777,15 ± 251,92 (14)	1684,57 ± 447,49 (8)	2529,37 ± 698,92 (4)

Resultados representam média ± E.P.M. Número de animais entre parênteses.

* P<0,03, ** P<0,01 e *** P < 0,0007 comparativamente ao sêmen armazenado no útero (teste t-Student não pareado, bicaudal)

5.5. Fracionamento seminal

Conforme ilustra a Figura 17, a determinação do Vo, na coluna cromatográfica de filtração molecular em resina Sephadex G-200, foi obtida pela passagem do Blue Dextran. A absorbância a 280 nm foi monitorada, demonstrando a existência do pico correspondente a fração PR, eluído no Vo. O eluato do PR, analisado por microscopia eletrônica, confirmou a presença de numerosas vesículas arredondadas ou ovaladas, com diâmetro médio de 100 – 130 nm, como mostrado na Figura 19.

A Figura 18 mostra as atividades peptidásicas nas frações seminais: fluido seminal (SE), protossoma-símile (PR) e FS e FM dos espermatozóides. No SE a atividade APN-PI foi predominante, seguida por APB e POP. No PR também se obteve a predominância de APN-PI, seguida de APB e APN-PS. Na FS dos espermatozóides, as atividades APN-PS e APN-PI foram as de maior destaque. Embora na FM dos espermatozóides as atividades peptidásicas apresentem uma distribuição mais eqüitativa, ainda assim predominam as atividades APN-PS e APN-PI.

Figura 17. Cromatografia de filtração molecular em resina Sephadex G-200, equilibrada e lavada com tampão Tris 30 mM com NaCl 130 mM, pH 7,4, sob fluxo de 0,16 mL/min.

Figura 18. Atividades de aminopeptidases ácida (APA), básica (APB), alanil insensível (APN-PI) e sensível à puromicina (APN-PS), cistil (CAP), piroglutamil tipo 1 (PAP-I), dipeptidil-peptidase IV (DPP IV), prolil-imino (PIP) e prolil endopeptidase (POP) nas frações seminais, fluido seminal, prostassoma, fração solúvel e de membrana solubilizada dos espermatozóides.

Figura 19. Fotomicrografia eletrônica de prostassoma-símile (→) obtida do sêmen coletado do ducto deferente de *C. d. terrificus*, no outono. Barra: 192 nm. Aumento: 52.000X

6. DISCUSSÃO

6.1. Morfo-funcionalidade dos espermatozóides sob efeito de peptídeos

Na avaliação microscópica do sêmen do ducto deferente de *C. d. terrificus* a não liquefação, bem como motilidade, aglutinação e agregação, confirmam descrição prévia de ALMEIDA-SANTOS *et al.* (2004b), que o caracterizam como distinto do sêmen humano. A melhor manutenção do pH e ausência de outros tipos celulares no sêmen armazenado no útero, em relação ao sêmen do ducto deferente, sugerem que o útero da fêmea provê condições peculiares para o LTSS. Enquanto uma amostra de sêmen humano normal se liquefaz em até 60 min, sob temperatura ambiente, o da cascavel não muda sua viscosidade mesmo com o dobro desse tempo. Sabe-se que a liquefação do sêmen humano resulta, principalmente, da fragmentação proteolítica do coágulo do plasma seminal, formado por semenogelina I, II e fragmentos de fibronectina, pelo antígeno específico da próstata (PSA), uma serino protease do plasma seminal (KOISTINEN *et al.*, 2002). Ocasionalmente, ocorre a não liquefação do sêmen humano. Neste caso, a mistura mecânica ou a digestão enzimática (por exemplo, por bromelaína (1g/L) permite obter a liquefação (WHO, 1999). Independentemente da estação de coleta, verificamos que a agitação mecânica do sêmen de *C. d. terrificus* (coletado do ducto deferente ou do útero) não basta para promover a liquefação. Observamos, também, que tanto a adição de bromelaína (extraída do homogenato do abacaxi) na proporção de 1:1, como hialuronidase 0,04 mg, não alteraram a viscosidade do sêmen da cascavel. Evidentemente, isto pode ser atribuído, em parte, à ineficiência de PSA na cascavel. O completo processamento das semenogelinas pela PSA é considerado importante para a fertilização (LILJA, 1985). Por isso, podemos considerar que o sêmen do ducto deferente não se liquefaz para conservar esses componentes, os quais seriam degradados, posteriormente, no trato reprodutivo feminino, na época da fertilização. Embora o PSA é muito específico no

trato reprodutivo masculino de mamíferos, também tem sido encontrado, em níveis mais baixos, no fluido amniótico e na glândula mamária de fêmeas (YU & BERKEL, 1999). Ainda, considerando que essa relativa incapacidade de liquefação ocorre apesar dos altos níveis de atividade aminopeptidásica seminal observados no presente estudo, devemos rejeitar algum papel dessa atividade enzimática na liquefação do coágulo do sêmen de *C. d. terrificus*, tal qual CHATTERJEE *et al.* (1997) preconizam em relação ao sêmen humano ejaculado.

Algumas características dos espermatozóides humanos normais são movimento retilíneo progressivo, aglutinação e agregação (WHO, 1999). Na cascavel *C. d. terrificus* o movimento dos espermatozóides caracteriza-se por ser retilíneo e, por vezes, circular. Em bovinos esse movimento circular é sinal patológico (HAFEZ, 2004). No entanto, no presente estudo confirmamos a observação de ZACARIOTTI (2004) de que não há diferenças quanto ao tipo de motilidade (retilínea e circular) do esperma de *C. d. terrificus* coletado por estimulação nas diferentes estações do ano, o que sugere que essa característica de movimentação não seja patológica nessa serpente. No entanto, as variações sazonais quanto ao grau (intensidade) dessa motilidade não puderam ser avaliadas aqui, devido a necessidade de rápido processamento das amostras neste estudo. Essa avaliação exigiria amostras adicionais não disponibilizadas para o presente estudo.

Por outro lado, os espermatozóides humanos fixam-se uns aos outros por meio de cabeça-cabeça, cauda-cauda ou cabeça-cauda, característica essa denominada aglutinação. O termo agregação é, também, aplicado aos espermatozóides humanos, quando essa fixação ocorre entre espermatozóides imóveis ou móveis com células debris, muco e outros tipos celulares (WHO, 1999). No presente estudo, observamos que a aglutinação dos espermatozóides de *C. d. terrificus* apresentou uma formação semelhante àquela observada no elasmobrânquio *Raja eglanteria* (HAMLETT *et al.*, 1999) e no peixe *Trachelyopterus lucenai* (DOWNING-MEISNER *et al.*, 2000), denominada como espermatozeugmata (vide Figura 6), que é

caracterizada por um aglomerado de espermatozóides. No entanto, os espermatozóides daquelas espécies alinham-se de forma linear e não de forma circular como em *C. d. terrificus*. A presença de espermatozeugmata foi associada à frequência de atividade sexual, sendo ausente em *Trachelyopterus galeatus* e presente em *Trachelyopterus lucenai*, ambos peixes teleósteos com sistemas reprodutores semelhantes, mas o primeiro com maior frequência de atividade sexual (DOWNING-MEISNER *et al.*, 2000). Com base nesses resultados, podemos associar esta formação com a ocorrência de baixa atividade sexual de *C. d. terrificus*. Essa baixa atividade sexual da cascavel também pode ser suposta com base na frequência de encontro de sêmen no trato genital das fêmeas amostradas no presente estudo (8 em 43). Porém, a formação de espermatozeugmata foi observada no sêmen coletado do ducto deferente em todas as estações do ano, o que também sugere que essa agregação seja devido a pequena quantidade de fluido seminal, favorecendo o agrupamento desses espermatozóides naquela formação. Esse agrupamento foi observado apenas no sêmen do macho, talvez porque no sêmen armazenado no útero a quantidade de espermatozóides foi menor em relação aos coletados do macho, dificultando a aglutinação.

A BK e o FPP com Ca(2+) atuaram positivamente na manutenção da viabilidade espermática de *C. d. terrificus*. Sabe-se que BK possui um efeito benéfico na motilidade de espermatozóides de mamíferos (SOMLEV & SUBEV, 1998) e o FPP estimula, *in vitro*, na presença de cálcio extracelular, a capacidade fertilizadora dos espermatozóides (GREEN *et al.*, 1996a,b). Então, é sugestivo que esses mesmos peptídeos devam apresentar efeitos semelhantes sobre os espermatozóides da cascavel. Os mecanismos, por meio dos quais estes peptídeos exercem esses efeitos, merecem ser estudados na cascavel. Também seria interessante submeter o sêmen do útero à avaliação, aqui realizada, sobre o efeito destes peptídeos, mas esse material é obtido apenas no inverno, dificultando a disponibilidade de amostras para essa finalidade.

6.2. Caracterização das atividades peptidásicas nas frações solúvel e de membrana solubilizada e perfil frente a diferentes agentes

No presente estudo foram padronizadas as condições de incubação das atividades enzimáticas mensuradas, bem como do processo de obtenção de FS e FM das amostras sob estudo. A predominância de atividade de LDH (marcador citosólico) na FS de todas as amostras mostrou a eficiência do procedimento que adotamos para tal fracionamento, o qual, por sua vez, permitiu distinguir o perfil de cada atividade em cada uma dessas frações.

