

**INFLUÊNCIA DO CLIMA NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN
E NA COMPOSIÇÃO PROTEICA DO PLASMA SEMINAL
EM ZEBUS E TAURINOS**

JULIANA DOMINGOS ARCHANJO DOS REIS

**INFLUÊNCIA DO CLIMA NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN
E NA COMPOSIÇÃO PROTEICA DO PLASMA SEMINAL
EM ZEBUS E TAURINOS**

JULIANA DOMINGOS ARCHANJO DOS REIS

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof.Dr. Marcelo George Mungai Chacur

636.089 26 Rejs, Juliana Domingos Archanjo dos.
R375i Influência do clima nas características do sêmen
e na composição proteica do plasma seminal em
zebus e taurinos / Juliana Domingos Archanjo dos
Reis. -- Presidente Prudente, 2013.
42 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2013.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai
Chacur.

1. Bos taurus indicus. 2. Proteínas do plasma
seminal. 3. Eletroforese. I. Título.

JULIANA DOMINGOS ARCHANJO DOS REIS

**INFLUÊNCIA DO CLIMA NAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN
E NA COMPOSIÇÃO PROTEICA DO PLASMA SEMINAL
EM ZEBUS E TAURINOS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 23 de setembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur (orientador)
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Sandra Helena Gabaldi
Faculdades Adamantinense Integradas - FAI
Adamantina - SP

Profa. Dra. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais:

A vocês, que me deram a vida
e me ensinaram a vivê-la com dignidade.

A vocês, que iluminaram os meus caminhos
com afeto e dedicação
para que trilhasse sem medo e
cheia de esperança.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram
aos seus sonhos, para que, muitas vezes,
pudesse realizar os meus sonhos.

Pela longa espera e compreensão
durante minhas longas viagens,
não bastaria um muitíssimo obrigado.

A vocês, meus amigos, anjos da guarda não bastaria dizer,
que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas o que nos acontece agora
é a prova da nossa conquista onde juntos construímos e lutamos, e assim posso
finalmente dizer o meu eterno obrigada e enfim lhes dar o que eu sempre prometi...

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aparecido Archanjo dos Reis e Marlene Domingos da Silva Reis, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, dando força mesmo estando longe, com diversas dificuldades sempre estiveram fortes para me dar o suporte, com palavras, gestos e orações, muitíssimo obrigado.

Ao meu orientador Dr. Marcelo George Mungai Chacur, que me orientou verdadeiramente como um Mestre, amigo e sem dúvidas foi uma honra tê-lo como professor. Sem o mesmo não conseguiria chegar aonde cheguei, meu eterno carinho, admiração e agradecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e a UNOESTE pelo apoio logístico e financeiro.

Ao Sr. Walter Lemes Soares muito obrigada pela confiança e por ter acreditado neste trabalho.

Ao meu amigo, irmão, anjo da guarda o Zootecnista e Médico Veterinário Dr. Ricardo Henrique Zakir Pereira que desde o tempo de graduação, teve paciência e dedicação me auxiliando nos estudos, me apoiando, me fazendo sorrir quando muitas vezes chorei o meu obrigado e meu coração.

“Foco, Força e Fé”. (autor desconhecido)

RESUMO

Influência do clima nas características do sêmen e na composição proteica do plasma seminal em zebus e taurinos

O plasma seminal é um complexo de secreções dos órgãos reprodutores acessórios dos machos e aparentemente exercem importantes efeitos sobre a função espermática. A qualidade das proteínas do plasma seminal pode colaborar com a fertilidade dos touros. O objetivo desse estudo foi de determinar a influência das estações do ano sobre as características morfológicas dos testículos, epidídimos, sêmen e das proteínas do plasma seminal por meio da eletroforese SDS-PAGE em touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, criados extensivamente. Foram utilizados 5 touros Nelore e 2 Simental, avaliou-se a morfometria testicular e escrotal, qualidade do sêmen e perfil proteico do plasma seminal em SDS-PAGE nas estações seca e chuvosa. Obteve-se para os taurinos um volume testicular VT = 460,14 cm³ na estação chuvosa e VT = 571,26 cm³ na estação seca. Com relação aos zebuínos, na estação chuvosa o VT foi de 524,75 cm³ e de 515,13 cm³ na estação seca. A motilidade espermática na estação seca para os taurinos e os defeitos espermáticos totais na estação chuvosa para esse mesmo grupo de animais, mostraram-se como pontos de estrangulamento dentro da análise do espermograma, sugerindo especial atenção dos mesmos quando da seleção de touros para fins de monta natural. As estações influenciaram nas características morfológicas e do sêmen. A subespécie taurina revelou uma grande plasticidade testicular, refletida na volumetria do testículo que se reduz na estação chuvosa. Com relação à morfologia espermática, verificou-se que houve efeito significativo da estação seca, melhorando a qualidade morfológica dos espermatozoides. Para a eletroforese, verificou-se a presença de grande diversidade de bandas proteicas presentes no plasma seminal, sendo as bandas de 14, 21 e 65 kDA presentes em todos os animais das duas subespécies nas estações estudadas. Sugere-se que as três bandas protéicas encontradas em todas as amostras, provavelmente, possuam ação benéfica em relação ao quadro espermático dos touros, colaborando com a fertilidade.

Palavras-chave: touros, estação do ano, sêmen, SDS-PAGE, fertilidade.

ABSTRACT

Season influence upon semen characteristics and seminal plasma proteins In zebu and taurine

Seminal plasma is a complex of secretions of the accessory reproductive organs of males with effects on sperm function. The quality of seminal plasma proteins may contribute to the fertility of bulls. The aim of this study was to determine the influence of season on the morphologic characteristics of the testes, epididymis, sperm and seminal plasma proteins by SDS-PAGE in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus*, bulls raised extensively. In this study 5 Nellore and 2 Simmental bulls, we used evaluated the scrotal and testicular morphometry, semen quality and the seminal plasma protein profile in SDS-PAGE in the dry and rainy seasons. Was obtained for a testicular volume $TV = 460.14 \text{ cm}^3$ during the rainy season and $TV = 571.26 \text{ cm}^3$ in the dry season. With respect to Zebu, in the rainy season the TV was 524.75 cm^3 and 515.13 cm^3 in the dry season. Sperm motility in the dry season for the taurine and total sperm defects in the rainy season for this same group of animals, showed as critical situation in the seminal analysis, suggesting the same attention when selecting bulls for purposes of natural mating. it is observed in 100% of the samples of the protein bands of 14 kDa, 21 kDa and 65 kDa in two stations evaluated. The seasons influence on morphology, and semen. The subspecies taurine showed great plasticity testicular volumes reflected in the testicle that reduces the rainy season. With respect to morphology, we found that there were significant effects of the dry season, improving the quality of sperm morphology. For electrophoresis, it was verified the presence of a large diversity of protein bands present in seminal plasma, and the bands 14, 21 and 65 kDa present in all the animals studied subspecies stations. It is suggested that the three protein bands found in all samples probably have beneficial action in relation to the framework sperm of bulls, collaborating with fertility.

Keywords: bulls, season, semen, SDS-PAGE, fertility.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Sêmen	11
2.2 Termorregulação Testicular, Fatores Climáticos e Reprodução.....	13
2.3 Eletroforese em SDS–PAGE	16
2.4 Proteínas do Plasma Seminal	16
REFERÊNCIAS.....	19
3 ARTIGO CIENTÍFICO: Influência das estações do ano nas características seminais e perfil protéico seminal por meio da eletroforese SDS–PAGE em bovinos.....	23

1 INTRODUÇÃO

Contendo o maior rebanho bovino comercial do mundo, o Brasil possui grandes condições para atender o aumento na demanda dos mercados nacional e internacional (JORGE JÚNIOR; CARDOSO; ALBUQUERQUE, 2006).

Com o aumento da produtividade houve a necessidade do emprego de biotécnicas aplicadas à reprodução animal para que os índices zootécnicos fossem alcançados. Dentre alguns métodos há um destaque para a inseminação artificial, já bastante difundida entre os produtores do setor, auxiliando no melhoramento genético, maximizando a distribuição de genes favoráveis, eliminando o contato físico entre os animais e conseqüentemente diminuindo os índices de propagação de doenças sexualmente transmissíveis (BOILARD et al., 2002).

Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial - ASBIA (2010), a monta natural realizada de um touro fértil pode deixar de 120 a 400 descendentes, contando que este passe por meio de avaliação andrológica, já com a utilização da inseminação artificial esse número pode ultrapassar os 100.000 descendentes, salientando a importância da sua utilização.

Outro ponto importante que pode influenciar na fertilidade dos touros, diz respeito aos fatores climáticos, sendo que a maioria dos reprodutores são criados de forma extensiva, estando expostos ao clima (CHACUR et al., 2011).

