

**EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFÍL PROTÉICO DO PLASMA SEMINAL E
INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO NO QUADRO ESPERMÁTICO EM TOUROS DA
RAÇA TABAPUÃ (*Bos taurus indicus*).**

ANDREA MARISOL NOVOA CASTILLO OLIVEIRA

**EFEITO DA SAZONALIDADE NO PERFÍL PROTÉICO DO PLASMA SEMINAL E
INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO NO QUADRO ESPERMÁTICO EM TOUROS DA
RAÇA TABAPUÃ (*Bos taurus indicus*).**

ANDREA MARISOL NOVOA CASTILLO OLIVEIRA

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

Área de Concentração: Reprodução animal
Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

636.291
O48e

Oliveira, Andréa M. N. C.O

Efeito da sazonalidade no perfil protéico do plasma seminal e influência do probiótico no quadro espermático em touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) / Andréa Marisol Novoa Castillo Oliveira. – Presidente Prudente: [s.n.], 2007.

82 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2007.

Bibliografia

1. Tabapuã (Zebu). 2. Probióticos. 3. Proteínas plasma seminal. 4. Eletroforese. I. Título.

ANDREA MARISOL NOVOA CASTILLO OLIVEIRA

Efeito da sazonalidade no perfil protéico do plasma seminal e influência do probiótico no quadro espermático em touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*)

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

Presidente Prudente, 19 de dezembro 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Marcelo George Mungai Chacur (Orientador)
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof^a. Dra. Eunice Oba
FMVZ- UNESP- BOTUCATU

Prof^a. Dra. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

DEDICATORIA

Aos meus pais

Ligia Maria e Germán Enrique

Dedico minha vida, acompanhada de lutas e triunfos, que foram sempre guiados por seus ensinamentos, apoio e constante amor, prevalecendo, sempre, os valores. Este trabalho pertence a vocês. Obrigada!!

Agradeço ao meu orientador

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

Pela constante orientação, colaboração e incentivo, para a realização deste grande sonho, e pela paciência e dedicação que sempre me ofereceu.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de fortaleza, amigo incondicional, que me enviou o menino Jesus, para lembrar-me sempre, que nada é impossível a quem nele crê e nele tem fé.

À meu esposo Giovanni, um protetor maravilhoso, um amigo compreensivo, um companheiro de causa e de vida, o responsável por eu estar realizando um dos maiores sonhos, um anjo que Deus colocou no meu caminho. Amo-o eternamente, pois você é a minha família, minha força e meu guia neste caminho desconhecido.

À Meu filhinho Felipe, tão esperado, que mudou nossa vida, e que é o maior incentivo e prova do amor de Deus, por quem tenho um motivo a mais para viver, sentir, ser feliz e continuar na luta da minha vida. Eu o amo muito, meu neném..!!!

À meus irmãos Germán, Fabio, Margarita, e cunhados Adriana, Javier e Diana, por fazerem parte

desta conquista e pelas palavras de força nos momentos de saudade e luta.

A meus sobrinhos Juliana Paola e Javier Alejandro, mesmo não entendendo, ainda, a vida, com seu sorriso e inocência, fazem tornar a vida mais simples.

Agradeço, imensamente, à Pró-Reitora de pesquisa e pós-Graduação, Profa. Dra. Maria de Lourdes Zizi Trevisan, pela constante colaboração e apoio.

Ao coordenador do Mestrado em Ciência Animal, Izidoro Francisco Sartor, por seus ensinamentos, carinho, dedicação e palavras de força.

Ao Professor Dr. Nelson pela colaboração, paciência e dedicação para o desenvolvimento do trabalho de laboratório e pesquisa.

A Professora Dra. Caliê Castilho, pelos ensinamentos e colaboração no decorrer do mestrado.

Ao Professor Dr. Paulo Eduardo Pardo, pela colaboração, apoio e por ser uma pessoa justa e honesta, o que faz com que seja, além de um professor exemplar,

um amigo. Obrigada por suas palavras sinceras e por seus ensinamentos.

Aos meus estimados professores, Dr. Damilton, Dra. Rosa, Dra. Renata e Dra. Alessandra, cada um de vocês deixou um ensinamento que se manterá no decorrer da minha profissão. Obrigada por tudo!

Agradeço ao Professor Sergio Nascimento Kronka, pelos ensinamentos de responsabilidade, cumprimento e realização da parte estatística do meu trabalho.

Aos funcionários de laboratório de informática da graduação, Eduardo, Alexander, Professor Antonio, e funcionário da pós – graduação Edson, por seus serviços, paciência e amizade.