Conhecendo esse perfil, podemos associar essas atividades, ainda que preliminarmente, com peptídeos intra e extracelulares. De modo geral, os peptídeos envolvidos na sinalização intercelular são inicialmente degradados fora da célula, principalmente por peptidases unidas à membrana (O'CUINN, 1998). Estas peptidases, em geral, têm sítios ativos voltados para o lado extracelular e atuam na hidrólise de peptídeos já liberados (O'CUINN, 1998). As peptidases solúveis atuam predominantemente no processamento intracelular, mas podem também ser exocitadas ou atuar sobre peptídeos recapturados, internalizados como parte do complexo peptídeo-receptor, como no caso de alguns hormônios peptídicos nas células-alvo (GIBSON *et al.*, 1989). O substrato extracelular pode ainda ser processado eficientemente por enzimas citosólicas que alcancem o substrato, após translocação para a superfície celular, sob estimulação. Em células responsivas à insulina, como adipócitos e células musculares, uma aminopeptidase estimulada por insulina, a IRAP, é translocada, juntamente com a vesícula intracelular GLUT4 (transportador de glicose 4), para a membrana plasmática, após estimulação por insulina e, também, por OXT (KANDROR & PILCH, 1994; MASTICK *et al.*, 1994; ALEDO *et al.*, 1997; SUMITANI *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 2001; ALBISTON *et al.*, 2004). A literatura descreve a IRAP como receptor AT4, ou cistil aminopeptidase, ocitocinase, vasopressinase, gp160, vp165 e P-LAP (HERBST *et al.*, 1997; MATSUMOTO *et al.*, 2001a,b; LEW *et al.*, 2003). Ainda, foi descrito que a P-LAP (leucina aminopeptidase de

placenta) pode ser convertida para a forma solúvel por meio de clivagem proteolítica (ITO *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que membros da família ADAM, como a ADAM 12, estão envolvidas na solubilização da P-LAP (ITO *et al.*, 2004). Membros da família ADAM (uma desintegrina e metaloprotease) estão envolvidos em vários processos, incluindo interação celular e integridade dos tecidos, assim como no processamento proteína-ectodomínio (SCHLONDORFF & BLOBEL, 1999). A família ADAM (mais de 30 membros já foram identificados) também está associada com a fusão espermatozóide-óvulo (BLOBEL *et al.*, 1990). No presente estudo, APB, PIP e POP foram detectadas apenas em FS, enquanto as demais atividades peptidásicas foram presentes em FS e FM de todos os tecidos e sêmen avaliados, seguindo um padrão encontrado em todos os tecidos de mamíferos (IRAZUSTA *et al.*, 2001; IRAZUSTA *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2001; VARONA *et al.*, 2003).

O uso de derivados de naftilamida tem sido o passo inicial para a detecção ou confirmação do envolvimento de aminopeptidases e da prolil endopeptidase em vários processos fisiológicos. No presente estudo, os níveis detectados destas atividades peptidásicas apresentaram uma elevada variabilidade (E.P.M). Esta ocorrência foi relativamente comum para a maioria dos parâmetros mensurados em espécimes selvagens, independentemente de variáveis controladas no procedimento experimental adotado. Todavia, algumas variáveis que não puderam ser controladas em nosso protocolo experimental podem estar aumentando essa amplitude de valores de atividade peptidásica. Por exemplo, devido ao baixo número amostral disponibilizado, não foi possível analisar aqui os parâmetros sob estudo agrupando as fêmeas em reprodutivas e não reprodutivas, segundo critério proposto por ALMEIDA-SANTOS & ORSI (2002). Por outro lado, outro agravante para essa variabilidade poderia ser a existência de diferenças intra-sazonais e geográficas. Isto é possível em relação à sazonalidade, já que o agrupamento sazonal foi feito com amostras coletadas em dias distintos de uma mesma estação. No entanto, as diferenças geográficas não parecem estar entre as possíveis influências

agravantes, pois embora as serpentes utilizadas tenham sido provenientes de diferentes localidades dos estados de São Paulo e Minas Gerais, as condições de fauna e clima não são significativamente distintas dentro da ampla extensão territorial desses estados, até mesmo porque podemos considerar que o clima tropical pode ser dividido em estação seca (primavera/ verão) e úmida (outono/ inverno), consideração esta levada em conta em nossa análise sazonal. Ainda, podemos excluir a variação circadiana, pois a coleta das amostras foi realizada sempre em horários que não se diferenciaram mais que 90 minutos.

Enfim, todas as limitações mencionadas contrapõem a necessidade de aumento do número amostral com a exigüidade e imposição de economia no uso de exemplares da espécie, como citado anteriormente. Em qualquer caso, é provável que, por conta dessas limitações, algumas diferenças não tenham sido reveladas neste estudo. Neste sentido, é de se supor que aquelas eventualmente reveladas sejam as de maior destaque e relevância.

Nosso estudo não permite inferir a localização intracelular de cada uma destas atividades enzimáticas e nem atribuí-las a determinadas proteínas isoladas. Esta caracterização demanda a purificação e separação bioquímica de tais proteínas, inclusive das atividades de fração solúvel, em organelas obtidas por subfracionamento celular. No entanto, para melhor conhecer a especificidade das atividades enzimáticas sob estudo, foram utilizados inibidores clássicos de aminopeptidases. As aminopeptidases em estudo são conhecidas por serem sensíveis à amastatina, bestatina, diprotina A e puromicina (CADEL *et al.*, 1995; RONAI *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2003). Já a prolil endopeptidase é inibida por Z-Pro-Prolinal (GARCÍA-HORSMAN *et al.*, 2007) e, como trata-se da única enzima de classe distinta (e com esta susceptibilidade), dentre aquelas examinadas no presente trabalho, não a incluímos no estudo de inibição. Sabe-se, também, que as diferentes atividades enzimáticas podem apresentar diferenças em suas susceptibilidades a diferentes inibidores, de acordo com o tecido em que se localizam (ERBEZNIK & HERSH, 1997; THOMPSON *et al.*, 1999). No

presente estudo, considerando o efeito mais geral observado em todos os tecidos e no sêmen, temos como características diferenciais o fato de que APB e APN podem ser consideradas metalo-peptidases, por sua inibição pelo EDTA (KAWATA *et al.*, 1980), enquanto APB, CAP e DPPIV foram inibidas por $MnCl_2$. CAP e PAP-I foram ativadas pelo agente tiol-redutor DTT, caracterizando-as como peptidases sulfidril-dependentes. O DTT é um ativador da PAP tipo 1 e um inibidor do tipo 2 (O'CUINN *et al.*, 1990) e, por outro lado, a degradação de FPP, potencial substrato da PAP-I, também é acelerada pela presença de DTT (COCKLE *et al.*, 1994), o que nos permite considerar que a PAP-I é a enzima presente nas amostras sob estudo e o FPP um de seus prováveis substratos. Observamos, ainda, que as susceptibilidades da APB e APN à amastatina e bestatina diferem daquela da DPPIV de membrana em relação à diprotina A e daquela da PAP-I e da PIP em relação à bestatina e puromicina. A inibição da DPPIV por diprotina A é característica desta enzima (CD26) em fração de membrana de tecidos de mamíferos (MINELLI *et al.*, 1999).

Todos os peptídeos avaliados ativaram ou reduziram algumas das atividades peptidásicas sob estudo nos tecidos e no sêmen da cascavel, sugerindo-os como potenciais substratos e/ou moduladores destas peptidases. No entanto, a concentração utilizada, da ordem de micromolar, pode ter sido excessiva, o que resultaria em menor especificidade dos efeitos observados. Esta mesma restrição também tem de ser considerada na interpretação dos resultados obtidos com os inibidores clássicos estudados. Assim mesmo, com base nestes resultados, podemos sugerir que as atividades peptidásicas nos tecidos e fluidos aqui estudados apresentam propriedades bioquímicas distintas, o que permite atribuí-las a distintas proteínas. No entanto, como mencionado anteriormente, uma caracterização completa exige a purificação e separação de tais proteínas. Neste sentido, merecem prioridade as atividades APB, APN-PI e APN-PS, as quais, independentemente das flutuações sazonais, apresentaram níveis expressivos em todos os tecidos e nos sêmens examinados e, além disso, atuam, direta

ou indiretamente, sobre os teores de BK, peptídeo que mostrou-se efetivo em incrementar a viabilidade espermática de *C. d. terrificus*. Particularmente, é notável que todos os peptídeos avaliados apresentaram um padrão comum de diminuição da atividade APB no útero e que o TRH e o FPP, independentemente da presença de Ca^{2+} , diminuíram a atividade PAP-I, em FS e FM, de todos os tecidos e do sêmen. Este último resultado pode ser atribuído, muito provavelmente, a competição entre estes peptídeos e o substrato sintético utilizado no ensaio, o que é fortemente sugestivo de que tais peptídeos seriam substratos naturais para a PAP-I da cascavel. Portanto, esta atividade PAP-I também deve merecer uma abordagem aprofundada em futuros estudos.

6.3. Ciclo reprodutivo e sazonalidade das atividades peptidásicas

Em conformidade com o critério proposto por ALMEIDA-SANTOS & ORSI (2002), as fêmeas de *C. d. terrificus* podem ser divididas em duas categorias, de acordo com o tamanho dos folículos presentes no ovário, i.e. reprodutivas (vitelogênese secundária e prenhes) e não reprodutivas (vitelogênese primária e pós parto). Considerando estas categorias, e dado que não incluímos serpentes prenhes no presente estudo, devemos pressupor que a amostragem realizada em um mesmo ano contenha populações com proporções similares de espécimes em vitelogênese secundária ou em vitelogênese primária e pós-parto, o que corresponderia a metade de serpentes em cada categoria. daquelas que estariam em vitelogênese secundária, seria esperada a presença de sêmen na maioria daquelas amostradas no outono, suposto período da cópula. Assim, a baixa ocorrência de sêmen no útero da fêmea nesse período do outono (2/16), mais uma vez vem sugerir a baixa atividade sexual da espécie. A frequência de reprodução em muitas espécies de serpentes é fortemente afetada pelo acúmulo de energia (AUBRET *et al.*, 2002; BONNET *et al.*, 1994) e pela diferença de habitats (principalmente relacionada com a disponibilidade de presas). Ainda, certas diferenças fisiológicas podem ser

invocadas para explicar a variação intra e inter-específica na frequência reprodutiva (TAYLOR *et al.*, 2004). A frequência reprodutiva parece ser dependente do estado nutricional das fêmeas de *Vipera aspis* (BONNET *et al.*, 1994) e de algumas espécies de cascavéis de região temperada (MACARTNEY & GREGORY, 1988). Apesar de condições favoráveis de clima e abundância de alimento nos trópicos (FITCH, 1970), na *C. d. terrificus* o período entre o parto, no final do verão, e o início da vitelogênese secundária, no verão/outono, é suficientemente curto para impossibilitar um adequado armazenamento de gordura (JANEIRO-CINQUINI *et al.*, 1995). Este armazenamento, em quantidade adequada, é necessário para iniciar o desenvolvimento folicular, justificando-se, portanto, o ciclo bienal das fêmeas desta espécie nos trópicos (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 2002). Outrossim, atribui-se que a atratividade ou receptividade das fêmeas, durante a estação de cópula, esteja relacionada com o aumento de 17 β -estradiol, hormônio que também é responsável pela estimulação da produção de vitelogenina (RHEN & CREWS, 2000).