As diferenças na fertilidade observadas entre os animais, muitas vezes não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen (JOBIM et al, 2009).

Roncoletta et al. (1999) sugeriram que o conteúdo do plasma seminal pode influenciar na fertilidade dos machos, desta forma utilizaram perfis eletroforéticos como marcadores no auxílio da avaliação clínica.

Estudos recentes mostram evidências entre associações significativas de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliados, tais proteínas são designadas como marcadores moleculares de fertilidade (MOURA et al., 2006).

Em virtude da importância da seleção de touros férteis, o presente estudo justifica-se, pois os reprodutores colaboram com 50% da probabilidade de ocorrer prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A utilização de marcadores bioquímicos nos estudos que indicam o potencial reprodutivo do animal tem sido objeto de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, e que provavelmente irão contribuir significativamente na escolha de reprodutores superiores (JOBIM et al., 2009).

O plasma seminal serve de veículo para os espermatozoides ejaculados, e possui em sua estrutura inúmeros grupos de proteínas, que induzem as alterações moleculares na membrana plasmática, essenciais para a capacitação espermática (THERIEN, 1998; BERGERON, 2004). Todavia a análise de sêmen é baseada em técnicas de microscopia, tendo como principais parâmetros avaliados: motilidade, vigor, concentração e morfologia (HAFEZ; HAFEZ 2004).

A partir da década de 90, estudos referentes à composição do plasma seminal, foram propostos para determinar marcadores bioquímicos de fertilidade para enfim predizer o potencial reprodutivo de um animal permitindo a seleção dos animais mesmo antes da puberdade, tornando o processo de seleção ainda mais ágil e eficiente (CHACUR et al., 2006).

O perfil eletroforético das proteínas de touros taurinos e zebuínos, revelam que, há cerca de 20% a mais de proteínas totais no conteúdo plasmático dos zebuínos, em relação aos taurinos (RONCOLETTA et al., 1999).

A concentração de proteínas totais encontradas no sêmen é uma ferramenta importante para caracterizar sua funcionalidade no congelamento e fertilidade de touros bubalinos (ARANGASAMY et al., 2005).

2.1 Sêmen

O sêmen possui em sua constituição uma fração líquida: o plasma seminal e outra composta pelos espermatozoides, os quais possuem características que lhes permitem alto desempenho para movimentação progressiva retilínea, sendo de suma importância na penetração da zona pelúcida. No plasma seminal são encontrados os açúcares e outras substâncias como ácido cítrico e sorbitol, utilizados pela bainha mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides para a combustão energética, resultando na movimentação espermática (VALE FILHO, 1997).

Características seminais são descritas como físicas e morfológicas, sendo as físicas: volume, cor; aspecto, odor, pH, motilidade, turbilhonamento, vigor e concentração; e as morfológicas: classificadas quanto às anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, ainda podem ser agrupadas em defeitos espermáticos maiores, defeitos menores e defeitos totais (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998). A somatória das características físicas e morfológicas do sêmen caracterizam o quadro espermático para fins de laudo reprodutivo (RODRIGUEZ - MARTINEZ, 2005).

Diversos estudos enfocaram a relação entre a avaliação morfológica do sêmen e a porcentagem de concepções seguintes aos acasalamentos. Nesses mesmos trabalhos, foram verificadas variações das amostras de sêmen do mesmo touro, sendo colhidas em épocas distintas do ano, dificultando determinar somente com um único exame a eficiência reprodutiva do animal em questão (DONHAM; SIMMS; SHAW, 1931).

As anormalidades celulares dividem-se em três grupos, sendo 25 anomalias espermáticas primárias que reúnem as de origem em distúrbios do epitélio seminífero, que resultam em formas anormais de cabeça; anomalias no desenvolvimento do acrossomo e algumas anomalias da peça intermediária e da cauda. As anomalias espermáticas secundárias afetam o espermatozoide formado, sendo resultado de condições não fisiológicas, desde o epidídimo até o momento da ejaculação que originam cabeças isoladas normais, espermatozoides com gotas citoplasmáticas e caudas dobradas e/ou enroladas. Já no terceiro grupo encontram-se as células primordiais, ainda indiferenciadas, sendo verificadas em touros com degeneração testicular (BLOM, 1950).

Deve-se considerar uma série de fatores para avaliar e analisar uma amostra de sêmen de um reprodutor tais como: idade, época do ano, método de colheita empregado, além da individualidade do animal (MIES FILHO, 1982). Portanto, a relação entre o tipo e a prevalência das alterações morfológicas dos espermatozoides, demonstra relação direta com a fertilidade do animal (MCGOWAN et al., 2002; FITZPATRICK et al., 2002; CORRÊA et al., 2006).

2.2 Termorregulação testicular, fatores climáticos e reprodução

O testículo possui funções básicas de sintetizar hormônios e realizar a espermatogênese, sendo este um processo longo e extremamente sensível, em que exige a manutenção da temperatura testicular, entre 2 a 6°C abaixo da temperatura corporal, para que haja a produção de espermatozoides com capacidade de fertilização (COULTER, 1988).

A anatomia dos testículos e escroto possibilita a regulação da temperatura testicular, estes possuem receptores de temperatura que estão localizados na pele escrotal, podendo provocar variações diminuindo a temperatura e aumento da frequência respiratória e transpiração (ROBERTSHAW, 1982). Outro fator importante na fisiologia é que na pele do escroto existe em grande parte de sua constituição uma grande proporção de glândulas sudoríparas e seu componente muscular, a túnica de dartos, que permite alterar a espessura e área da superfície do escroto, modificando a distância do testículo, em relação ao corpo do animal (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O mecanismo de troca de calor tende a variar, oscilando de acordo com a diferença de temperatura entre a artéria e a veia testiculares (temperatura corpórea e testículo), respectivamente. O escroto penduloso aumenta a área de superfície facilitando a exposição do cone vascular ao meio, permitindo que os testículos fiquem distantes do corpo do animal, este trabalha em estado de hipóxia, onde apenas 50% do sangue que chega pela artéria testicular irriga os testículos (WOLF; GABALDI, 2002).

Nos animais domésticos, a artéria testicular possui uma estrutura enovelada, em forma de cone, tendo sua base no pólo cranial ou dorsal do testículo, esta se apresenta envolta pelo plexo pampiniforme das veias testiculares, fazendo com que o sangue arterial que chega nos testículos seja resfriado pelo sangue venoso da circulação de retorno (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Determinados músculos possuem ações benéficas na termorregulação tais como, músculo cremaster que relaxa e contrai para aproximar os testículos do corpo nas situações de baixas temperaturas e a túnica dartos, músculo estriado que facilitam a preservação do gradiente de temperatura, porém este não sustenta a contração por muito tempo (KASTELIC, 2001; WOLF; GABALDI, 2002).

Os animais expostos a períodos relativamente curtos, diante de altas temperaturas e umidade ambientais, podem processar espermatogênese com aumento significativo de espermatozoides anormais, conforme descrito em touros, carneiros e cachacos (HAFEZ, HAFEZ, 2004).

Considerada a principal causa da infertilidade em touros, por vários autores, a degeneração testicular é caracterizada pelo desarranjo das funções dos túbulos seminíferos na produção espermática, sendo que o testículo possui grande sensibilidade a fatores de injúrias e estresse intenso como: temperaturas elevadas, deficiências nutricionais e doenças crônicas (GOIOZO et al., 2005), podendo ser uma alteração uni ou bilateral, temporária ou permanente, dependendo do tipo, severidade e/ou duração do insulto (SETCHELL, 1998).

Altas temperaturas ambientais podem alterar a qualidade do sêmen e atuar no decréscimo da produção de esteroides em touros (WOLF; GABALDI, 2002). Entende-se que algumas raças são susceptíveis aos fatores estressantes do meio ambiente, como os taurinos, mais vulneráveis à degeneração testicular devido à seleção e adaptação para regiões de clima ameno, estes não resistem às altas temperaturas. Além disso, os fatores manejo e alimentação, impostos a estes animais diferem em relação aos dos seus países de origem (SILVA et al., 1993).

Animais da raça zebuína possuem melhor termorregulação corpórea e escrotal e apresentam maior resistência ao estresse térmico, por apresentarem uma superfície de pele mais extensa e com maior número de glândulas sudoríparas (SANTIAGO, 2006).

Os primeiros sinais clínicos de um animal em processo de degeneração testicular são a consistência e volume testicular alterados, porém o estado geral do animal e a libido nem sempre são influenciados. O grau da enfermidade pode variar, a consistência dos testículos oscila entre a fibroelástica até a flacidez de graus I, II e III. A motilidade espermática pode ser elevada ou baixa, conforme o grau da degeneração; e a concentração de espermatozoides se reduz com a evolução do quadro (SILVA et al., 1993; ARISTIDES, 2005). A taxa de produção gamética de um animal neste estado apresenta elevação na porcentagem de defeitos espermáticos e queda da motilidade e concentração espermáticas, a reversão deste quadro pode ocorrer caso o agente da degeneração seja minimizado ou eliminado (SILVA et al., 1993).