As Professoras do laboratório de genética UNOESTE, Luciana e Ana Cristina, e Técnica do laboratório tecidos vegetais, Márcia, agradeço seu apoio, colaboração constante, paciência e amizade sincera nos momentos mais difíceis deste caminho.

As minhas companheiras de graduação, Valéria e Gabriella, por fazerem parte desta pesquisa e pela colaboração durante todo este tempo; e a meu amigo José Luís pela ajuda para a realização dos exames andrológicos. Muito obrigada!

Os funcionários do laboratório de informática, multimídia e biblioteca da Unoeste, por seus serviços e colaboração constante.

As minhas amigas de mestrado, Camila Bernar Nice, por tudo o que compartilhamos, pelos momentos de alegria, pela amizade e pelas palavras de fortaleza nos momentos de que mais necessitei, obrigada!

As Nathalia Nunes, Flavia, Clotilde, Miléia, Renilda, e Juzilene, pela força, amizade sincera e apoio constante, muito obrigada!

As minhas amigas de infância e longas caminhadas, Ana Maria e Angela Consuelo, além da distância, nossos laços sempre estão unidos em momentos. Adoro vocês!

*“O caminho da Sabedoria é
não ter medo de errar.”*

Paulo Coelho

RESUMO

Efeito da sazonalidade no perfil protéico do plasma seminal e influência do probiótico no quadro espermático em touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*)

Na década de 90, iniciou-se o estudo do perfil protéico do plasma seminal e sua relação com a fertilidade, cujo objetivo era estudar a função de cada proteína no quadro espermático, nas espécies domésticas. Na reprodução animal, outro fator relevante, para um bom desempenho reprodutivo, é a alimentação, sendo os probióticos alvo de várias pesquisas relatando o uso do mesmo para o ganho de peso e conversão alimentar. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito do inverno e verão, sobre as proteínas do plasma seminal, por meio da eletroforese SDS-PAGE e investigar a influência do probiótico no peso, perímetro escrotal e espermograma de touros da raça Tabapuã criados extensivamente. As bandas protéicas de 6 Kda (81,81% no inverno e 90,90% no verão), 9 KDa (90,90 no inverno e 72,72% no verão) e 125 Kda (81,81% no inverno e 90,90% no verão), apresentaram, nas duas estações, as maiores percentagens dentre todas as bandas identificadas, o mesmo ocorrendo com a banda de 26 KDa (100%) no verão. Conclui-se que: as estações do ano podem influenciar na presença ou ausência de proteínas do plasma seminal, entretanto isso não tem relação direta com a qualidade espermática. O probiótico não ocasionou efeito deletério no espermograma dos touros, no entanto, não demonstrou ação promotora para o ganho de peso e aumento do perímetro escrotal.

Palavras – Chave: Tabapuã (Zebu); Probióticos; Proteínas plasma seminal; Eletroforese

ABSTRACT

Season Effect in the Seminal,Proteic,Plasma Profile and the Probiotic Influence Within the Spermatic Frame In Bulls of Tabapuã Breeding. (*Bos Taurus Indicus*)

In the 90s, researchers started studying the seminal proteic plasma profile and its relationship with fertility, whose objective was to study the function of each protein within the sperma frame in domestic species. In animal reproduction, another relevant factor for a good reproductive performance is feeding, being the probiotic the goal of unnumbered researchs reporting the use of them for weight gain, and food conversion. The present work had the objective of evaluating the winter and summer effects on the seminal plasma proteins, using SDS - PAG electroforesis and investigating the probiotic influence on weight, scrotum girth and spermiogram in Tabapuã bred bulls on range breeding. The 6 Kda proteic bands (81,81% in winter and 90,90% in summer) 9 Kda (90,90% in winter and 72,72% in summer) and 125 kda (81,81% in winter and 90,90% in summer) showed, in both seasons, the largest percentages among all the identified bands, the same happening with the 26 Kda band (100%) in summer. It was concluded that the seasons of the year can influence the presence or absence of seminal plasma proteins, however this has no relationship with the spermatic quality. The probiotic has not caused deleterious effect in the bulls' spermograms, and also has not exhibited a pro-action for weight gain and increasing of scrotal perimeter.