No presente estudo, só consideramos as amostras do sêmen armazenado no útero no inverno, num total de 6 (foram descartadas duas amostras em que foi encontrado sêmen no útero durante o outono). Considerando somente as fêmeas estudadas num mesmo ano e amostradas em todas as estações, 60,98% foram consideradas não reprodutivas, enquanto 39,02% são fêmeas reprodutivas, o que não corresponde a proporção equitativa, esperada numa amostragem de um mesmo ano, entre fêmeas não reprodutivas e reprodutivas. Estes resultados concordam com a observação de BETKOWSKI (2006), sugerindo a ineficácia em completar o processo reprodutivo em 12 meses, mas não corroboram a hipótese de um ciclo exatamente bienal. A principal base invocada para corroborar o ciclo bienal também não parece ser tão consistente, pois advém da observação de campo de TAYLOR & DeNARDO (2005) de que *Crotalus atrox* possui dois períodos de cópula (final da estação de monção e

após inverno), encontrando-se a prenhez em apenas um destes períodos, após quatro períodos de cópula.

Observamos que, dentre as fêmeas reprodutivas, 29,63% tinham sêmen armazenado no útero, tanto no outono quanto no inverno. Se considerarmos apenas as fêmeas amostradas no inverno, 54,54% apresentavam sêmen armazenado no útero. Isto reflete que haviam copulado aproximadamente metade das fêmeas de *C. d. terrificus* examinadas que apresentavam-se em condições reprodutivas. Tal incidência foi bem superior a de sêmen encontrado no útero da fêmea no período do outono (2/16). Portanto, ao invés de indicar uma baixa atividade sexual da espécie, é possível que esse menor número de fêmeas com sêmen no útero durante o outono, reflita a possibilidade de que a cópula ocorra preferencialmente no inverno e não no outono. Porém, devemos considerar a possibilidade de que esta serpente no campo, nesta época, esteja em busca de parceiro e que sua captura tenha ocorrido antes da cópula. De qualquer modo, a incidência de sêmen armazenado no útero nas duas estações (do total de 8, há a ocorrência de 6 no inverno e de apenas 2 no outono), corrobora a existência do LTSS, pois já está bem estabelecido para as *Crotalus*, incluindo a *C. d. terrificus*, que a fertilização ocorre somente na primavera (SCHUETT, 1992; ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS & ORSI, 2002; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004b).

Especificamente em relação a variação sazonal das atividades peptidásicas, como já mencionado, foi marcante a diferença dos níveis das atividades APB, APN-PI e APN-PS relativamente às demais peptidases na maioria dos tecidos e no sêmen na maior parte do ano, o que reflete a maior relevância dessas atividades mencionadas na fisiologia do esperma e dos tecidos relacionados de *C. d. terrificus*. A evidência primária que sugere o envolvimento de algumas das atividades peptidásicas, sob estudo, no fenômeno do LTSS de *C. d. terrificus*, refere-se aos diferentes perfis, especificamente de atividades PAP-I em FS do ducto deferente no verão, relativamente ao inverno e primavera e de APN-PI em FS, APN-PS em FS e FM,

CAP-FM, DPPIV-FS e FM, PAP-I em FM e PIP-FS entre os sêmens no ducto deferente e no útero no inverno. Uma vez que foram maiores as atividades CAP-FM, DPPIV em FS e FM, PAP-I em FM e PIP-FS e menores as atividades APN-PI em FS, APN-PS em FS e FM no sêmen coletado no útero em relação ao coletado do ducto deferente, poderíamos supor que o incremento da atividade do primeiro grupo e o decréscimo da atividade do segundo grupo de enzimas seminais favoreceriam a manutenção da capacidade fertilizadora dos espermatozóides, considerando-se que o inverno não é a época de cópula e, sim, de ocorrência da LTSS e de maior freqüência de defeitos espermáticos no sêmen coletado do macho (ZACARIOTTI, 2004). Se estas mesmas atividades peptidásicas do próprio tecido uterino contribuísem com a manutenção dos espermatozóides, seria provável uma diferença entre os níveis dessas atividades uterinas no outono, época da cópula (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 1990) e a de maior integridade dos espermatozóides (ZACARIOTTI, 2004), em relação ao inverno. No mesmo sentido, se algumas dessas atividades peptidásicas do tecido vaginal influíssem sobre a capacidade fertilizadora dos espermatozóides, seria provável uma diferença entre os níveis dessas atividades do tecido vaginal no outono, relativamente à primavera, época da fertilização (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 1997), ou relativamente ao inverno. Estas hipóteses são discutidas nos próximos parágrafos.

Podemos sugerir que em *C. d. terrificus* o decréscimo das atividades APN-PI em FM no útero e APN-PS em FS na vagina, observadas no outono em relação ao inverno, estejam correlacionadas com a diminuição de progesterona e aumento do estradiol. Sabe-se que a APN possui sítio catalítico extracelular no ovário e no endométrio e, quando inibida por bestatina, afeta o crescimento folicular em murinos, a esteroidogênese de suínos e a decidualização induzida por progesterona no endométrio humano (FUJIWARA *et al.*, 1999). Em coelhas ovariectomizadas, a atividade de APN na vagina diminui (ACARTURK *et al.*, 2001), sendo influenciada por hormônios sexuais (OLSEN *et al.*, 1995). No endométrio de

mulheres grávidas há um aumento da atividade APN (OLSEN *et al.*, 1995). Em relação ao controle hormonal em *C. d. terrificus*, observamos que o estradiol muda significativamente durante o ciclo reprodutivo, iniciando seu aumento no outono (cópula), tendo um pico no inverno e uma queda significativa na primavera (fertilização), enquanto a progesterona cai significativamente durante o outono, coincidentemente com o início da vitelogênese secundária, aumentando na primavera e se mantendo alta durante a gestação (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004a; ALMEIDA-SANTOS, 2005).

A maior atividade de CAP-FS no tecido vaginal de *C. d. terrificus* no inverno (LTSS) em relação a primavera e verão, deve contribuir para o relaxamento deste tecido, no sentido de que não haja retenção local e/ou transporte em direção ao útero de novos espermatozóides durante a LTSS.

Observamos que, em relação as demais estações, um aumento da atividade de PAP-I, na FS na vagina, ocorre no inverno (período pós-cópula e de armazenagem do esperma na fêmea). No verão (período pré-cópula e pico de espermatogênese), a atividade PAP-I em FS do ducto deferente foi mais alta que na primavera e inverno. No sêmen humano, a atividade PAP-I foi predominante na fração de membrana (VALVIDIA *et al.*, 2004), o que não ocorre no sêmen do ducto, independentemente da estação do ano, mas ocorre no sêmen armazenado no útero de cascavel. Durante o inverno, o nível mais baixo de atividade de PAP-I em FS no ducto deferente coincide com o nível mais alto na vagina, ocorrendo o inverso no verão. Já a atividade de PAP-I em FM não varia significativamente ao longo do ano no sêmen e em nenhum dos tecidos examinados. O FPP, potencial substrato da PAP-I, é conhecido por estimular *in vitro* a capacidade fertilizadora dos espermatozóides do epidídimo de rato (COCKLE *et al.*, 1994) e do espermatozóide humano ejaculado e, também, por inibir a perda espontânea do acrossoma no espermatozóide de rato (FRASER *et al.*, 1997a,b), sugerindo que possa modular diferentes aspectos da fisiologia espermática (COCKLE *et al.*, 1994; FRASER

et al., 1997a,b; GREEN *et al.*, 1996a,b). A PAP-I também pode clivar a porção pGlu-His do TRH (SIVITER & COCKLE, 1995). Os nossos resultados sugerem que a atividade PAP-I em FS do ducto deferente e da vagina variam sincronicamente com a necessidade de favorecimento ou inibição da capacidade fertilizadora dos espermatozóides da cascavel, respectivamente durante o pico de espermatogênese e durante a LTSS, assim variando o nível de hidrólise do FPP e modulando a atuação deste peptídeo sobre os espermatozóides desta serpente. Então, na *C. d. terrificus* as variações de atividade PAP-I parecem fazer parte de um mecanismo que, além de sincronizado sazonalmente, é compartilhado por macho e fêmea no sentido de modular a funcionalidade do espermatozóide a longo prazo.

Ao comparar sazonalmente os níveis de atividade APN-PI em FS, APN-PS em FS e FM, CAP-FM, DPPIV-FS e FM, PAP-I em FM e PIP-FS do sêmen do ducto deferente, observamos que os níveis de APN-PS em FS e FM foram maiores no inverno que no outono. Esse aumento corresponde ao período de queda de testosterona e da qualidade dos espermatozóides da cascavel (ZACARIOTTI, 2004). Ainda, comparando os níveis de todas essas atividades peptidásicas, entre o outono e o inverno, no próprio tecido onde há a contenção do sêmen no macho (ducto deferente), observamos que APN-PS em FM e DPPIV-FM foram menores no inverno que no outono. Além disso, a atividade DPPIV-FM do ducto deferente foi menor na primavera/verão que no outono/inverno. Durante o outono/inverno, foi notável a contraposição da atividade APN-PS em FM do sêmen do ducto deferente em relação ao próprio tecido do ducto deferente. Se no inverno o aumento desta atividade aminopeptidásica no próprio sêmen teria efeito deletério, a diminuição concomitante no ducto deferente conduziria a uma maior integridade funcional (mobilidade e vitalidade). Neste caso, a DPPIV-FM do ducto deferente também poderia contribuir com essa maior integridade. Sabe-se que a DPPIV hidrolisa substância P, a qual atua na expulsão do fluido seminal do epidídimo e na iniciação da motilidade de espermatozóides de ratos (SASTRY *et al.*, 1991).