Na grande maioria dos casos, se torna difícil determinar se a lesão causada pela degeneração testicular será transitória ou permanente, há necessidade de tempo para aguardar o período de produção espermática pelos testículos e da passagem dos espermatozoides pelo epidídimo. Período esse compreendido entre, aproximadamente, duas semanas após o insulto podendo chegar até um mês (ENTWISTLE, 1992).

Em um estudo desenvolvido com animais híbridos *Bos taurus* x *Bos indicus*, verificou-se que 48 horas de insulação do escroto, resultou na produção de espermatozoides decapitados, sendo que nos dias 12 a 23 pós-insulação, anormalidades acrossômicas e de cauda foram verificadas; e entre os dias 17 a 23, gotas protoplasmáticas (WILDEUS; ENTWISTLE, 1983).

Temperaturas ambiente elevadas influenciam negativamente na espermatogênese, estando entre 27°C e 32°C, e exposições contínuas a temperaturas excedendo os 30°C podem resultar em efeito negativo sobre a produção espermática (SKINNER; LOUW, 1966). Nos casos mais severos, ocorrem oligozoospermia e astenozoospermia, além do aumento no número de espermatozoides com anomalias morfológicas, especialmente com defeitos de cabeça e peça intermediária (NASCIMENTO; SANTOS, 1997).

O estudo das variáveis climáticas está relacionado com a seleção de touros, colaborando com a escolha de animais mais adaptados a uma distinta região geográfica. Várias pesquisas relacionando a influência do clima na reprodução foram realizadas, principalmente em bovinos de raças taurinas (*Bos taurus taurus*). Touros de raças zebuínas apresentam menor concentração espermática na época chuvosa, e quando comparados com raças taurinas a concentração é menor em ambas as estações (ANCHIETA et al., 2005).

Para Chacur et al. (2006) a baixa temperatura no inverno pode ocasionar um aumento nos defeitos espermáticos, sendo as porcentagens de defeitos maiores 20,96% e defeitos menores 21,80% e no verão, defeitos maiores 8,2% e defeitos menores 6,18%. Vale destacar que o verão foi ameno com umidade do ar intermediária, clima propício para os touros da raça Nelore.

2.3 Eletroforese em SDS–PAGE

A SDS–PAGE é a eletroforese de proteínas mais amplamente usada, sua sigla significa: eletroforese em géis de poliacrilamida que se realiza na presença de SDS duodecil sulfato de sódio (SDS), descrito por Laemilli (1970).

O tamanho do poro do gel pode ser ajustado, de forma que sejam suficientemente pequenos, para retardar a migração das moléculas de proteínas. As próprias proteínas não estão em uma solução aquosa, e sim em uma solução que inclui um detergente forte, carregado negativamente, o SDS. Cada molécula de proteína se liga a várias moléculas do detergente carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo, quando a voltagem é aplicada. A eletroforese contendo SDS é utilizada para a separação de cadeias polipeptídicas. A proteína será desnaturada por aquecimento a 100°C, na presença de beta mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT) e do detergente SDS. Na eletroforese, as cadeias polipeptídicas de carga negativa, proporcionais ao comprimento da cadeia peptídica migrarão com velocidades definidas apenas por diferenças de seus tamanhos moleculares (ALFENAS, 1998).

2.4 Proteínas do Plasma Seminal

Com o emprego da eletroforese em SDS-PAGE, pode-se observar a presença de um abundante número de proteínas, dentre elas se destacam o grupo das proteínas do plasma seminal bovino (BSP), estas proteínas são encontradas no plasma seminal e são as principais proteínas de ligação à heparina. Dentre suas particularidades ocorre uma ligação com a superfície no momento da ejaculação, devido à suas propriedades ligantes, além de participarem do metabolismo lipídico do espermatozoide e desempenham papel fundamental no processo da capacitação espermática (NAUC; MANJUNATH, 2000).

Dentro deste grupo de proteínas encontram-se as: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-15kDa, que pertencem à família de glicoproteínas com exceção das BSP-A3. A BSP-A1/-A2 e BSP-A3 tem pesos moleculares de 15 -16,5 kDa, pl 4,7-5,2, enquanto que a BSP de 30 kDa possui um peso molecular de 28-30 kDa, pl 3,9-4,6 As BSP encontradas em maior proporção no plasma seminal são as BSP-A1 e

BSP-A2, totalizando 38% da fração total do plasma seminal, enquanto a BSP-A3 representa 3% a 4% da fração total das proteínas (NAUC; MANJUNATH, 2000).

Romão (2002) descreve a proteína de 13kDa como PDC-109, conferindo alta fertilidade aos touros, agindo, de forma direta, no metabolismo do espermatozoide.

Proteínas com peso molecular referente à 12, 30, 55, 66, 80, 90 e 105 kDa, contribuem com o quadro espermático (CHACUR et al., 2006). Foi encontrada uma maior proporção da proteína BSP A3, no plasma seminal de touros de baixa fertilidade. Ao considerar que as proteínas BSP, representam cerca de 70% do constituinte total das proteínas do plasma seminal, é sugerido haver uma relação entre concentração de proteína total e concentração de BSP totais no plasma, para touros de baixo desempenho reprodutivo, confirmando portanto a importância da utilização das BSPs como ferramenta para predizer o potencial de fertilidade do macho (RONCOLETTA, 2003).

Outro grupo de proteínas encontrados no plasma seminal são as denominadas Prostaglandina D, também conhecida como 26kDa, pI 6,2, sendo a principal proteína secretada pelas células epiteliais do epidídimo do bovino, esta exerce o papel durante o desenvolvimento e maturação espermática (GERENA, 2000), todavia a função exata que a mesma exerce sobre os espermatozoides ainda não está totalmente estabelecido (MOURA et al., 2006).

Segundo Chacur et al. (2006) a proteína 26kDa esteve presente em 25% das amostras de plasma seminal dos animais aptos para a reprodução; e em 75% dos touros Nelore parcialmente aptos, pertencentes as variedades padrão e mocho, por outro lado, essa mesma proteína tem sido alvo de estudos por conferir baixa fertilidade aos touros, quando presente no plasma seminal (RONCOLETTA et al., 1999; CHACUR et al., 2003).

Estudos realizados quantificaram a prostaglandina em sêmen bovino, com o uso de antisoro específico, foi observado que as maiores concentrações desta proteína foram encontradas em touros de alta ou normal fertilidade. Porém houve touros que apresentaram diferentes graus de fertilidade, e baixas concentrações desta proteína, sugerindo assim que esta proteína não é importante ou pode ser assumida por outras proteínas quando sua concentração não for significativa (FOUCHÉCOURT et al., 2002).

Gerena (2000) detectaram que a prostaglandina se encontra em diferentes partes do epidídimo (principalmente na cabeça), associada com a regulação e a integridade funcional do epidídimo.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p.574.
- ANCHIETA, M. C. et al. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, p. 196-204, 2005.
- ARANGASAMY, A. et al. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 90, p. 243-254, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Informações técnicas sobre inseminação artificial. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/informacoes/>>. Acesso em: 24 abr. 2012.
- BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal plasma of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Ceres, 2004.
- BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fertility and Sterility**, v. 1, n. 3, p. 223-238, 1950.
- BOILARD, M. et al. Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1125–1132, 2002.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p.49, 1998.
- CHACUR, M. G. M. et al. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal: correlação com o quadro espermático. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 185-186, 2003.
- CHACUR, M. G. M. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da Raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2006.
- CHACUR, M. G. M. et al. Influência das estações seca e chuvosa no plasma seminal (SDS-PAGE) e características do ejaculado de touros *Bos taurus indicus*. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1571, 2011.
- CORRÊA, A. B. et al. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 388-393, 2006.

COULTER, G. H. Thermography of bull testes. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 12., 1988, Milwaukee, Wi. **Proceedings...** Columbia, MO: National Association of Animal Breeders, 1988. p. 58-62.

DONHAM, C. R.; SIMMS, B. T.; SHAW, J. N. Fertility studies in the bull. II The relation of the microscopic findings in semen to its fertility. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 78, n. 5, p. 665-680, 1931.

ENTWISTLE, K. Effects of heat stress on reproductive function in bulls. **Bull Fertility, Proceedings**, p. 57-63, 1992.

FITZPATRICK, L. A. et al. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 71, p. 39-49, 2002.

FOUCHÉCOURT, S. et al. Mammalian lipo- calin-type prostaglandin D2 synthesis in the fluids of the male genital tract: Putative Biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, n. 3, p. 458-467, 2002.

GERENA, R. L. Inmunocytochemical localization of lipocalin. Type prostaglandin D, synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 62, p. 547-556, 2000.