Key Words: Tabapuã (Zebu); Probiotic; Seminal Proteins; Electrophoresis

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Proteínas do plasma seminal bovino, pesos moleculares, função, local e relação com a fertilidade.	30
TABELA 2	- Proteínas do plasma seminal bovino, pesos moleculares, função, local e relação com a fertilidade.	31
TABELA 3	- Proteínas do plasma seminal bovino, pesos moleculares, função, local e relação com a fertilidade.	32
TABELA 4	- Classificação de touros <i>Bos taurus</i> baseada no perímetro escrotal.	36
TABELA 5	- Classificação andrológica de touros <i>Bos taurus indicus</i> , baseada no perímetro escrotal.	37
TABELA 6	- Valores médios para as características de sêmen fresco de touros.	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Utilização dos Probióticos em Animais	17
2.1.1 Constituintes do probiótico Proenzime®	19
2.1.1.1 Enzimas digestivas dos probióticos: amilase, celulase, protease, lípase e pectinase	19
2.1.1.2 Bactérias utilizadas no probiótico Proenzime®	20
2.1.1.3 Microelemento zinco utilizado no probiótico Proenzime®	22
2.1.2 Uso de probióticos na espécie bovina	23
2.1.3 Efeitos dos probióticos na reprodução	24
2.2 Constituição Protéica do Plasma Seminal	26
2.2.1 Eletroforese SDS- PAGE do plasma seminal	32
2.3 Peso e Perímetro Escrotal	34
2.4 Aspectos qualitativos e quantitativos do sêmen	37
2.4.1 Coloração e aspectos do sêmen	40
2.4.2 Volume do ejaculado e concentração espermática	40
2.4.3 Motilidade espermática progressiva e vigor	42
2.4.4 Morfologia espermática	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
3 Artigos Científicos	61
3.1 Efeito da Sazonalidade sobre as Proteínas do Plasma Seminal na Raça Tabapuã (<i>Bos Taurus Indicus</i>)	61
3.2 Influência do Probiótico no Peso, Perímetro Escrotal e Espermiograma em Touros Tabapuã (<i>Bos Taurus Indicus</i>)	73

1 INTRODUÇÃO

A despeito de vários estudos relativos ao perfil protéico do plasma seminal em touros ainda, há a necessidade de uma caracterização da realidade regional, sendo importante ressaltar-se o rebanho do Oeste do Estado de São Paulo na pecuária nacional. O plantel bovino paulista soma, aproximadamente, 13 milhões de cabeças, cerca de 6% lotadas na microrregião de Presidente Prudente, exibindo a maior densidade de cabeças no estado, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1999).

A seleção de touros é um dos fatores mais importantes para o criador que deseja melhorar seu rebanho, desta forma a importância das técnicas modernas de avaliação de reprodutores devem ser consideradas para o melhoramento genético das características reprodutivas por meio do uso de sêmen de qualidade.

O exame andrológico permite avaliar machos destinados à reprodução, eliminando, do plantel, aqueles inaptos para essa finalidade.

Pela monta natural, um touro fértil deixa cerca de 120 a 400 descendentes, quando selecionado por meio da avaliação andrológica. Com a utilização da inseminação artificial, esse número ultrapassa os 100.000 descendentes, revelando a importância de se utilizar os indivíduos com características desejáveis, segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2003).

Um dos parâmetros morfométricos utilizados na seleção de touros é o perímetro escrotal (PE), facilmente mensurável e de alta repetitividade. Esse permite prever-se o potencial reprodutivo de machos jovens, por estar associado ao desenvolvimento testicular, à produção diária de espermatozóides e à puberdade (PINEDA et al., 2000; SMITH, 1989; SILVA, 1993). Fields (1979) observou maior volume testicular por unidade de peso corporal em animais precoces, com peso aproximado de 300 kg e idades entre 8 e 30 meses.

A morfologia espermática supostamente é influenciada pelos constituintes do plasma seminal, sendo o mesmo um dos responsáveis pela fertilidade observada em touros Limousin (CHACUR et al., 2004).

A partir da década 90, estudos relativos à composição do plasma seminal, visando determinar marcadores bioquímicos de fertilidade, vêm sendo desenvolvidos, para predizer o potencial reprodutivo de um animal.

A biologia molecular traz novas ferramentas para o melhoramento genético, utilizando marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos permitindo assim a seleção de genótipos superiores, para incrementar determinadas características reprodutivas de um animal (RONCOLETTA et al., 1999).

O plasma seminal serve como veículo para os espermatozóides ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções dos testículos e glândulas sexuais acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos, até o trato genital feminino, viabilizando a fertilização. De acordo com Manjunath (1987); Gasset (1997); Mortarino (1998); Einspanier (1991); Roncoletta et al. (1999); os perfis eletroforéticos do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica em casos de infertilidade em touros. Já as proteínas solúveis e estruturais têm um importante papel no metabolismo do espermatozóide, com interferência na fertilidade dos touros (KILLIAN, 1999; RONCOLETTA et al., 1999).