Assim, em *C. d. terrificus*, sob a condição de aumento da DPPIV do ducto deferente no outono, teríamos um esperma ejaculado com menor nível de estimulação da motilidade pela substância P, o que contribuiria para a retenção desses espermatozóides durante o LTSS. No caso da atividade APN-PS, não tem sido detectada em sêmen humano (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002), mas em camundongos tem sido proposto que sua ausência estaria relacionada com a infertilidade ou sub-fertilidade (OSADA *et al.*, 2001). Já a atividade APN-PI, detectada no sêmen de humanos férteis e subférteis, tem seu aumento correlacionado com defeitos na motilidade e viabilidade dos espermatozóides, sendo encontrada na astenozoospermia (redução na motilidade espermática) e/ou necrozoospermia (espermatozóides mortos) (IRAZUSTA *et al.*, 2004). Em *C. d. terrificus*, a manutenção da fertilidade dos espermatozóides no útero, durante o inverno, também contaria com a redução da APN-PI em FS (o nível dessa atividade do sêmen armazenado é menor que o do sêmen no ducto deferente nesta estação), enquanto o aumento observado no nível de APN-PI em FM no sêmen coletado do ducto deferente, no inverno em relação ao outono, também sugere o envolvimento dessa atividade com defeitos espermáticos na cascavel.

A APA-FS no sêmen coletado do ducto deferente também foi maior no inverno, em relação as demais estações. Por sua vez, esta mesma atividade no ducto deferente foi maior no outono que na primavera. Como esta enzima cliva AngII, a qual hiperativa a motilidade e capacita os espermatozóides (VINSON *et al.*, 1996; FRASER *et al.*, 2001) e não inibe a perda espontânea do acrossoma (MEDEDOVIC & FRASER, 2005), podemos considerar que a APA contribuiria para a inativação de AngII no período de cópula (outono), provavelmente também no sentido de diminuir a motilidade espermática durante o LTSS. Diferentemente do FPP, a qual atua na ativação da reação acrossômica de espermatozóides incapacitados (FRASER *et al.*, 2001), a AngII promove esta ativação independentemente de os espermatozóides serem ou não capacitados. O aumento da hidrólise de AngII seminal da cascavel, durante o inverno,

seria vantajoso, pois promoveria o adiamento da capacitação dos espermatozóides em LTSS, i.e. esses espermatozóides durante a LTSS não teriam a reação acrossômica induzida e, portanto, permaneceriam íntegros e, temporariamente, incapazes de fertilizar.

No geral, as diferenças sazonais para as diferentes atividades peptidásicas nos tecidos e no sêmen da cascavel, conforme evidenciado nos parágrafos precedentes, seguem algum padrão comum, o que inclui um aumento generalizado da atividade da maioria das enzimas na estação úmida (outono/inverno). Porém, esse aumento não significaria necessariamente um prejuízo à função espermática, o que impõe restrições ao possível uso de inibidores relativamente inespecíficos de aminopeptidases, os quais vêm sendo preconizados para restaurar a proliferação e viabilidade celular em mamíferos (TAKAHASHI *et al.*, 1989; CONSTAM *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1998).

Ainda, no sêmen do ducto deferente, as atividades APB e POP (que se apresentam somente em FS), têm níveis aumentados no verão, em relação as demais estações, sugerindo que tratam-se de enzimas ativas na espermatogênese desta serpente. Conforme mencionado anteriormente, durante a fase de cópula (outono), a porcentagem de defeitos espermáticos totais de *C. d. terrificus* é menor em comparação com o inverno, assim como são menores os níveis séricos de testosterona no inverno ($8,89 \pm 3,81$ ng/mL) em relação ao verão ($52,60 \pm 9,24$ ng/mL) (ZACARIOTTI, 2004). Estes altos níveis de testosterona no verão devem refletir na atividade espermatogênica e influenciar no comportamento reprodutivo de *C. d. terrificus*, inclusive sobre as atividades APB e POP do sêmen (do ducto deferente), conforme sugerem nossos dados. Como já mencionado, sabe-se que APB e POP hidrolisam BK, peptídeo que estimula a motilidade espermática. Como estas atividades peptidásicas estão altas no pico da espermatogênese, onde há predomínio de espermatozóides maduros alinhados e livres no lúmen (SALOMÃO & ALMEIDA-SANTOS, 2002), poderiam incrementar a inativação de BK, com conseqüente redução da motilidade dos espermatozóides no verão. Este padrão de

atividade enzimática parece somar-se aos demais observados aqui para outras peptidases, no sentido dessa redução de motilidade.

Em geral, as flutuações sazonais detectadas nos níveis de atividade das peptidases estudadas no sêmen do ducto deferente em relação ao sêmen armazenado no útero no inverno (LTSS) demonstram a participação destas enzimas na fisiologia espermática. É notável que as atividades da APN-PI e APN-PS em FS foram as únicas, dentre as atividades peptidásicas estudadas, cujos níveis diferem entre o sêmen do ducto deferente no verão (pico de espermatogênese) e o sêmen armazenado no útero, sugerindo tratar-se de enzimas com atividades primordiais na função espermática e na adaptação fisiológica necessária para a manutenção destas células durante o LTSS. A redução na atividade APA-FS no sêmen do macho, na primavera (fertilização), em relação ao armazenado na fêmea da cascavel, deve refletir sua atuação contribuindo para a redução da motilidade destes espermatozóides armazenados durante o LTSS e para o incremento dessa motilidade na época de fertilização, pois a APA cliva AngII, a qual é conhecida por hiperativar a motilidade espermática (VINSON *et al.*, 1996; FRASER *et al.*, 2001). Verifica-se que a APN-PI em FS, em todas as estações, tem atividade maior no sêmen do ducto deferente que no sêmen armazenado na fêmea, o que sugere que fatores provenientes da fêmea devem interferir com a atividade APN-PI, no sentido de incrementar a motilidade espermática, já que esta atividade, em humanos, tem seu aumento correlacionado com a redução na motilidade espermática e com espermatozóides mortos (IRAZUSTA *et al.*, 2004). Porém, durante o LTSS (no inverno) é de se supor uma menor motilidade que na época de fertilização (primavera) e, então, outros fatores devem estar contrapostos a esse favorecimento da motilidade relacionado com a atividade APN-PI em FS do sêmen armazenado na fêmea, tais como a atividade APA mencionada anteriormente. A PAP-I e a POP hidrolisam FPP (SIVITIER & COOKLE, 1995), peptídeo conhecido por estimular *in vitro* a capacidade fertilizadora de espermatozóides

incapacitados e impedir esta capacitação em células capacitadas de mamíferos (COCKLE *et al.*, 1994, FRASER *et al.*, 1997) e, assim, seus níveis menores de atividade no sêmen coletado do ducto deferente na primavera (fertilização), em relação ao sêmen armazenado no útero, deve significar que durante o LTSS da cascavel, a PAP-I e a POP do sêmen armazenado na fêmea atuaria neste sentido.

6.4. Frações do sêmen de *C. d. terrificus*

O sêmen da cascavel contém fluido seminal e espermatozóides, além de estruturas prostassoma-símbles, com tamanho (100 - 130 nm) e formas compatíveis com os prostassomas humanos (150 - 200 nm) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Os prostassomas são vesículas prostáticas, relacionadas com a motilidade espermática, liquefação e imunossupressão (MINELLI *et al.*, 1999). Em bovinos, os prostassomas são originados de vesículas seminais (AGRAWAL & VANHA-PERTULLA, 1987). A vesícula seminal secreta proteínas, vitamina C, frutose, prostaglandina e fibrinogênio, enquanto a glândula prostática secreta um líquido menos viscoso, leitoso e que contém citrato e Ca^{2+} (MINELLI *et al.*, 1999). No entanto, estas estruturas não foram identificadas em serpentes, mas supõe-se que um segmento renal atuaria como órgão sexual acessório, do qual poderiam provir essas vesículas. Esse segmento sexual renal de serpentes é conhecido por secretar um complexo de glicogênio, mucopolissacarídeos, mucoproteínas, lipídeos e fosfatase ácida (KÜHNEL & KRISCH, 1974).

As atividades APN (especialmente a inibida por puromicina) e APB também foram as mais expressivas em todas as frações seminais. A conversão de calidina em BK (MIZUTANI *et al.*, 1993) e a inativação de BK (RAWLINGS *et al.*, 1998) são, respectivamente, habilidades da APN e APB. Este fato, aliado a ação da BK sobre a viabilidade, indica a importância da regulação destes peptídeos para a função espermática na *C. d. terrificus*. Porém, com base nos

resultados aqui obtidos e dada a gama de substratos susceptíveis de hidrólise por estas peptidases, não há como supor que a influência do elevado teor destas peptidases nas frações seminais limite-se ao sistema das cininas, ou seja, não é possível negligenciar a relevância das demais peptidases avaliadas, como por exemplo a atividade POP, a qual também foi bastante expressiva no fluido seminal da cascavel. Por sua reconhecida capacidade hidrolítica sobre encefalina (SIVITER & COCKLE, 1995) e dado que a encefalina parece ter um destacado papel na fisiologia espermática (O'HARA *et al.*, 1994), a atividade POP também deve contribuir neste sentido em *C. d. terrificus*.