GOIOZO, P. F. I. et al. Alterações testiculares em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) criados no centro-oeste brasileiro. **Revista CFMV**, v. 11, n. 34, p. 58-62, 2005.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p.530.

JOBIM, M. I .M. et al. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. Belo Horizonte, n. 6, p. 29, 2009.

JORGE JÚNIOR, J.; CARDOSO, V. R.; ALBUQUERQUE, L. V. Modelo bioeconômico para cálculo de custos e receitas em sistemas de produção de gado de corte visando à obtenção de valores econômicos de características produtivas e reprodutivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 35,n.5, p. 2187-2196, 2006.

KASTELIC, J. P. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Can. J. Vet. Res.**, v. 65, p. 111-115, 2001.

LAEMILLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 2, p. 680-685, 1970.

MCGOWAN, M. R et al. Bull selection and use in northern Australia. Part 1. Physical traits. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 71, p. 25-37, 2002.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, p. 783, 1982.

MOURA, A. A. et al. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 206, 2006.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.108, 1997.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification seminal plasma and sperm. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.

ROBERTSHAW, D. Concepts in animal adaptation: thermoregulation of the goat. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson, Arizona. **Proceedings...**[Tucson?]: Dairy Goat Journal, 1982. p.395-397.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...**Goiânia, GO:Colégio Brasileiro de Reprodução, 2005.

ROMÃO, M. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (a SFP) at 1.9 resolution a bovine polypeptide of the espermadhesin family 1. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 274, n. 4, p. 650 - 660, 2002.

RONCOLETTA, M. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 36, p. 143-148, 1999.

RONCOLETTA, M. Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros. 2003. 104 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SANTIAGO, L. L. Distúrbios produtivos e reprodutivos em rebanho submetido ao estresse térmico. Agrolink, 2006. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

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

SILVA, A. E. D. F. et al. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e outros fatores que a influenciam.** Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1993. p.128.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J. Appl. Physiol**, v. 21, p. 1784-1790, 1966.

THERIEN, I. Major protein of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, New York, v. 59, p. 768-776, 1998.

VALE FILHO, V. R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 7-13, 1997.

WILDEUS S.; ENTIWISTLE, K. W. Spermogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* x *Bos Taurus* bulls after scrotal insulation. **J. Reprod Ferg**, v. 69, p. 711-716, 1983.

WOLF, A.; GABALDI, S. H. A importância da termoregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v. 2, n. 2, jul-dez, 2002. p. 66-70.

Artigo Científico

Influência das estações do ano nas características morfológicas do conteúdo escrotal e perfil protéico seminal por meio da eletroforese SDS–PAGE em Nelore e Simental

Juliana Domingos Archanjo dos Reis¹, Marcelo George Mungai Chacur², Lucas Silva Tavares³, Klisman Sanches³, Luciana Guaberto⁴, Vagner Camarini⁴, Eunice Oba⁵, Felipe Rydygier Ruediger¹, Alcides de Amorim Ramos⁵

Resumo

O plasma seminal é um complexo de secreções dos órgãos reprodutores acessórios dos machos e aparentemente exercem importantes efeitos sobre a função espermática. A qualidade das proteínas do plasma seminal pode colaborar com a fertilidade dos touros. Mudanças climáticas que afetam a gametogênese podem levar a baixa eficiência reprodutiva de touros, Vale Filho [23]. Na Índia, Kodagalli [15] observou uma melhor motilidade espermática em touros de raças zebuínas em períodos de temperaturas mais baixas. Chacur et al. [7] em 2010a relataram que em reprodutores bubalinos submetidos a temperatura de 39°C em ambiente controlado e umidade do ar entre 60 e 95%, a espermatogênese se manteve equilibrada com pequena percentagem de espermatozoides defeituosos. A eletroforese é uma técnica que auxiliam o diagnóstico de algumas patologias ou diferenciação de animais quanto ao grau de sua fertilidade frente a alterações de clima e manejo, associadas a patologias do trato reprodutivo masculino ou do espermatozóide. Determinadas proteínas no plasma seminal, de seres humanos, foram caracterizadas e relacionadas com infertilidade, segundo Roncoletta et al. [20] em 1999. As “Bovine Seminal Plasma Proteins” (BSPs) são proteínas produzidas nas vesículas seminais, ricas em fibronectina tipo II e responsáveis por 70% das proteínas totais do plasma seminal de bovinos, existem três tipos de BSP sendo BSP-A1,

BSP-A2, e BSP-A3 de acordo com Roncoletta [21] em 2003. O objetivo desse estudo foi de determinar a influência das quatro estações do ano sobre as características morfológicas dos testículos, epidídimos, sêmen e das proteínas do plasma seminal por meio da eletroforese SDS – PAGE em touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, criados extensivamente. Foram utilizados cinco Zebuínos e dois Taurinos com idade de quatro anos. Colheitas de sêmen foram realizadas nas estações da primavera, verão, outono e inverno, em intervalos de 15 dias. O exame clínico do aparelho reprodutor dos touros bem como as características qualitativas do sêmen foram utilizados para a eletroforese. As amostras de plasma seminal foram centrifugadas a 1500g/15 min e acondicionadas em criotubos a -196°C até o processamento. As proteínas foram extraídas de 200 µL de cada amostra em 2 mL de tampão para extração composto por 0,625 M Tris – HCl, pH 6,8; 2% SDS, 5% β – mercaptoethanol e 20% de glicerol. As proteínas foram quantificadas conforme Bradford em 1976 [3] e as eletroforeses processadas de acordo com Laemilli em 1970 [16]. Os géis foram fixados com a solução de: isopropanol: ácido acético: água (4:1:5: v/v) durante 30 min, e corados na mesma solução com 2% de “Comassie Blue” R250. Os dados foram avaliados pela análise de variância e posteriormente aplicados ao teste de Tukey a 5%, conforme Banzato e Kronka em 2006 [1]. A análise foi realizada por meio do “software” SAS [22]. Em relação ao volume testicular (VT) empregou-se a expressão: $VT = 0,0396 \times (\text{média do comprimento dos testículos}) \times (\text{perímetro escrotal})$, obtendo-se para os taurinos um $VT = 460,14 \text{ cm}^3$ na estação chuvosa e $VT = 571,26 \text{ cm}^3$ na estação seca. Com relação aos zebuínos, na estação chuvosa o VT foi de $524,75 \text{ cm}^3$ e de $515,13 \text{ cm}^3$ na estação seca. Verificou-se um aumento do VT nos taurinos na estação seca e nos zebuínos na chuvosa. Dentre as características do sêmen, a motilidade espermática na estação seca para os taurinos e os defeitos espermáticos totais na estação chuvosa para esse mesmo grupo de animais, mostraram-se como pontos de estrangulamento dentro da análise do espermograma, sugerindo especial atenção dos mesmos quando da seleção de touros para fins

de monta natural. Valores esses, acima dos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para fins de uso de touros para cobertura natural em condições extensivas de manejo, conforme o CBRA [10] em 1998. Com relação aos géis da eletroforese, observa-se a presença em 100% das amostras das bandas proteicas de 14 kDa, 21 kDa e 65 kDa nas duas estações avaliadas. A banda de 30 kDa esteve presente em 100% das amostras no gel 1 para ambas as estações e as subespécies estudadas. A banda de 179 kDa esteve presente em oito das 14 amostras avaliadas, sendo visualizada em seis amostras provenientes dos Zebuínos e em duas nos Taurinos. Verificou-se que os pesos moleculares das bandas identificadas nos géis variou entre 4 kDa e 205 kDa. Com relação a morfologia espermática, verificou-se que houve efeito significativo da estação seca, melhorando a qualidade morfológica dos espermatozoides.

Para a eletroforese, verificou-se a presença de grande diversidade de bandas proteicas presentes no plasma seminal, sendo as bandas de 14, 21 e 65 kDa presentes em todos os animais das duas subespécies nas estações estudadas.

Palavras-chave: touros, estação do ano, sêmen, SDS-PAGE, fertilidade.