A proteína de 29 KDa esteve presente em 25% das amostras de plasma seminal dos animais aptos para a reprodução; e, em 75% dos touros Nelore parcialmente aptos pertencentes às variedades padrão e mocho, sendo essa proteína alvo de estudos que conferem a baixa fertilidade aos touros, quando presente no plasma seminal (CHACUR et al., 2003).

O plasma seminal, em mamíferos, contém um grupo de proteínas que se ligam aos espermatozóides, sendo conhecidas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30KDa, que possivelmente induzem alterações moleculares na membrana plasmática, essenciais para a capacitação (THERIEN, 1998; BERGERON, 2004).

Na reprodução animal, um dos fatores mais relevantes, para um bom desempenho reprodutivo, é a alimentação, sendo os probióticos alvo de várias pesquisas, relatando o uso do mesmo para o ganho de peso e conversão alimentar.

O probiótico é um suplemento alimentar que contém microrganismos vivos que produzem efeitos benéficos no hospedeiro (MOTA et al., 2006). Dentre os efeitos, esses produtos estabilizam uma população de organismos no trato gastrointestinal, mantendo o equilíbrio da microbiota intestinal e ruminal, impedindo a colonização intestinal por bactérias patogênicas, melhorando a eficiência na utilização dos alimentos (AVILA et al., 2000).

Poucos relatos se têm na literatura sobre o efeito do probiótico, na fertilidade de machos. Pesquisadores descrevem que o consumo do probiótico, contendo o microrganismo lactobacillus, pode ajudar na prevenção de metrite em vacas, no pós-parto (OTERO et al., 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Utilização de Probióticos em Animais

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida” (COPOLA; GIL-TURNES, 2004). Em algumas citações, tem sido observado o uso do termo "Direct-Fed Microbial" (DFM) em lugar do termo probiótico (ALVES et al., 2000).

A primeira informação sobre leite fermentado, influenciando a saúde humana, foi publicada por Metchnikoff (1907), pesquisador do Instituto Pasteur de Paris, após observar a longevidade de camponeses búlgaros e atribuir o fato à dieta constituída basicamente de leite fermentado. Lilly e Stillwell (1965 *apud* LODDI, 2001) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de microrganismos como promotores de crescimento.

Os probióticos são alimentos ou suplementos alimentares contendo *lactobacilos* e/ou *bifidobactéria* viáveis, administrados na dieta, com o objetivo de colonizar o intestino e promover um balanceamento entre as diferentes espécies naturais (BARRETO et al., 2003).

Os microrganismos vivos que contêm os probióticos, administrados em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; MOTA et al., 2006). Esses benefícios restringem-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SAAD, 2006).

Os probióticos estabilizam uma população de organismos no trato gastrointestinal, mantendo o equilíbrio da microbiota intestinal e ruminal, impedindo a colonização do intestino por bactérias patogênicas, melhorando a eficiência na utilização dos alimentos (AVILA et al., 2000).

O uso de organismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados, como terapia para afecções do trato gastrointestinal e, também, como estimulantes do apetite (LODDI, 2001).

“O Food and Drug Administration (FDA)” dos EUA define probiótico como uma fonte de microrganismos viáveis que ocorrem naturalmente, os quais podem ser utilizados diretamente na ração de animais (DFM: direct-fed-microbial) (LOODY, 2001).

Esses compostos são preparações de cultura de microrganismos, extratos e enzimas (GRAS - Generally Regarding As Safe), segundo o “Food and Drugs Administration (FDA) of United States”, pois não são tóxicos para os animais nem deixam resíduos tóxicos na carcaça, destinada ao consumo dos seres humanos (OYETAYO; OYETAYO, 2005).

Uma das vantagens dos probióticos parece ser a ausência do fenômeno de resistência o que representa um aspecto importante em relação aos riscos à saúde pública e à segurança dos produtos, uma vez que, atualmente, com o aumento da conscientização dos consumidores, esses têm exigido produtos alimentícios livres de medicamentos e resíduos (SANTOS et al., 2003).

Várias são as hipóteses para explicar a ação dos probióticos no trato gastrointestinal: inibição de proliferação de bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas; produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos, com redução do pH; competição por sítios de adesão na parede intestinal e por nutrientes; neutralização das endotoxinas produzidas por bactérias patogênicas; aumento da síntese de enzimas digestivas e vitaminas do complexo B e estimulante da imunidade na mucosa intestinal (ALVES et al., 2000).

Os probióticos são usados pela Medicina na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese. Na Medicina Veterinária, além dessas aplicações, podem, igualmente ser usados como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa para os antibióticos, cujo uso indiscriminado pode selecionar cepas resistentes (COPOLA; GIL-TURNES, 2004).