Em suma, o presente trabalho já evidenciou características básicas de algumas peptidases e uma relação inédita e original entre alterações nos seus níveis e sazonalidade, que se diferenciam de forma tecido-específica, sugerindo uma integração com o ciclo reprodutivo e o LTSS da cascavel *C. d. terrificus* e propiciando uma melhor compreensão sobre os fatores envolvidos na fertilidade masculina. Vários aspectos desta integração necessitam ser aprofundados, tais como, entre outros, quantificação sazonal direta dos teores dos peptídeos susceptíveis de hidrólise pelas peptidases no próprio sêmen e nos diferentes tecidos estudados; identificação das vias de sinalização intracelular e papel de segundos mensageiros, em especial o AMPc; presença de receptores espermáticos para peptídeos; localização intracelular, separação e purificação destas peptidases; e identificação da origem dos prostassoma-símbios nesta serpente.

7. CONCLUSÕES

- ✓ As atividades de aminopeptidase ácida, básica, neutra (sensível e insensível à puromicina), cistil, dipeptidil-peptidase IV, piroglutamil tipo 1 e prolil imino, bem com a prolil endopeptidase estão presentes em frações solúvel e/ou de membrana do sêmen do ducto deferente, do sêmen armazenado no útero, e dos tecidos por onde passam e/ou armazenam-se os espermatozóides em *C. d. terrificus*.
- ✓ As atividades supracitadas estão entre os fatores endógenos envolvidos na capacidade peculiar de manutenção da sobrevivência dos espermatozóides desta serpente, da qual foram evidenciadas, em suma, as seguintes características:
 - O peptídeo promotor da fecundação, na presença de cálcio, bem como a bradicinina, influenciam positivamente a viabilidade dos espermatozóides de *C. d. terrificus*.
 - As aminopeptidases metalo-dependentes, inibidas por amastatina e bestatina, com preferência para aminoácidos neutros (APN) ou básicos (APB), apresentam teores expressivos de atividade em todos os tecidos, no sêmen e nas frações seminais examinadas, sugerindo alta relevância fisiológica no trato reprodutor desta cascavel.
 - Todos os peptídeos avaliados influenciaram (ativaram ou reduziram) alguma das atividades peptidásicas sob estudo nos tecidos e no sêmen da cascavel, sugerindo-os como potenciais substratos e/ou moduladores destas peptidases.

- As peptidases avaliadas seguem um padrão comum geral de aumento nos tecidos e no sêmen durante a estação úmida (outono/inverno), coincidentemente com o período da cópula (outono) e do LTSS (inverno), bem como com a necessidade de redução da motilidade espermática e manutenção da capacidade fertilizadora desses espermatozóides durante a LTSS.
- A maior atividade de cistil aminopeptidase solúvel no tecido vaginal no inverno, em relação a primavera (ovulação e fertilização) e verão (nascimento dos filhotes), deve contribuir para o relaxamento deste tecido, no sentido de que não haja retenção local e/ou transporte em direção ao útero de novos espermatozóides durante o LTSS.
- O menor teor de atividade piroglutamil aminopeptidase tipo 1 no ducto deferente (menor hidrólise de peptídeo promotor da fecundação) coincide com o nível mais alto (maior hidrólise de peptídeo promotor da fecundação) na vagina, no inverno (defeitos espermáticos e LTSS), ocorrendo o inverso no verão (pico da espermatogênese e nascimento dos filhotes), o que corresponde a um padrão compatível com o requerimento fisiológico para este peptídeo, assim sugerindo um papel modulador sincronizado desta peptidase no macho e na fêmea da cascavel.
- Os níveis de atividades peptidásicas no sêmen do ducto deferente oscilam sazonalmente e diferem daqueles do sêmen no útero durante o LTSS, refletindo o papel modulador destas peptidases na espermatogênese e no padrão funcional dos espermatozóides.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACARTURK, F.; PARLATAN, Z.I.; SARACOGLU, O.F. Comparison of vaginal aminopeptidase enzymatic activities in various animals and in humans. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, n.11, p. 1499-1504, 2001
- ADEYOA-OSIGUWA, S.A.; DUDLEY, R.K.; HOSSEINI, R.; FRASER, L.R. FPP modulates mammalian sperm function via TCP-11 and the adenylyl ciclase/cAMP pathway. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 51, p. 468-476, 1998
- AGIRREGOITIA, E.; VALDIVIA, A.; CARRACEDO, A.; CASIS, L.; GIL, J.; SUBIRAN, N.; OCHOA, C.; IRAZUSTA, J. Expression and localization of δ , κ and μ opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. **J. Clin. Endocrin. Metab.**, v. 91, n. 12, p. 4969-4975, 2006
- AGRAWAL, Y.; VANHA-PERTULLA, T. Effect of secretory particles in bovine seminal vesicles secretion on sperm motility and acrosome reaction. **J. Reprod. Fertil.**, v. 79, p. 409-419, 1987
- ALBISTON, A.L.; FERNANDO, R.; YE, S.; PECK, G.R.; CHAI, S.Y. Alzheimer's, angiotensin IV and aminopeptidase. **Biol. Phar. Bull.**, v. 27, n. 6, p.765-767, 2004
- ALDRIDGE, R.D. Female reproductive cycles of the *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1979
- ALDRIDGE, R.D.; GREENSHAW, J.J.; PLUMMER, M.V. The male reproductive cycle of the rough green snake (*Opheodrys aestivus*) **Amphibia-Reptilia**, v. 11, p. 165-172, 1990
- ALEDO, J.C.; LAVOIE, L.; VOLCHUK, A.; KELLER, S.R.; KLIP, A.; HUNDAL, H.S. Identification and characterization of two distinct intracellular GLUT4 pools in rat skeletal muscle: evidence for an endosomal and an insulin-sensitive GLUT4 compartment. **Biochem. J.**, v. 1, n. 325 (Pt 3), p. 727-32, 1997
- ALMEIDA-SANTOS, S.M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de espermato e placentação em *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 204 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; ABDALLA, F.M.F.; SILVEIRA, P.F.; YAMANOUYE, N.; BRENO, M.C.; SALOMÃO, M.G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 139, p. 143-150, 2004a
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae:Viperidae) in the southeastern Brazil. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 139, p. 169-174, 2004b
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; PUERTO, G. Ritual de combate em *Crotalus durissus*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 62, p. 418, 1990

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; ORSI, A.M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* (Serpente, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, p. 109-112, 2002

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; SALOMÃO, M.G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Jpn. J. Herpetol.**, v. 17, p. 46-52, 1997

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; SALOMÃO, M.G. Reproduction in neotropical pitvipers with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. **Biology pitvipers**, p. 445-462. Texas: Eagle Mountain Publishing, 2002

ANDRÉN, C.; NILSON, G.; HÖGGREN, M.; TEGELSTRÖM, H. In: THORPE RS, WUSTER W, MALHOTRA A (eds). **Venomous snakes-ecology, evolution and snakebite**. The Zoological Society of London, p. 129-142. Claredon Press: Oxford, 1997

ANDRÉN, C.; NILSON, G. The copulatory plug of the adder, *Vipera berus*: a reply. **Oikos**, v. 49, p. 232-233, 1987

ASSINDER, S.J.; REZVANI, A.; NICHOLSON, H.D. Oxytocin promotes spermiation and sperm transfer in the mouse. **Int. J. Androl.**, v. 25, n.1, p. 19-27, 2002

AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). **Horm. Behav.**, v. 42, p. 135-147, 2002

BALL, J.K.; CURRAN, R.; IRVING, W.L.; DEARDEN, A.A. HIV-1 in semen: determination of proviral and viral titres compared to blood, and quantification of semen leukocyte populations. **J. Med. Virol.**, v. 59, p. 356-363, 1999

BERGMAYER, H.U.; BRENT, E. In: **Methods in enzymatic analysis**. London: Academic Press Inc, v. 2, p. 574-577, 1972

BETKOWSKI, S.E. **Estudo dos níveis de progesterona e estradiol séricos e acompanhamento das características ultra-sonográficas de ovários e ovidutos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) mantidas em cativeiro, em um período de 12 meses**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

BIRKHEAD, T.R.; MÜLLER, A.P. Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds, and mammals. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 50, p. 295-311, 1993

BLACKBURN, D.G. Choriollantoic placentation in squamate reptiles: structure, function, development and evolution. **J. Exp. Zool.**, v. 266, p. 414- 430, 1993

BLOBEL, C.P.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J.M. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. **J. Cell. Biol.**, v. 111, p. 69-78, 1990

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; BRADSHAW, D.; SHINE, R. Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake *Vipera aspis*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 121, p. 84-94, 2001

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; MAUGET, R. The influence of body condition on 17- β estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 93, p. 424-437, 1994

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976

BRADSHAW, S.D.; BRADSHAW, F.J. Arginine vasotocin: site and mode of action in the reptilian kidney. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 126, p. 7-13, 2002

CADEL, S.; PIEROTTI, A.R.; FOULON, T.; CREMINON, C.; BARRE, N.; SEGRETAIN, D.; COHEN, P. Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 110, n.1-2, p.149-160, 1995

CALLARD, I.P.; RILEY, D.; PEREZ, L. Vertebrate vitellogenesis: molecular model for multihormonal control of gene regulation. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 342, p. 343-348, 1990

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004. 728p.