Abstract

Seminal plasma is a complex secretions of the accessory reproductive organs of males and seemingly exert important effects on sperm function. The quality of seminal plasma proteins may contribute to the fertility of bulls. Climate change affecting gametogenesis can lead to low reproductive efficiency of bulls, Son Valley [23]. In India , Kodagalli [15] observed a better sperm motility in Zebu bulls in periods of lower temperatures. Chacur et al. [7] reported that in 2010a breeding buffaloes subjected to a temperature of 39 ° C in a controlled environment and humidity between 60 and 95 %, spermatogenesis remained balanced with small percentage of defective sperm. Electrophoresis is a technique that helps the diagnosis of

some diseases or differentiation of animals in the degree of their fertility against climate change and management, associated with diseases of the male reproductive tract or sperm. Certain proteins in seminal plasma of humans, were characterized and related infertility, according Roncoletta et al. [20] in 1999. The " Bovine Seminal Plasma Proteins " (BSPs) are proteins produced in the seminal vesicles , rich in fibronectin type II and responsible for 70 % of total proteins in the seminal plasma of cattle , there are three types of BSP and BSP - A1 , BSP - A2 , and BSP -A3 Roncoletta according to [21] in 2003. The aim of this study was to determine the influence of the four seasons on the morphological characteristics of the testes, epididymis, sperm and seminal plasma proteins by SDS - PAGE bulls in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus*, raised extensively. Five were used and two Zebu Taureans aged four years. Crops were performed on semen seasons of spring, summer, autumn and winter, every 15 days. Clinical examination of the reproductive tract of bulls and the qualitative characteristics of semen were used for electrophoresis. Seminal plasma samples were centrifuged at 1500g/15 min and placed in cryovials at -196 ° C until processing . Proteins were extracted from 200 ml of each sample in 2 ml of extraction buffer consisting of 0.625 M Tris - HCl , pH 6.8 , 2% SDS , 5 % β - mercaptoethanol and 20% glycerol. The proteins were quantified according to Bradford 1976 [3] and electrophoresis processed according Laemilli 1970 [16] . The gels were fixed with a solution of: isopropanol : acetic acid : water (4:1:5 : v / v) for 30 min and stained in the same solution with 2% " Coomassie Blue" R250 . Data were analyzed by analysis of variance and subsequently applied to the Tukey test at 5 % , as Banzato and Kronka in 2006 [1] . The analysis was performed using the " software " SAS [22] . In relation to testicular volume (VT) used the expression : $VT = 0.0396 \times (\text{the average length of the testes}) \times (\text{scrotal circumference})$, to obtain the taurine to one $VT = 460.14 \text{ cm}^3$ in the rainy season , and $VT = 571.26 \text{ cm}^3$ in the dry season . With respect to Zebu , in the rainy season the VT was 524.75 cm^3 and 515.13 cm^3 in the dry season. There was an increase in

VT during the dry season in the taurine and zebu cattle in rainy. Among the characteristics of semen , sperm motility in the dry season for the taurine and total sperm defects in the rainy season for this same group of animals , showed up as bottlenecks in the analysis of semen , suggesting the same attention when selection of bulls for natural mating purposes . These values above those recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction for the purpose of use of bulls for natural cover in extensive management , as the CBRA [10] in 1998 . With respect to gel electrophoresis, it was observed the presence of 100% of the sample protein bands of 14 kDa , 21 kDa and 65 kDa in two stations evaluated. The 30 kDa band was present in 100 % of the samples on the gel for both stations 1 and subspecies studied. The band of 179 kDa was present in eight of 14 samples, being viewed in six samples from Zebu and two in the Taureans. It was found that the molecular weights of the bands identified in the gels ranged between 4 kDa and 205 kDa. With respect to morphology, we found that there were significant effects of the dry season , improving the quality of sperm morphology. For electrophoresis, it was verified the presence of a large diversity of protein bands present in seminal plasma , and the bands 14, 21 and 65 kDa present in all the animals studied subspecies stations. .

Keywords : bulls , season, semen , SDS -PAGE , fertility.

¹Mestrandos em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP, Brasil, Email:

jureis_zootecnia@hotmail.com, ²Laboratório de Reprodução Animal, UNOESTE, Presidente Prudente – SP, Brasil, Rodovia Raposo

Tavares Km 572, Cep 19067175, Campus II, Email: chacur@unoeste.br, ³Bolsistas PIBIC/CNPq, Unoeste, Presidente Prudente – SP,

⁴Unoeste, Presidente Prudente – SP, ⁵ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu – SP.

Introdução

Diversos fatores afetam a produção animal, entre eles a temperatura, umidade, nutrição, doenças, parasitas e alterações ambientais de diferentes origens, Horn & Galina [13]. A temperatura testicular em touros deve ser 4 a 5° C abaixo da temperatura corporal para que

ocorra espermatozoides normal, conforme Coulter [11]. Segundo Kastelic et al. [14] em 2001, uma moderada elevação da temperatura testicular em touros submetidos à insulação escrotal reduz drasticamente à produção espermática, a motilidade progressiva, a quantidade de espermatozoides vivos por ejaculado e aumenta a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais.

Mudanças climáticas que afetam a gametogênese podem levar a baixa eficiência reprodutiva de touros [25]. Na Índia, Kodagalli [15] observou melhor motilidade espermática em touros de raças zebuínas em períodos de temperaturas mais baixas.

A eletroforese é uma técnica que auxilia o diagnóstico de algumas patologias ou diferenciação de animais quanto ao grau de sua fertilidade frente a alterações de clima e manejo, associadas a patologias do trato reprodutivo masculino ou do espermatozóide. Determinadas proteínas no plasma seminal, de seres humanos, foram caracterizadas e relacionadas com infertilidade, segundo Roncoletta et al. [20] em 1999.

O objetivo desse estudo foi de determinar a influência das quatro estações do ano sobre as características morfológicas dos testículos, epidídimos, sêmen e das proteínas do plasma seminal por meio da eletroforese SDS – PAGE em touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, criados extensivamente.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em uma propriedade rural pertencente ao município de Presidente Prudente – SP, latitude Sul 22° 23' e Longitude W.GE. 51° 27', com precipitação média de 1.300 mm/ano, temperatura média anual de 28°C, clima quente com inverno seco. Em 2012, ano do experimento, na estação seca (outono e inverno) as médias foram de: 22,8°C; 39% de umidade relativa do ar (URA) e 425 mm para o índice pluviométrico (IP); e na estação chuvosa de: 25,6°C e 73% de URA e 890 mm para o IP.

Foram utilizados sete touros previamente selecionados sendo férteis, sendo cinco Zebuínos (Nelore) e dois Taurinos (Simental), com idades de 48 meses, criados extensivamente, em pasto de *Brachiaria decumbens*, sal mineral e água *ad libitum*.

A mensuração do comprimento, largura e altura dos testículos; e a largura dos epidídimos, foi realizada com o auxílio de um paquímetro. A circunferência escrotal (CE) mensurada com fita métrica graduada em centímetros, aferido na região de maior diâmetro do escroto. Para o cálculo do volume testicular (VT), foi utilizada a expressão: $VT = 0,0396 \times (\text{média do comprimento dos testículos}) \times (\text{perímetro escrotal})^2$ segundo Lunstra et al. [17] em 1988.

Foram efetuadas colheitas de sêmen a cada 15 dias em todos os touros, durante os 12 meses do ano, por meio da eletroejaculação, com aparelho automático, proporcionando maior conforto aos animais durante a colheita, totalizando 168 ejaculados. As amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria, entre 32 e 35°C, para as análises imediatas da motilidade espermática progressiva, vigor espermático e turbilhão. Com posterior diluição do sêmen em formol salino tamponado (1:100), para obtenção da concentração espermática em câmara de Neubauer e da morfologia espermática frente a avaliação de 200 células com microscopia óptica de contraste de fase. Os touros foram classificados segundo as avaliações clínicas e espermáticas para efeito de seleção para monta natural, segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4] em 1998.

O ambiente foi monitorado, diariamente, para as temperaturas mínimas e máximas; e umidade relativa do ar às 9:00 horas, utilizando um termômetro de máxima e mínima; e um psicrômetro, respectivamente. No recinto de avaliação dos touros, foi utilizado um termômetro de globo portátil digital (modelo HT-30).

A umidade do ar foi expressa como pressão parcial de vapor, calculada a partir dos registros de temperatura do bulbo úmido e do bulbo seco, segundo a fórmula usual:

$$P_p \{t_a\} = P_s \{t_u\} - \gamma (t_a - t_u), \text{ kPa},$$

Em que $P_p \{t_a\}$ é a pressão parcial de vapor à temperatura t_a de bulbo seco, kPa; $P_s \{t_u\}$ é a pressão de saturação à temperatura t_u de bulbo úmido, calculada pela seguinte equação: $0,61078 \times 10^{(7,5t_u/(t_u+237,5))}$; γ é a constante psicrométrica para a temperatura t_a , obtida em tabela de características do ar; t_a é a temperatura de bulbo seco, °C; t_u é a temperatura do bulbo úmido, °C.

O índice pluviométrico e a insolação foram obtidos respectivamente por meio de pluviômetro e heliógrafo, instalados na estação meteorológica da UNOESTE, Presidente Prudente-SP. Os ejaculados foram centrifugados a 1500g por 15 minutos, separando e estocando 1mL do plasma seminal em criotubos de 2mL, identificados e armazenados a -196°C em nitrogênio líquido até a extração das proteínas, conforme Laemilli [16] em 1970 e quantificação das mesmas segundo Bradford [3] em 1976. Posteriormente, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em Cuba de Eletroforese Vertical ligada à Fonte de Eletroforese com voltagem de zero a 1000W (50V x 50 mA por 30 minutos; e 300 V x 16 mA por 12 horas). A revelação das bandas proteicas foi feita em solução a 2% de “Coomassie blue” R-250 até a visualização das mesmas, com posterior utilização de transminador permitindo a captura, visualização e o processamento de imagens de bandas proteicas reveladas nos géis.