Quando são usados na alimentação de aves, os probióticos aumentam a eficiência alimentar, proporcionam melhor qualidade ao alimento, atuam como promotor natural de crescimento e diminuem as perdas, devido a doenças infecciosas, além de reduzirem os sintomas de estresse (LIMA et al., 2003).

2.1.1 Constituintes do probiótico Proenzime®

O probiótico Proenzime®, produzido pela Empresa Brasileira de Aumento de Produtividade Pecuária –EMBRAUPEC (Paranavaí-PR, Brasil), é composto de: Amilase 912790 UFC, Celulase 49340 UFC, Protease 121350 UFC, Lipase 37005 UFC, Pectinase 24670 UFC, *Lactobacillus acidophilus* 2.220.000.000 UFC, *Streptococcus faecium* 2.220.000.000 UFC, *Bifidobacterium thermophilum* 2.220.000.000 UFC, *Bifidobacterium longum* 2.220.000.000 UFC e Zinco 7500 mg.

2.1.1.1 Enzimas digestivas dos probióticos: amilase, celulase, protease, lipase e pectinase

Na década de 90, a área da nutrição voltou a despertar interesse por um melhor conhecimento do modo de ação e da disponibilidade de várias enzimas, que, atualmente, são produzidas com a finalidade específica de uso na alimentação animal. São as carbohidrases, proteinases e lipases que melhoram a digestibilidade de várias frações de carboidratos dos cereais, das proteínas vegetais e animais e a utilização de ácidos graxos saturados em animais jovens (BUTOLO, 2002).

Foi demonstrado que os probióticos promovem alguma digestão da celulose em aves e que diversas espécies de *Lactobacillus* secretam amilase, protease e lipase. Além disso, a redução do pH intestinal por bactérias lácticas proporciona maior absorção de ácidos graxos de cadeia curta (MENTEN, 2001).

Nos animais domésticos, a digestão de alimentos é feita por meio de enzimas no estômago e intestino delgado. As enzimas digestivas que hidrolisam proteínas são chamadas proteases e sintetizadas como zimogênios inativos no estômago e no pâncreas. A enzima pepsina digere proteínas no ambiente ácido do estômago (MAKKINK et al., 1994)

A adição de enzimas em rações para leitões recém-desmamados com amilase, protease e polissacaridase reduziu a incidência de diarreia nos mesmos (INBORR; OGLE, 1988; CHESSON, 1993).

Xu et al. (2003) verificaram aumento nas atividades da amilase e protease total do intestino delgado de frangos de corte alimentados com dieta contendo 4,0g de frutoligossacarídeos, FOS/kg de ração.

Em suínos desmamados entre 3 e 7 semanas de idade, cujas rações tinham suplementação de amilase e protease, observaram-se aumentos significativos no ganho de peso e na conversão alimentar (COLLIER; HARDY, 1986; INBORR; OGLE, 1988).

A enzima α -amilase salivar, nos suínos, atua sobre as ligações do tipo α 1,4 do amido - atividade neutralizada pelo baixo pH do estômago. A α -amilase pancreática também digere o amido no intestino, para produzir glicose, maltose e maltotriose. As gorduras são hidrolisadas a ácidos graxos, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis por uma lipase pancreática específica a ligações ésteres (HARPER et al., 1994).

Produtos enzimáticos com protease e amilase usados na alimentação de suínos têm propiciado aumentos na digestibilidade de matéria seca e de nitrogênio de rações à base de milho e farelo de soja para leitões, durante as três primeiras semanas após a desmama (EASTER, 1988).

A suplementação de amilase em rações para os leitões após a desmama melhorou a digestibilidade de amido contido nos cereais (OFFICER, 1995; ACAMOVIC e McCLEARY, 1966), enquanto a suplementação de lipase melhorou o aproveitamento de gordura pelos suínos em recria (CERA et al., 1988), e a adição de protease melhorou a digestibilidade de proteína (CORRING et al., 1978).

2.1.1.2 Bactérias utilizadas no probiótico Proenzime®

Os lactobacilos estão distribuídos por vários nichos ecológicos espalhados pelos tractos gastrointestinal e genitourinário, constituindo, de forma semelhante às bifidobactérias, uma fração importante da microflora natural. Tal distribuição é afetada por vários fatores ambientais, incluindo o pH, disponibilidade de oxigênio, o nível de substratos específicos e presença de secreções e interações bacterianas (SALMINEN, et al., 1996).