CHATTERJEE, S.; LALORAYA, M.; KUMAR, P.G. Free radical-induced liquefaction of ejaculated human semen: a new dimension in semen biochemistry. **Arch. Androl.**, v. 38, p. 107-111, 1997

COCKLE, S.M.; PRATER, G.V.; THETFORD, C.R.; HAMILTON, C.; MALONE, P.R.; MUNDY, A.R. Peptides related to thyrotrophin-releasing hormone (TRH) in human prostate and semen. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1227, p. 60-66, 1994

COLLINS, J.A.; CROSIGNANI, P.G. Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 39, p. 267-275, 1992

CONSTAM, D.B.; TOBLER, A.R.; RESING-EHL, A.; KELMER, I.; HERSH, L.B.; FONTANA, A. Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 26931-26939, 1995

CREWS, D.; GARSTKA, W.R. The ecological physiology of a garter snake. **Sci. Am.**, v. 247, p.158-168, 1982

CUELLAR, H.S.; ROTH, J.J.; FAWCETT, J.D.; JONES, R.E. Evidence for sperm sustenance by secretions of the renal sexual segment of male lizards, *Anolis carolinensis*. **Herpetologica**, v. 28, p. 53-57, 1972

DAVISON, J.M.; SHEILLS, E.A.; PHILIPS, P.; BARRON, W.M.; LINDHEIMER, M.D. Metabolic clearance of vasopressin and an analogue resistente to vasopressinase in human pregnancy. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 348-353, 1993

DeNARDO, D. Reproductive biology. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: WB Saunders, p.212-224, 1996

DOWNING-MEISNER, A.; BURNS, J.R.; WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Morphology and histology of male reproductive system in two species of internally inseminating South American catfishes *Trachelyopterus lucenai* and *T. galeatus* (Teleostei: Atherinidae). **J. Morphol.**, v. 246, n. 2, p. 131-41, 2000

ERBEZNIK, H.; HERSH, LB. A novel mammalian high-molecular-weight aminopeptidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 344, n. 1, p. 228-34, 1997

FERNÁNDEZ, D.; VALDIVIA, A.; IRAZUSTA, J.; OCHOA, C.; CASIS, L. Peptidase activities in human semen. **Peptides**, v. 23, p. 461-468, 2002

FIGLER, R.A.; MACKENZIE, D.S.; OWENS, D.W.; LICHT, P.; AMOSS, M.S. Increased levels of arginine vasotocin and neurophysin during nesting in sea turtles. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 73, p. 223-232, 1989

FISHMAN, A.P.; BROOKHART, J.M.; CAHILL, G.F.J.; CARLSON, L.D.; PROSSER, C.L. In: **Handbook Physiology**. A critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts. Section 7: Endocrinology. Vol. V. Male Reproduction System, 1975

FITCH, H.S. **Reproductive cycles in lizards and snakes**. University of Kansas Museum of Natural History Miscellaneous Publication, 1970, 247p.

FOULON, T.; CADEL, S.; COHEN, P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, p. 747-750, 1999

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T.S. **Biology Reptilia**. New York: Academic Press, p. 1-157, 1977

FOX, W. Seminal receptacles of snakes. **Anat. Rec.**, v. 124, p. 519-539, 1956

FRASER, L.R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; BAXENDALE, R.W. First messenger regulation of capacitation via G protein-coupled mechanisms: a tale of serendipity and discovery. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 9, n. 12, p. 739-48, 2003

FRASER, L.R.; HANYALOGU, A.; COCKLE, S.M. A fertilization promoting peptide (FPP)-related tripeptide competitively inhibits responses to FPP: a cause of male subfertility? **Mol. Reprod. Dev.**, v. 48, p. 529-535, 1997a

FRASER, L.R.; HOSSEINI, R.; HANYALOGU, A.; TALMOR, A.; DUDLEY, R.K. TCP-1, the product of a mouse t-complex gene, plays a role in stimulation of a capacitation and inhibition of the spontaneous acrosome reaction. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 48, p. 375-382, 1997b

FRASER, L.R.; PONDEL, M.D.; VINSON, G.P. Calcitonin, angiotensin II and FPP significantly modulate mouse sperm function. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 7, n. 3, p. 245- 253, 2001

FRASER, L.R. Fertilization promoting peptide: an important regulator of sperm function in vivo? **Rev. Reprod.**, n. 3, p. 151-154, 1998

FRIEDMAN, T.C.; WILD, S. The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat serum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 132, p. 787-794, 1985

FUJIWARA, H.; IMAI, K.; INOUE, T.; MAEDA, M.; FUJII, S. Membrane-bound cell surface peptidases in reproductive organs. **Endocr. J.**, v. 46, n. 1, p. 11-25, 1999

FUJIWARA, K.; MATSUMOTO, E.; KITAGAWA, T.; TSURU, D. N-alpha-carbobenzoxymethyl pyroglutamyl diazomethyl ketone as active-site-directed inhibitor for pyroglutamyl peptidase **Biochim. Biophys. Acta**, v. 702, n. 2, p. 149-154, 1982

FUKADA, H. Delayed fertilization in the Japanese mamushi. **Jpn. J. Herpetol.**, v. 11, p. 156-157, 1986

GARSTKA, W.R.; GROSS, M. Activation and inhibition of sperm motility by kidney products in the turtle, *Trachemys scripta*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 95A, p. 329-335, 1990

GARCÍA-HORSMAN, J.Á.; MÄNNISTO, P.T.; VENÄLÄINEN. On the role of prolyl oligopeptidase in the health and disease. **Neuropeptides**, v. 41, p. 1-24, 2007

GASPARELLO-CLEMENTE, E.; CASIS, L.; VARONA, A.; GIL, J.; IRAZUSTA, J.; SILVEIRA, P.F. Amino peptidases in visceral organs during alterations in body fluid volume and osmolality. **Peptides**, v. 24, p. 1367-1372, 2003

GASPARELLO-CLEMENTE, E.; SILVEIRA, P.F. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1617-1626, 2002

GHELMAN, R. **Estudo morfológico ontogenético das vias genitais femininas da cascavel, *Crotalus durissus terrificus*, (Laurenti, 1768) (Squamata, Viperidae).** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998

GIBSON, A.M.; McDERMOTT, J.R.; LAUFFART, B.; MANTLE, D. Specificity of action of human brain alanyl aminopeptidase on leu-enkephalin and dynorphin-related peptides. **Neuropeptides**, v. 13, p. 259-262, 1989

GIRLING, J.E. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. **J. Exp. Zool.**, v. 293, p. 141-170, 2002

GIST, D.; JONES, J.M. Storage of sperm in the reptilian oviduct. **Scan. Electr. Microsc.**, v. 1, p. 1839- 1849, 1989

- GKONOS, P.J.; KWOK, C.K.; BLOCK, N.L.; ROOS, B.A. Identification of the human seminal TRH-like peptide pGlu-Phe-Pro-NH₂ in normal human prostate. **Peptides**, v. 15, n. 7, p. 1281-1283, 1994
- GREEN, C.M.; COCKLE, S.M.; WATSON, P.F.; FRASER, L.R. Fertilization promoting peptide, a tripeptide similar to thyrotrophin-releasing hormone, stimulates the capacitation and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 11, p.830-836, 1996a
- GREEN, C.M.; COCKLE, S.M.; WATSON, P.F.; FRASER, L.R. A possible mechanism of action for fertilization promoting peptide, a TRH-related tripeptide that promotes capacitation and fertilizing ability in mammalian spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 244-252, 1996b
- GREENE, H.W. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. Berkeley: University of California Press, 1997. 366p.
- GUILLETTE Jr, L.J. The evolution of viviparity in lizards. **Biosc.**, v. 42, p. 742-751, 1993
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ed. Barueri: Manole, 2004
- HALPERT, A.P.; GARSTKA, W.R.; CREWS, D. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **J. Morphol.**, v. 174, p. 149-159, 1982
- HAMID, K.S.; AKBARSHA, M.A. Utilization of seminal proteins by house gecko, *Hemidactylus brooki* (Gray), sperm for motility. **J. Exp. Biol.**, v. 27, p. 930-933, 1989
- HAMLETT, W.C.; HYSELL, M.K.; ROZYCKI, T.; BRUNETTE, N.; TUMILTY, K.; HEDERSON, A.; DUNNE, J. Sperm aggregation and spermatozeugmata formation in the male genital ducts in the clearence skate, *Raja eglanteria*. **Soc. Fr. Ichtyol.**, p. 281-291, 1999
- HATTORI, N.; FUJIWARA, H.; MAEDA, M.; YOSHIOKA, S.; HIGUCHI, T.; MORI, T.; OHISHI, N.; MINAMI, M.; FUJII, S.; UEDA, M. Human large luteal cells in the menstrual cycle and early pregnancy express leukotriene A₄ hydrolase. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, n. 8, p. 803-810, 1998
- HAYASHI, T.; TSAO, L.T.; SU, T.P. Antiapoptotic and cytotoxic proprieties of delta opioid peptide [D-Ala (2), D-Leu(5)] enkephalin in PC12 cells. **Synap.**, v. 43, p. 86-94, 2002
- HEDER, G.; BOETTGER, A.; SIEMS, W.E.; ROTTMANN, M.; KERTSCHER, U. The enzymatic degradation of bradykinin in semen of various species. **Andrologia**, v. 26, n. 5, p. 295-301, 1994
- HEDER, G.; SIEMS, W.E.; MUDRA, K.; NEHRING, H.; SEIFFERT, I.; JENTZSCH, K.D. Occurrence and potential importance of angiotensin-converting enzyme in semen of boars. **Andrologia**, v. 22, n. 5, p. 437-443, 1990
- HEGEN, M.; NIEDOBITEK, G.; KLEIN, C.E.; STEIN, H.; FLEISCHER, B. The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. **J. Immunol.**, v. 144, n. 8, p. 2908-2914, 1990

HERBST, J.J.; ROSS, S.A.; SCOTT, H.M.; BOBIN, S.A.; MORRIS, N.J.; LIENHARD, G.E.; KELLER, S.R. Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 4 (Pt 1), p. 600-606, 1997

HOFFMAN, L.H.; WIMSATT, W.A. Histochemical and electron microscopic observations on the sperm receptacles in the garter snake oviduct. **Amer. J. Anat.**, v. 134, p. 71-96, 1972

IRAZUSTA, J.; SILVEIRA, P.F.; GIL, J.; VARONA, A.; CASIS, L. Effects of hydrosaline treatments on prolyl endopeptidase activity in rat tissues. **Regul. Pept.**, v. 101, p. 141-147, 2001

IRAZUSTA, J.; VALDIVIA, A.; FERNANDEZ, D.; AGIRREGOITIA, E.; OCHOA, C.; CASIS, L. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. **J. Androl.**, v. 25, p. 733-739, 2004