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2x2, com os fatores raças (Zebuínos e Taurinos) e estações climáticas: estação chuvosa (verão e primavera) e estação seca (outono e inverno). Os dados foram avaliados pela análise de variância e posteriormente aplicados ao teste de Tukey, a 5%, conforme Banzato & Kronka [1] em 2006. A análise foi realizada por meio do “software” SAS [22].

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE em 08/11/2011, sob o protocolo 909.

Resultados

Com relação às variáveis estudadas relativas à morfometria testicular, em touros zebuínos e taurinos, na estação chuvosa e seca, foram obtidas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre taurinos e zebuínos para: Comprimento do testículo esquerdo (TEC), Largura do testículo esquerdo (TEL), Epidídimo esquerdo (EPE) e Epidídimo direito (EPD) nas duas estações avaliadas. Houve também diferença ($p < 0,05$) para: comprimento do testículo direito (TDC) na estação seca, sendo maior para os taurinos (Tabela 1).

Os comprimentos testiculares dos lados direito (TDC) e esquerdo (TEC) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) nos taurinos na estação seca. Entre zebuínos e taurinos, o comprimento testicular foi superior para os zebuínos na estação chuvosa. Observa-se que o eixo do comprimento testicular apresentou variação significativa entre taurinos e zebus em estações específicas. O eixo do comprimento testicular nos taurinos diferiu ($P < 0,05$) entre as estações, sendo superior na estação seca.

Para o volume testicular (VT) empregou-se a expressão: $VT = 0,0396 \times (\text{média do comprimento dos testículos}) \times (\text{perímetro escrotal})$, obtendo para os taurinos um $VT = 460,14 \text{ cm}^3$ na estação chuvosa e $VT = 571,26 \text{ cm}^3$ na estação seca. Com relação aos zebuínos, na estação chuvosa o VT foi de $524,75 \text{ cm}^3$ e de $515,13 \text{ cm}^3$ na estação seca. Verificou-se um aumento do VT nos taurinos na estação seca e nos zebuínos na chuvosa.

Com relação à largura dos epidídimos, não houve diferença ($p < 0,05$) entre as estações tanto para os taurinos quanto para os zebuínos (Tabela 1).

LOCAL PARA INSERIR A TABELA 1.

Para as características quantitativas e qualitativas do sêmen, houve diferenças significativas entre taurinos e zebuínos, nas estações chuvosa e seca, para: volume (VOL), turbilhão (TURB), motilidade (MOT), vigor (VIG), concentração (CONC), defeitos maiores (DEMA), defeitos menores (DEME) e defeitos totais (DETO) (Tabela 2).

Os taurinos apresentaram valores significativos de maiores ($P < 0,05$) em relação aos zebuínos para volume do ejaculado, defeitos maiores dos espermatozoides, nas estações chuvosa e seca.

Os zebuínos apresentaram valores maiores ($P < 0,05$) em relação nos taurinos para turbilhão, motilidade, vigor e concentração, nas estações chuvosa e seca.

LOCAL PARA INSERIR A TABELA 2.

Com relação aos géis da eletroforese, observa-se a presença em 100% das amostras das bandas protéicas de 14 kDa, 21 kDa e 65 kDa nas duas estações avaliadas. A banda de 30 kDa esteve presente em 100% das amostras no gel 1 para ambas as estações e as subespécies estudadas. A banda de 179 kDa esteve presente em oito das 14 amostras avaliadas (gel 2), sendo visualizada em seis amostras provenientes dos Zebuínos e em duas nos Taurinos. Verificou-se que os pesos moleculares das bandas identificadas nos géis variou entre 4 kDa e 205 kDa.

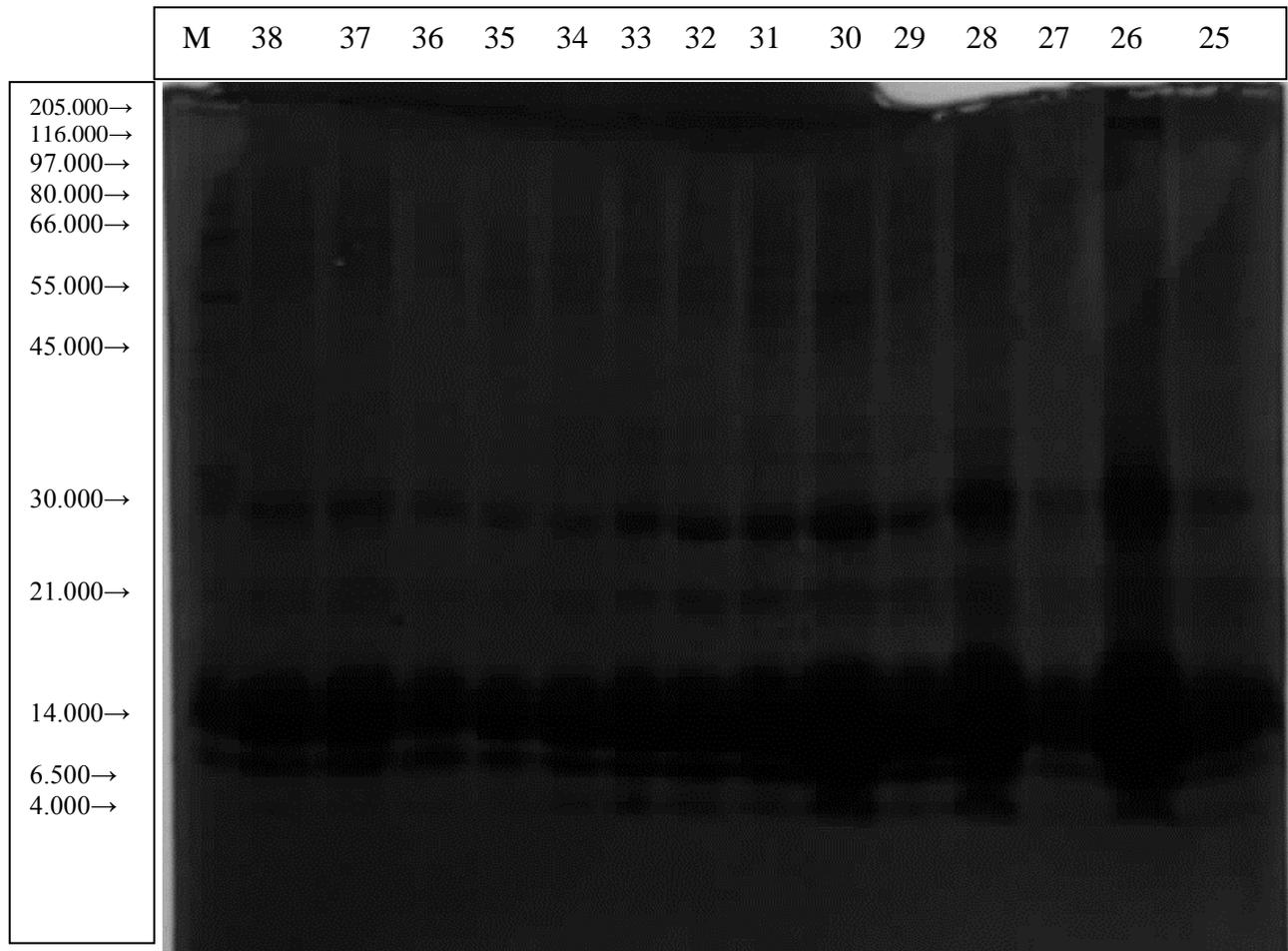


Figura 1 - Gel de eletroforese em SDS-PAGE de amostras de plasma seminal em touros Zebuínos e Taurinos. Taurinos: amostras (25, 26, 37 e 38) estação seca, Zebuínos: amostras (27 a 31) estação chuvosa e (32 a 36) estação seca.