Estudos mostram que o ácido láctico produzido pela bactéria *Lactobacillus acidophilus* coloniza o intestino delgado, exercendo os efeitos benéficos, sendo o responsável pela ação imunoestimulante dos probióticos (Fooks, et al., 2003; Benyacoub, et al., 2003). Esse ácido láctico por meio de diferentes mecanismos envia sinais, para ativar e modular as células pertencentes ao sistema imunológico, requerendo muitas interações complexas entre diferentes constituintes do ecossistema intestinal (microflora, células epiteliais e células do sistema imune) (PERDIGON; RAYA, 2001; PERDIGÓN et al., 2002).

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune, produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (MENTEN, 2001).

As bifidobactérias foram isoladas, pela primeira vez, no final do século XIX, por Tissier, sendo, em geral, caracterizadas por serem microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e anaeróbios (SGORBATI et al., 1995).

Constituem um gênero de bactérias reconhecidas como adjuntos dietéticos e que possui propriedades probióticas, tais como a prevenção ou tratamento de distúrbios intestinais infecciosos (BARBOSA, et al., 2001). São semelhantes aos lactobacilos em suas propriedades culturais, exigências nutritivas e de coloração pelo Gram, mas, são anaeróbias estritas.

As bifidobactérias estão inseridas na ordem das actinomicetas, dentro do grupo das bactérias grampositivas (SGORBATI et al., 1995), e são caracterizadas por um conteúdo elevado de guanina e citosina, que varia, em termos molares, de 54 a 67%.

Um estudo recente, que avaliou 290 estirpes de 29 espécies de bifidobactérias de origem animal ou humano (CROCIANI et al., 1994), apontou a possibilidade de algumas espécies serem capazes de fermentar hidratos de carbono complexos. Os substratos fermentados pela maior parte das espécies foram D-galactosamina, D-glucosamina, amilose e amilopectina.

Segundo Bergey's Holt, (1994), essas bactérias são em forma de bastonete curvo, caracterizado, frequentemente, por uma bifurcação em forma de Y. De acordo com Samona e Robinson (1991), a aparência das colônias de *B. bifidum* varia em tamanho e forma, segundo o meio.

Além disso, as bifidobactérias fermentam açúcares com produção principalmente de ácido acético e ácido láctico. O gás carbônico não é produzido. Crescem a uma temperatura ótima de 37 - 41°C e geralmente não crescem a 45°C. O pH inicial ótimo é de 6 a 7, e, abaixo de 4,5 ou acima de 8,5, não há crescimento (SNEATH, 1986; LAROIA; MARTIN, 1990).

As bifidobactérias são prevalentes no intestino e podem prevenir a colonização por bactérias patogênicas (LIM et al., 1993).

O *B. Longum* é uma espécie que perdura ao longo de toda a vida do hospedeiro: por esse fato, essa espécie é a mais procurada para integrar alimentos funcionais (MITSUOKA, 1990).

O uso terapêutico de uma cepa de *B. longum* antibiótico-resistente foi benéfico no tratamento de doenças por radiação, por ajudar na "normalização" da microbiota intestinal, inibindo a colonização e crescimento de patógenos oportunistas. Além do mais, essa cepa tem sido usada, com sucesso, no tratamento de enterocolite úlcero-necrótica em crianças, disenteria aguda e doenças intestinais agudas de etiologia indefinida (KORSCHUNOV et al., 1996).

O *Bifidobacterium longum* igualmente possui efeitos protetores benéficos contra a invasão de microrganismos (SILVA et al., 2004; PERDIGON et al., 2003). Esses produzem ácidos, que estimulam o sistema imunológico (KIMOTO, et al., 2004), ativando a resposta imune humoral (SILVA et al., 2004). De fato, o probiótico Proenzime® possui essas bactérias, *Lactobacillus acidophilus* e o *Bifidobacterium longum*, na sua composição. Assim, pode-se afirmar que o probiótico Proenzime® adicionado ao sal mineral é um potencializador da resposta imune humoral para bovinos.

2.1.1.3 Microelemento zinco utilizado no probiótico Proenzime

O zinco é um mineral essencial para o organismo animal e participa de um grande número de processos metabólicos (MILLS, 1987). O metal é absorvido no intestino delgado, sendo transferido do lúmen intestinal para o interior do enterócito, ultrapassando a borda em escova e daí para a circulação sanguínea, em

um processo envolvendo transporte paracelular e mediado por carreadores (SALGUEIRO et al., 2000).

Segundo Tapiero; Tew, (2003), o zinco é necessário para quase 300 enzimas funcionarem adequadamente. Dentre essas estão: anidrase carbônica, Cu-Zn superóxido dismutase, carboxipeptidase A e B e fosfatase alcalina (FURLL et al., 1981).