ISOGAWA, K.; KATO, M. Mating season of the Japanese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* (Viperidae: Crotalinae), in Southern Kyushu, Japan: Relation with female ovarian development. **Jpn. J. Herpetol.**, v. 16, p. 42-48, 1995

ITO, N.; NOMURA, S.; IWASE, A.; ITO, T.; KIKKAWA, F.; TSUJIMOTO, M.; ISHIURA, S.; MIZUTANI, S. ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 314, p. 1008-1013, 2004

JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; FARIAS, E.C.; LEINZ, F.F. Relation between the quantity of abdominal fat and the reproductive state of the snake *Bothrops jararaca*. **Snake**, v. 27, p. 21-24, 1995

JOHNSON, A.O.; LAMPSON, M.A.; MCGRAW, T.E. A di-leucine sequence and a cluster of acidic amino acids are required for dynamic retention in the endosomal recycling compartment of fibroblasts. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, n. 2, p. 367-81, 2001

KANDROR, K.; PILCH, P.F. Identification and isolation of glycoproteins that translocate to the cell surface from GLUT4-enriched vesicles in an insulin-dependent fashion. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 1, p. 138-42, 1994

KAWATA, S.; TAKAVAMA, S.; NINOMIVA, K.; MAKISUMI, S. Porcine liver aminopeptidase B. Substrate specificity and inhibition by amino acids. **J. Biochem.**, v.88, n. 6, p. 1601-1605, 1980

KEW, D.; MUFFLY, K.E.; KILPATRICK, D.L. Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 9143-9147, 1990

KÖHN, F.M.; MULLER, C.; DRESCHER, D.; NEUKAMM, C.; EL MULLA, K.F.; HENKEL, R.; HAGELE, W.; HINSCH, E.; HABENICHT, U.F.; SCHILL, W.B. Effect of angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. **Andrologia**, v. 30, n. 4-5, p. 207-15, 1998

KOISTINEN, H.; SOINI, T.; LEINONEN, J.; HYDEN-GRANSKOG, C.; SALO, J.; HALTTUNEN, M.; STENMAN, U.H.; SEPPALA, M.; KOISTINEN, R. Monoclonal

antibodies, immunofluorometric assay, and detection of human semenogelin in male reproductive tract: no association with in vitro fertilizing capacity of sperm. **Biol. Reprod.**, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2002

KUGLER, P. Aminopeptidase A is angiotensinase A. II. Biochemical studies on aminopeptidase A and M in rat kidney homogenate. *Histochem*, v. 74, n. 2, p. 247-261, 1982

KUHNEL, W.; KRISCH, B. On the sexual segment of the kidney in the snake *Natrix natrix*. **Cell Tiss. Res.**, v. 148, p. 417-429, 1974

KUMARI, T.R.S.; SARKAR, H.B.D.; SHIVANANDAPPA, T. Histology and histochemistry of the oviductal sperm pockets of agamid lizard *Calotes versicolor*. **J. Morphol.**, v. 203, p. 97-106, 1990

LANCE, V.A. Reptile reproduction and endocrinology. In: HOLT, W.; PICKARD, A.R.; RODGER, J.C.; WILDT, D.C. **Reproductive Science and Integrated Conservation**. Cambrige: Cambridge University Press, 2003

LANGLADA, F.G.; GONÇALVES, M.F.; RODRIGUES, E.T. Determinação da época da fecundidade em fêmeas do gênero *Crotalus*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 37, p. 253-260, 1973

LANGLADA, F.G.; SANTOS, S.; FERREIRA, I.L.L. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae- Crotalinae). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 31, n. 2, p. 141-144, 1994

LENG, G.; DYBALL, R.E.; RUSSELL, J.Á. Neurophysiology of body fluid homeostasis. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 90, p. 781-788, 1988

LEW, R.A.; MUSTAFA, T.; YE, S.; McDOWALL, S.G.; CHAI, S.Y.; ALBISTON; A.L. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). **J. Neurochem.**, v. 86, n. 2, p. 344-350, 2003

LILJA, H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 1899-1903, 1985

LINDEN, H.; DEL RIO GARCÍA, J.; HUBER, A.; KREIL, G.; SMYTH, D. The TRH-like peptides in rabbit testis are different from the TRH-like peptide in the prostate. **FEBS Lett.**, v. 379, p. 11-14, 1996

LUCKETT, W.P. Ontogeny of amniote fetal membranes and their application to phylogeny. In: HECHT MK, GOODY PC, HECHT BM (eds.) **Major Patterns Vertebrate Evolution**. New York: Plenum Press, p. 439-516, 1977

MACARTNEY, J.M.; GREGORY, P.T. Reproductive biology of female rattlesnakes (*Crotalus viridis*) in British Columbia. **Copeia**, p. 47-57, 1988

MASTICK, C.C.; AEBERSOLD, R.; LIENHARD, G.E. Characterization of a major protein in GLUT4 vesicles. Concentration in the vesicles and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 8, p. 6089-6092, 1994

MATSUMOTO, H.; HATORRI, A.; MIZUTANI, S.; TSUJIMOTO, M. **Cell-surface aminopeptidases: basic and clinical aspects**. Elsevier Science BV, Amsterdam, 2001a

MATSUMOTO, H.; NAGASAKA, T.; HATTORI, A.; ROGI, T.; TSURUOKA, N.; MIZUTANI, S.; TSUJIMOTO, M. Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 11, p. 3259-3266, 2001b

McDONALD, J.K.; BARRET, A.J. **Mammalian Proteases: a glossary and bibliography**, 1986

MEDEDOVIC, S.; FRASER, L.R. Mechanisms of action of angiotensin II on mammalian sperm function. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 211-218, 2005

MEDEDOVIC, S.; FRASER, L.R. Angiotensin II stimulates cAMP production and protein tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 601-612, 2004

MEDINA, P.; ACUNA, A.; MARTINEZ-LEON, J.B.; OTERO, E.; VILA, J.M.; ALDASORO, M.; LLUCH, S. Arginine vasopressin enhances sympathetic constriction through the V1 vasopressin receptor in human saphenous vein. **Circulation**, v. 10, p. 865-870, 1998

MIGAUD, M.; DURIEUX, C.; VIERECK, J.; SOROCA-LUCAS, E.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C.; ROQUES, B.P. The in vivo metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A. **Peptides**, v. 17, n. 4, p. 601-607, 1999

MINELLI, A.; ALLEGRUCCI, C.; MEZZASOMA, I.; RONQUIST, G.; LUIS, C.; FRANCO R. CD26 and adenosine deaminase interaction: its role in the fusion between horse membrane vesicles and spermatozoa1. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 802-808, 1999

MISKA, W.; SCHILL, W.B. Enhancement of sperm motility by bradykinin and kinin analogs. **Arch. Androl.**, v. 25, p. 63-67, 1990

MIZUTANI, S.; GOTO, K.; NOMURA, S.; INO, K.; GOTO, S.; KIKKAWA, F.; KURAUCHI, O.; GOLDSTEIN, G.; TOMODA, Y. Possible action of human placental aminopeptidase N in feto-placental unit. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 82, p. 65-80, 1993

MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carneg. Inst. Contrib. Embr.**, v. 26, p. 129-246, 1937

MOSSMAN, H.W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers Univ Press, 1987. 383 p.

MOTZ, V.A.; CALLARD, I.P. Seasonal variation in oviductal morphology of the painted turtle, *Chrysemys picta*. **J. Morphol.**, v. 207, p. 59-71, 1991

NAKAMURA, K.; FUJIWARA, H.; HIGUCHI, T.; HONDA, T.; YAMADA, S.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, J.; MAEDA, M.; TACHIBANA, T.; SUGINAMI, H.; MORI, T.

Bestatin, an aminopeptidase inhibitor, promotes follicular growth and ovulation suppressed by stress in mice. **Endocrinol. J.**, v. 45, p. 547-553, 1998

NIELSEN, S.; FROKIAER, J.; MARPLES, D.; KWON, T.H.; AGRE, P.; KNEPPER, A. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 205-244, 2002

NILSON, G.; ANDRÉN, C. Function of renal sex secretion and male hierarchy in the adder, *Vipera berus*, during reproduction. **Horm. Behav.**, v. 16, p. 404-413, 1982

NISHIMORI, K.; YOUNG, L.J.; GUO, G.X.; WANG, Z.X.; INSEL, T.R.; MATZUK, M.M. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 11699-11704, 1996

NISHIMURA, H. Endocrine control of renal handling of solutes and water in vertebrates. **Renal Physiol.**, v. 8, p. 279-300, 1985

NORRIS, D. **Vertebrate endocrinology**. San Diego: Academic press, 1996

O'CUINN, G. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 26, p. 279-291, 1990

O'CUINN, G.; O'CONNOR, B.; ELMORE, B. Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone by enzymes of brain tissue. **J. Neurochem.**, v. 54, p. 1-10, 1990

O'HARA, B.F.; DONOVAN, D.M.; LINDBERG, I. Proenkephalin transgenic mice: a short promoter confers high testis expression and reduced fertility. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 38, p. 275-284, 1994

OHTSUKI, T.; TSUDA, H.; MORIMOTO, C.J. Good or evil: CD26 and HIV infection. **Dermat. Sci.**, v. 22, p. 152-160, 2000

OLIVEIRA LIMA, A.; BENJAMIN SOARES, J.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; ROMEU CANÇADO, J. In: **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 5ª ed, Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 1977

OLSEN, J.; CLASSEN-LINKE, I.; SJOSTROM, H.; NOREN, O. Pseudopregnancy induces the expression of hepatocyte nuclear factor-1 beta and its target gene aminopeptidase N in rabbit endometrium via the epithelial promoter. **Biochem. J.**, v. 312 (Pt 1), p. 31-37, 1995

OMBELET, W.; MENKVELD, R.; KRUGER, T.F.; STEENO, O. Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. **Hum. Reprod. Update**, v. 1, p. 543-557, 1995