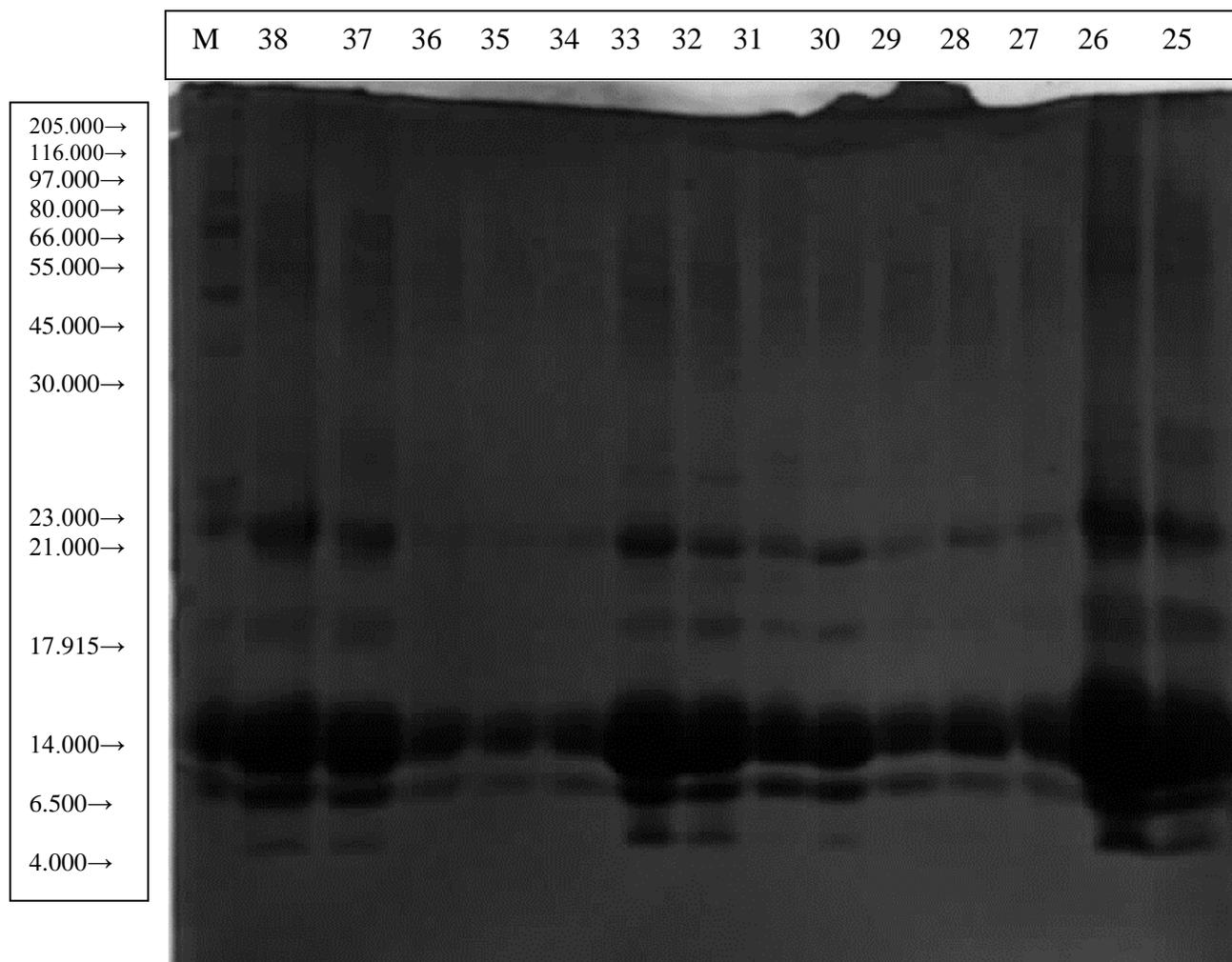


Figura 2 - Gel de eletroforese em SDS-PAGE de amostras de plasma seminal em touros Zebuínos e Taurinos. Taurinos: amostras (1, 2, 11 e 12) estação chuvosa, Zebuínos: amostras (15 a 19) estação chuvosa e (20 a 24) estação seca.

Discussão

As diferenças significativas ($P < 0,05$) observadas entre taurinos e zebuínos para TEC, TEL, EPE e EPD nas duas estações avaliadas estão relacionadas com a origem genética distinta dos grupos utilizados, zebus e taurinos. O eixo do comprimento testicular apresentou variação significativa entre taurinos e zebuínos em estações específicas podendo tal variação estar relacionada com a adaptação e plasticidade anatômica dos testículos perante as distintas estações analisadas, onde nos zebuínos o maior eixo do comprimento se faz presente na época chuvosa, possibilitando uma maior facilidade do testículo em realizar trocas de temperatura

com o meio ambiente devido as variações na volumetria testicular. A elevação do VT nos taurinos na estação seca pode ter contribuído para a redução dos defeitos espermáticos menores e maiores (Tabela 2), resultando na melhoria da qualidade do sêmen. Para os zebuínos a elevação do VT ocorreu na estação chuvosa, onde foi observada elevação dos defeitos menores e maiores dos espermatozoides (Tabela 2).

Chacur et al. [7] em 2010a e [8] 2010b relataram que em reprodutores bubalinos submetidos a temperatura de 39°C em ambiente controlado e umidade do ar entre 60 e 95%, a espermatogênese se manteve equilibrada com pequena percentagem de espermatozoides defeituosos.

O volume do ejaculado está relacionado com diversos fatores, dentre eles o tamanho das glândulas sexuais acessórias, às quais são anatomicamente maiores nos animais de origem taurina, colaborando com uma expressiva parte do volume seminal. Para os animais zebuínos e taurinos houve redução ($P < 0,05$) na porcentagem de defeitos maiores e totais na seca. Possivelmente a menor temperatura ambiente e a menor umidade relativa do ar influenciaram nas características do sêmen.

Dentre as características do sêmen, a motilidade espermática na estação seca para os taurinos e os defeitos espermáticos totais na estação chuvosa para esse mesmo grupo de animais, mostraram-se como pontos de estrangulamento dentro da análise do espermograma, sugerindo especial atenção para os mesmos quando da seleção de touros para fins de monta natural.

Segundo a literatura a banda protéica de 14 kDa é responsável pela maturação do espermatozóide, colaborando para o aumento da fertilidade, segundo Einspassier et al. [12]. A banda protéica de 21 kDa, segundo Barrios et al. [2] pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermáticas após choque térmico pelo frio, além de atuar como antioxidante, colaborando com a fertilidade.

A capacitação do espermatozóide recebe o auxílio da proteína de 30 kDa colaborando de forma positiva com a fertilidade, Ramakrishnan et al. [19]. Conforme Morani et al. [18] a proteína de 65 kDa atua de forma positiva na gametogênese masculina, sendo importante para a fertilidade. A banda protéica de 179 kDa, segundo a literatura consultada não foi descrita no plasma seminal de bovinos, onde no presente estudo foi identificada em Zebuínos nas estações seca e chuvosa. Por outro lado, nos taurinos essa banda protéica foi identificada na estação chuvosa. Provavelmente, essa proteína possa estar relacionada com a proteção dos espermatozoides nas épocas mais quentes do ano.

As BSPs são proteínas produzidas nas vesículas seminais, ricas em fibronectina tipo II e responsáveis por 70% das proteínas totais do plasma seminal de bovinos, existem três tipos de BSP sendo BSP-A1, BSP-A2, e BSP-A3 de acordo com Roncoletta [21] em 2003. Em 100% dos touros Nelore com boa qualidade do sêmen houve a presença de bandas proteicas de 13, 18 e 20KDa no plasma seminal com pesos moleculares entre 5 e 105Kda, conforme Chacur & Machado Neto [5] em 2006b. As estações do inverno e verão influenciaram no perfil proteico do sêmen em reprodutores Limousin, a qualidade do sêmen foi superior na presença simultânea das bandas de 20, 55, 66 e 80KDa nas duas estações, segundo Chacur & Machado Neto [8] sendo a proteína de 40KDa identificada, na mesma raça, em todos os reprodutores com baixa qualidade do sêmen no verão, relatado por Chacur et al. [4] em 2006a. Na raça Tabapuã, os touros produziram sêmen de boa qualidade no inverno tendo as bandas de 20, 55, 66 e 80KDa isoladas no plasma seminal, segundo Chacur et al. [7] em 2010a. Em um estudo com Pardo-Suíços, touros com sêmen de boa e má qualidade foram avaliados quanto ao perfil proteico do plasma seminal, sendo que a boa qualidade esteve relacionada com as bandas de 55 e 66Kda, descrito por Chacur et al. [9] em 2010c.

Conclusões

As estações influenciaram nas características morfológicas e do sêmen. A subespécie taurina revelou uma grande plasticidade testicular, refletida na volumetria do testículo que se reduz na estação chuvosa. Com relação à morfologia espermática, verificou-se que houve efeito significativo da estação seca, melhorando a qualidade morfológica dos espermatozoides. Para a eletroforese, verificou-se a presença de grande diversidade de bandas proteicas presentes no plasma seminal, sendo as bandas de 14, 21 e 65 kDA presentes em todos os animais das duas subespécies nas estações estudadas. Sugere-se que as três bandas proteicas encontradas em todas as amostras, provavelmente, possuam ação benéfica em relação ao quadro espermático dos touros, colaborando com a fertilidade.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e a UNOESTE pelo apoio logístico e financeiro.