O Zinco, por estar intimamente ligado à síntese protéica e aos hormônios em si, é extremamente importante na fase de crescimento dos animais e se torna imprescindível no desenvolvimento da puberdade, especialmente em machos. As gônadas são os tecidos que mais rapidamente crescem no organismo; e as enzimas vitais envolvidas nas sínteses de ácidos nucleicos e de proteínas são metaloenzimas zinco-dependentes (PRASAD; OBERLEAS, 1973).

Além disso, no macho, a deficiência de zinco, no período púbere, pode deprimir a produção de andrógenos (HABIB, 1978) e está ligada ao atraso no crescimento testicular, com atrofia do epitélio tubular, além de prejudicar a produção do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona e inibir a espermatogênese (SALGUEIRO et al., 2000).

2.1.2 Uso de probióticos na espécie bovina

Os probióticos agem como imunoestimulantes, aumentando a resistência dos bovinos às doenças infecciosas (LEEDLE, 2000; CHUKEATIROTE, 2000; COPPOLA e TURNES, 2004; SAAD, 2006), e na prevenção de infecções do trato reprodutivo (OTERO et al., 2006), além de atuar como promotor de crescimento e ganho de peso. Alves et al. (2004) e Jorge et al. (2006) obtiveram aumento significativo de 22% e 25%, respectivamente, no ganho de peso, em bovinos confinados.

Rasteiro et al. (2006) observaram aumento de 19,4% no ganho de peso dos bovinos, em sistema de pastejo extensivo, no período de seca, enquanto Arenas et al. (2007) observaram elevação de 33,3% no ganho de peso dos bovinos.

Segundo Löhnert et al. (1999) apud Copola. (2004), houve aumento no ganho de peso de 10% em terneiros machos suplementados com probiótico.

Para as vacas de leite, o probiótico eleva a produção leiteira (McGILLIARD e STALLINGS, 1998; WOHLT et al., 1998; DANN et al., 2000; LEEDLE, 2000; NICODEMO, 2001; NOCEK et al., 2003; OEZTUERK et al., 2005) e a porcentagem de proteína do leite (NOCEK et al., 2003).

Aumenta a ingestão de matéria seca, no início e durante a lactação, em bovinos (WOHLT et al., 1998; NOCEK et al., 2003) e também, nos períodos pré e pós-parto (NOCEK et al., 2003), mantém o equilíbrio da microbiota ruminal e intestinal, benéfica ao organismo (ÁVILA et al., 2000; LEEDLE, 2000); controla a incidência (ÁVILA et al., 2000; LOZADA, 2000; TIMMEMAN et al., 2005) e reduz a duração de diarreias (LEEDLE, 2000); minimiza o estresse (KABIR et al., 2004); recompõe e estabiliza a flora intestinal após a antibioticoterapia (SAAD, 2006) e pode ser utilizado como substituto dos ionóforos e antibióticos (DONOVAN et al., 2002; COPPOLA; TUNES, 2004; FREITAS et al., 2006).

Os resultados reportados na literatura, sobre o uso de probióticos para fins terapêuticos ou como promotor de crescimento, em bezerros, são heterogêneos, irregulares, e nem sempre positivos. A resposta do animal ao uso de probióticos é influenciada pelo tipo de probiótico, pela dose utilizada, idade e raça do animal, tipo de exploração e manejo, uso concomitante de antibióticos e o ambiente de criação (ALVES, et al, 2000).

Uma vez que os probióticos estimulam o crescimento e a atividade de bactérias benéficas, que atuam, positivamente, no sistema imune e promovem melhorias no ambiente e no epitélio intestinal, espera-se que o uso desses compostos também se reflita, de forma desejável, no desempenho animal (MAC FARLANE, 1999).

2.1.3 Efeitos dos probióticos na reprodução

Na reprodução animal, um dos fatores mais relevantes para um bom desempenho reprodutivo é a alimentação, sendo os probióticos alvo de várias pesquisas, relatando o uso do mesmo para o ganho de peso, incremento na produção de carne e de leite.

Os microrganismos probióticos, entre eles o *Lactobacillus*, podem ajudar na prevenção de metrite em vacas no pós parto (OTERO et al., 2006).

O *Lactobacillus* é considerado a primeira barreira microbiológica da infecção por patógeno do trato genital de fêmeas (OCAÑA et al., 1999b; OTERO; NADER- MACIAS, 2006).

O ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus*, a partir dos carboidratos, mantém o pH vaginal ácido (JUÁREZ- TOMAS et al., 2003) e a bacteriocina atua, de forma indesejável, no crescimento das colônias dos microrganismos patogênicos (OCAÑA et al., 1999a; LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002). Além disso, os *Lactobacillus* aumentam a influência dos hormônios, em especial dos estrógenos.