OSADA, T.; WATANABE, G.; KONDO, S.; TOYODA, M.; SAKAKI, Y.; TAKEUCHI, T. Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 960-971, 2001

PARKER, G.A.; BALL, M.A.; STOCKLEY, P.; GAGE, M.J.G. Sperm competition games: a prospective analysis of risk assessment. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 264, p. 1793-1802, 1997

- POUGH, F.H. **A vida dos vertebrados**. Atheneu Editora: São Paulo, 1999. 798p.
- RAGNI, G.; de LAURETIS L.; BESTETTI, O.; SGHEDONI, D.; GAMBARO, V. Gonadal function in male heroin and methadone addicts. **Int. J. Androl.**, v. 11, p. 93–100, 1988
- RAWLINGS, N.D.; BARRET, A.J.; WOSSNER, J.F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Academic Press, 1998
- RHEN, T.; CREWS, D. Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. **Neuroendocrinology**, v. 71, n. 4, p. 252-261, 2000
- RONAI, A.Z.; TIMAR, J.; MAKÓ, E.; ERDO, F.; GYARMATI, Z.; TOTH, G.; OROSZ, G.; FURST, S.; SZEKELY, J.I. Diprotin A, an inhibitor of dipeptidyl aminopeptidase IV(EC 3.4.14.5) produces naloxone-reversible analgesia in rats. **Life Sci.**, v. 64, p. 145-152, 1999
- ROQUES, B.P.; NOBLE, F.; DAUGÉ, V.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C.; BEAUMONT, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition and experimental clinical pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 87-146, 1993
- SAINT-GIRONS, H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1982
- SALOMÃO, M.G.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; PUERTO, G. Activity pattern of the rattlesnake *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae): Feeding, reproduction and snakebite. **Stud. Neotrop. Fauna. Environ.**, v. 30, p. 101-106, 1995
- SALOMÃO, M.G.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT GW, HÖGGREN M, DOUGLAS ME, GREENE HW (eds). **Biology the vipers**, Carmel, Indiana: Eagle Mountain, 2002
- SANYAL, M.K.; PRASAD M.R.N. Sexual segment of the kidney of the Indian house lizard *Hemidactylus flaviviridis* Rüppel. **J. Morphol.**, v. 118, p. 511–528, 1966
- SASTRY, B.V.; JANSON, V.E.; OWENS, L.K. Significance of substance P and enkephalin-peptide systems in the male genital tract. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 632, p. 339-353, 1991
- SATO, Y. Aminopeptidases and angiogenesis. **Endothelium**, v. 10, p. 287-290, 2003
- SATO, H.; SCHILL, W.B. Temperature-dependent effects of the components of kallikrein-kinin system on sperm motility in vitro. **Fertil. Steril.**, v. 47, n. 4, p. 684-688, 1987
- SCHILL, W.B.; HABERLAND, G.L. Kinin-induced enhancement of sperm motility. **Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.**, v. 355, n. 2, p. 229-231, 1974
- SCHILL, W.B.; MISKA, W.; PARSCH, E.M.; FINK, E. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: FRITZ, H.; SCHMIDT, I.; DIETZE, G.D. (eds), **The Kallikrein-Kinin System Health and Disease**. Braunschweig: Limbach Verlag, p. 171-203, 1989

SCHLONDORFF, J.; BLOBEL, C.P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 3603-3617, 1999

SCHUETT, G.W. Is long term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pit vipers? In: CAMPELL, J.A.; BRODIE, J.R. (ed). **Biology of pitvipers**, Texas: Selva, Tyler, 169-184, 1992

SCHUETT, G.W.; FERNANDEZ, P.J.; GERGITS, W.F.; CASNA, N.J.; CHISZAR, D.; SMITH, H.M.; MITTON, J.B.; MACKESSY, S.P.; ODUM, R.A.; DEMLONG, M.J. Production of offspring in the absence of males: evidence for facultative parthenogenesis in bisexual snakes. **Herp. Nat. Hist.**, v. 5, p. 1-10, 1997

SHINE, R. Reproduction in the australian elapid snakes. II. Female reproductive cycles. **Aust. J. Zool.**, v. 25, p. 655-666, 1977

SILVEIRA, P.F.; IRAZUSTA, J.; GIL, J.; AGIRREGOITIA, N.; CASIS, L. Interactions among challenges of hydromineral balance, angiotensin-converting enzyme, and cystine aminopeptidase. **Peptides**, v. 22, p. 2137-2144, 2001

SIVITER, R.J.; COCKLE, S.M. Peptides related to thyrotrophin-releasing hormone are degraded in seminal plasma by an enzyme similar to prolil endopeptidase. **J. Endocrinol.**, v. 144, p. 61-66, 1995

SODERBERG, C.; GIUGNI, T.D.; ZAIA, J.A.; LARSSON, S.; WAHLBERG, J.M.; MOLLER, E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. **J. Virol.**, v. 67, p. 6576-6585, 1993

SOMLEV, B.; SUBEV, M. Effect of kininase II inhibitors on bradykinin-stimulated bovine sperm motility. **Theriogenology**, v. 50, p. 651-657, 1998

STAM, W.B.; VAN der GRAAF P.H.; SAXENA, P.R. Characterization of receptors mediating contraction of the rat isolated small mesenteric artery and aorta to arginine vasopressin and oxytocin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 865-873, 1998

STEWART, J.R. **Morphology and evolution of the egg of oviparus amniotes**. In: SUMIDA SS, MARTIN KLM (eds.). Amniote origins. San Diego: Academic Press, p. 291-326, 1997

STEWART, J.R.; THOMPSON, M.B. Placental struture of the australian lizard *Niveoscincus metallicus* (Squamata: Scincidae). **J. Morphol.**, v. 227, p. 223-236, 2000

SUMITANI, S.; RAMLAL, T.; SOMWAR, R.; KELLER, S.R.; KLIP, A. Insulin regulation and selective segregation with glucose transporter-4 of the membrane aminopeptidase vp165 in rat skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1029-1034, 1997

TAKAHASHI, T.; IKAI, A.; TAKAHASHI, K. Purification and characterization of proline-beta-naphthylamidase, a novel enzyme from pig intestinal mucosa. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 11565-11571, 1989

TAYLOR, E.N.; DeNARDO, D.F. Reproductive ecology of western diamond-backed rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in the Sonoran desert. **Copeia**, v. 1, p. 152-158, 2005

TAYLOR, E.N.; DeNARDO, D.F.; JENNINGS, D.H. Seasonal steroid hormone levels and their relation to reproduction in the western diamond-backed rattlesnake, *Crotalus atrox* (Serpentes: Viperidae). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 136, n. 3, p. 328-337, 2004

THOMPSON, M.W.; TOBLER, A.; FONTANA, A.; HERSH, L.B. Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 258, n. 2, p. 234-40, 1999

TURZYNSKI, A.; MENTLEIN, R. Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney. Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase. **Eur. J. Biochem.**, v. 190, p. 509-515, 1990

VALVIDIA, A.; IRAZUSTA, J.; FERNÁNDEZ, D.; MÚICA, J.; OCHOA, C.; CASIS, L. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. **Regul. Pept.**, v. 122, p. 79-84, 2004

VANDEKERCKHOVE, P.; LILFORD, R.; VAIL, A.; HUGHES, E. Kinin-enhancing drugs for unexplained subfertility in men. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 2, 2000

VARONA, A.; SILVEIRA, P.F.; IRAZUSTA, A.; VALDIVIA, A.; GIL, J. Effects of changes in hydromineral balance on rat brain aspartyl, arginyl, and alanyl aminopeptidase activities. **Horm. Metab. Res.**, v. 35, p. 36-42, 2003

VASSE, Y. **Hemipenes**. In: BAUCHOT R. Snakes- a natural history. New York: Sterling Publishing, 1994

VINSON, G.P.; MEHTA, J.; EVANS, S.; MATTHEWS, S.; PUDDEFOOT, J.R.; SARIDOGAN, E.; HOLT, W.V.; DJAHANBAKHCH, O. Angiotensin II stimulates sperm motility. **Regul. Pept.**, v. 67, n. 2, p. 131-135, 1996

VINSON, G.P.; PUDDEFOOT, J.R.; HO, M.M.; BARKER, S.; MEHTA, J.; SARIDOGAN E.; DJAHANBAKHCH, O. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. **J. Endocrinol.**, v. 144, n. 2, p. 369-378, 1995

WAKE, M.H. Oviduct structure and function in non-mammalian vertebrates. **Fortschr. Zool.**, v. 30, p. 427-435, 1985

WATTS, P.C.; BULEY, K.R.; SANDERSON, S.; BOARDMAN, W.; CIOFI, C.; GIBSON, R. Parthenogenesis in komodo dragons. **Nature**, v. 444, p. 1021-1022, 2006

WOODWARD, S.F. A few notes on the persistence of active spermatozoa in the african night-adder, *Causus rhombeatus*. **Proc. Zool. Soc. London**, p. 189-190, 1933

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination of human semen, and semen-cervical mucus interaction**. 4th ed. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1999

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P.F.; ABDALLA, F.M.F.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; BRENO, M.C.; SALOMÃO, M.G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 139, p. 151-157, 2004

YOSHIMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; ICHIKAWA, F.; ODA, T.; JINNO, M.; ANDO, M.; KOYAMA, N.; SHIOKAWA, S. Possible involvement of leukotrienes in human luteal function. **Acta Endocrinol.**, v. 127, p. 246–251, 1992

YU, H.; BERKEL, H. Prostate-specific antigen (PSA) in women. **J. La State Med. Soc.**, v. 15, p. 209–213, 1999

ZACARIOTTI, R.L. **Estudo longitudinal do espermograma e dos níveis de testosterona sérica de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) proveniente da natureza do Estado de São Paulo**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004

ZUG, G.R. **Herpetology, an introductory biology of amphibians and reptiles**. San Diego, CA: Academic Press, 1993. 527p