Referências Bibliográficas

- 1 Banzato, D. A. & Kronka, S.N. 2006.** Experimentação Agrícola. Jaboticabal: *FUNEP*: 247.
- 2 Barrios, B., Pérez – Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño – Blanco, T. & Cebrián – Pérez, J.A. 2000.** Seminal plasma protein revert the cold-shock damage of ram sperm membrane. *Biology of reproduction*. Zaragoza, 63(1): 1531-1537.
- 3 Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.

- 4 Chacur, M.G.M., Machado Neto, N.B. & Cristancho, D.R. 2006a.** Winter-springer and Summer influence upon seminal plasma proteins in bulls. *Animal Reproduction*. 3(2): 251.
- 5 Chacur, M.G.M., Martinez, A.I.S. & Machado Neto, N.B. 2006b.** Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore *Bos taurus indicus*. *Veterinária Notícias*.12(1):87-93.
- 6 Chacur, M.G.M. & Machado Neto, N.B. 2007.** Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. *Veterinária Notícias*.13(1):47-53.
- 7 Chacur, M.G.M., Oba, E., Ferreira, J.C.P. & Velloso, N.M. 2010a.** Physiological changes occurred in buffalo bulls *Bubalus bubalis* subject to thermal stress. *Proceedings...9th* World Buffalo Congress, Buenos Aires.
- 8 Chacur, M.G.M., Oba, E., Ferreira, J.C.P. & Velloso, N.M. 2010b.** Thermal stress in buffalo bulls *Bubalus bubalis* evaluation of reproductive characteristics. *Proceedings...9th* World Buffalo Congress, Buenos Aires.
- 9 Chacur, M.G.M., Sirchia, F.P., Ruiz, A.C.L. & Guaberto, M.L.2010c.** Season influence upon seminal plasma proteins in Brown-Swiss bulls. *Reproduction, Fertility and Development*. 22(1): 310-311, 2010.
- 10 Colégio Brasileiro de Reprodução animal (CBRA). 1998.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte (2):49.
- 11 Coulter, G.H. 1988.** Thermography of bull testes. Proc. 12th. *Tech. Conf. Artif. Insemin. & Reprod.* (Natl. Assoc. Anim. Breeders). pp.58-62.
- 12 Einspanier, R. 1991.** et al. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179(2):1006-1010.
- 13 Horn, M.M., Moraes, J.C.F. & Galina, C.S. 1997.** Qualidade de sêmen de touros Aberdeen Angus e Ibagé frente à degeneração testicular experimental. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 5:356-359.

- 14 Kastelic, J., Cook, R.B., Pierson, R.A. & Coulter, G.H. 2001.** Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production and seminal quality in 129 beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Ottawa. 65:111-115.
- 15 Kodagalli, S.B. 1962.** Seasonal variation in semen characteristics and reaction time of Khillar breed. *Indian Veterinary Journal*, Madras. 39:593-599.
- 16 Laemilli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. *Nature*, London. 277:680-685.
- 17 Lunstra, D.D.; Gregory, K.E., Cundiff, L.V. 1988.** Heritability estimates and adjustment factors for effects of bull age and age of dam on yearling testicular size in breeds of beef bulls. *Theriogenology*. 30:127-136.
- 18 Morani, C.S.E., Roncoletta, M., Fransceschini, H.P., Lima, H.M.F.V., Rodrigues, H.L., Oliveira, A.M. & Silva, C. 1998.** Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações na precocidade sexual em bovinos de raça Nelore doadores de sêmen. *Brazilian Journal Veterinariae. Res. Animal Science*. São Paulo. 35(6):1015-1021.
- 19 Ramakrishnan, M., Anbazhagan, V., Pratap, T.V., Marsh, D. & Swamy, J.M. 2001.** Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Journal Biophysical*. 8(4):2215-2215.
- 20 Roncoletta, M. 2003.** Perfil Bidimensional de Proteínas de Membrana de Espermatozoides e de Plasma Seminal, relacionados com fertilidade e com a congelabilidade de sêmen de touros. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- 21 Roncoletta, M., Franceschini, P. H., Lima, V. F. M. H. Rodrigues, L. H., Oliveria, M. A. & Silva, C. 1999.** Perfil em *SDS-PAGE* das proteínas do plasma seminal e sua relação com

a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 36:109.

22 SAS. SAS/STAT User`s Guide. SAS Inst. Inc. Cary. NC, 2005.

23 VALE-FILHO, V.R. 2001. Subfertilidade em touros: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. Caderno Técnico de Veterinária e Zootécnica. Belo Horizonte. 35:81-87.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão das variáveis estudadas da morfometria do escroto e dos seus órgãos em touros criados extensivamente.

Variáveis	Animais	Estação Chuvosa	Estação Seca	P
CE	Taurino	35,03±1,71 A a	33,83±2,13 A a	0,7608
	Zebuíno	33,30±2,63 A a	34,05±2,98 A a	
P		0,3087		
TEC	Taurino	9,47±1,92 B b	12,61±1,45 A a	0,0058
	Zebuíno	11,95±1,28 A a	11,22±1,17 B a	
P		0,0089		
TEL	Taurino	7,55±0,94 A a	6,66±0,25 A b	0,0318
	Zebuíno	6,26±0,59 B a	6,32±0,49 B b	
P		< 0,0001		
TEA	Taurino	6,63±1,30 A a	6,91±0,49 A a	0,1257
	Zebuíno	6,12±0,73 A a	6,59±0,48 A a	
P		0,0864		
TDC	Taurino	9,55±1,99 A b	12,30±0,97 A a	0,0158
	Zebuíno	11,56±1,38 A a	10,86±0,97 B a	
P		0,4908		
TDL	Taurino	7,01±0,50 A a	6,66±0,60 A a	0,9391
	Zebuíno	6,34±0,65 A a	6,71±0,63 A a	
P		0,5303		
TDA	Taurino	6,49±0,56 A a	7,05±0,22 A a	0,0829
	Zebuíno	6,57±0,84 A a	6,72±0,66 A a	
P		0,5303		
EPE	Taurino	4,14±1,91 A a	3,08±0,65 A b	0,0760
	Zebuíno	3,00±0,65 B a	2,96±0,43 B a	
P		0,0437		
EPD	Taurino	3,92±1,73 A a	3,41±0,56 A a	0,5522
	Zebuíno	2,92±0,56 B a	3,10±0,55 B a	
P		0,0227		

A, B - Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ($p < 0,05$); a, b - Letras minúsculas diferentes na mesma linha ($p < 0,05$).

EC - Estação Chuvosa; ES - Estação Seca; CE - Circunferência Escrotal; TEC - Comprimento do Testículo Esquerdo; TEL - Largura do Testículo Esquerdo; TEA - Altura do testículo Esquerdo; TDC - Comprimento do Testículo Direito; TDL - Largura do Testículo Direito; TDA - Altura do Testículo Direito; EPE - Epidídimo Esquerdo; EPD - Epidídimo Direito.

Tabela 2 – Médias e Desvios padrão para as características quantitativas e qualitativas do sêmen em touros, criados extensivamente.

Variável	Animais	Estação Chuvosa	Estação Seca	P
VOL	Taurino	12,39±2,57 Aa	10,66±3,82 A a	0,3954
	Zebuíno	7,12±3,79 B a	7,20±3,09 B a	
P		<0,0001		
TURB	Taurino	1,07±0,98 B a	0,40±0,16B a	0,2495
	Zebuíno	1,60±1,46 A a	1,63±1,55A a	
P		0,0234		
MOT	Taurino	61,42±13,50 B a	52,50±14,74 B a	0,0869
	Zebuíno	76,00±7,88 A a	74,50±8,25 A a	
P		<0,0001		
VIG	Taurino	3,21±0,42 B a	3,00±0,63 B a	0,2085
	Zebuíno	3,70±0,65 A a	3,50±0,51 A a	
P		0,0037		
CONC	Taurino	154,50±118,75 B a	112,83±41,11 B a	0,9372
	Zebuíno	200,70±76,98 A a	236,10±196,68 A a	
P		0,0368		
DEMA	Taurino	18,75±7,48 A a	10,33±3,72 A b	0,0001
	Zebuíno	10,94±6,85 Ba	5,86±2,15 B b	
P		0,0004		
DEME	Taurino	17,10±5,03 A a	18,00±6,38 A b	0,0337
	Zebuíno	18,30±8,63 B a	9,56±3,30 B b	
P		0,0497		
DETO	Taurino	35,85±8,22 A a	28,33±7,00 A b	<0,0001
	Zebuíno	29,30±9,58 B a	15,47±3,72 B b	
P		<0,0001		

A, B - Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ($p < 0,05$); a, b - Letra minúsculas diferentes na mesma linha ($p < 0,05$). VOL - Volume; TURB - Turbilhonamento; MOT - Motilidade; VIG - Vigor; CONC - Concentração; DEMA - Defeitos Maiores; DEME - Defeitos Menores; DETO - Defeitos Totais.