O ponto chave para os microrganismos probióticos, inibirem o crescimento de patógenos causadores de infecção dos órgãos do aparelho genital é: competição pelos receptores de adesão nas células do epitélio vaginal (OSSET et al., 2001); adesão à superfície do epitélio vaginal (ZÁRATE; NADER; MACIAS, 2006), que é essencial para a colonização dos tecidos dos órgãos do trato genital (OTERO et al., 2006), sendo essa uma barreira biológica da colonização de microrganismos patogênicos (ZÁRATE; NADER; MACIAS, 2006).

Os probióticos, principalmente por meio das modificações das populações bacterianas intestinais e de sua eficácia, dependem do *status* microbiano do rebanho e do animal individualmente, resultando na variação dos seus efeitos (SIMON, 2005).

2.2 Constituição Protéica do Plasma Seminal

As glândulas sexuais acessórias produzem plasma seminal, que serve como meio de transporte e nutrição para os espermatozoides ejaculados, consistindo numa mistura de secreções dos testículos e glândulas sexuais acessórias. Possui um importante significado fisiológico como carreador dos gametas masculinos, até o trato genital feminino, dando condições para a viabilidade do processo de fertilização (ARCE, 1979; MANJUNATH, 1987; MORTARINO, 1998; RONCOLETTA et al. 1999).

O plasma seminal é um componente essencial na cobertura natural, porque serve como transportador e protetor dos espermatozóides (HAFEZ, 2004).

Para a fecundação, é necessária uma composição apropriada do plasma seminal com a finalidade de viabilizar os processos metabólicos do espermatozóide, tanto em situações de monta natural como no congelamento do sêmen (RONCOLETTA et al., 1999).

A partir da década 90, estudos relativos à composição do plasma seminal, visando determinar marcadores bioquímicos de fertilidade, vêm sendo desenvolvidos, tendo em vista prever o potencial reprodutivo de um animal (CHACUR et al., 2006).

A biologia molecular, na área da reprodução animal, traz novas ferramentas para o melhoramento genético, a utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos, que demonstrem potencial genético de um animal cuja seleção de genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas, possa ser incrementada (RONCOLETTA et al., 1999).

De acordo com Manjunath (1987); Gasset (1997); Mortarino (1998); Einspanier (1991); Roncoletta et al. (1999), os perfis eletroforéticos do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica, em casos de infertilidade em touros. Já as proteínas solúveis e estruturais têm um importante papel no metabolismo do espermatozóide, com interferência na fertilidade dos touros (KILLIAN, 1999; RONCOLETTA et al., 1999).

O Plasma seminal contém ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos e numerosas enzimas, e constituintes antimicrobianos, incluindo-se imunoglobulinas de classe IgA, estão presentes. Além disso, uma variedade de substâncias hormonais incluindo-se andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH, semelhante à gonadotrofina coriônica, hormônio do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, hormônio liberador da tireóide e encefalinas tem sido detectada no plasma seminal (HAFEZ, 2004).

Em busca de avaliações mais criteriosas para a fertilidade, vêm sendo sugeridas provas complementares, como testes comportamentais e exames referentes à capacidade de fecundação do espermatozóide (SALVADOR et al., 2001).

Uma característica no perfil eletroforético do plasma seminal é que existem fragmentos protéicos de baixo peso molecular (PM) em abundância,

caracterizados por mobilidade relativa (M_r) 80,3 e PM aproximado de 13.000 Da, presentes em todos os animais (RONCOLETTA et al., 1999).

Estudos realizados por Bellin, Hawkins e Oyarzo (1998) identificaram, no plasma seminal bovino, algumas proteínas ligadoras de heparina (HBP) produzidas pelas glândulas acessórias. Pesquisas do sêmen reconheceram variantes da HPB de, aproximadamente, 31, 24 e 21,5 KDa, associadas ao incremento da fertilidade de touros, sendo que a proteína de maior peso molecular (31 KDa) é conhecida como o antígeno associado à fertilidade (FAA).

A heparina é uma proteína do plasma seminal dos touros, encontrada na cauda do epidídimo. Estudos têm avaliado a ação dessa proteína e outros glicosaminoglicanos nos espermatozóides, com a qualidade do sêmen e a fertilidade. O plasma seminal contém proteínas que ligam a heparina e a superfície do espermatozóide na ejaculação, potencializando a reação acrossômica (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993).

O plasma seminal, em mamíferos, contém um grupo de proteínas que se ligam ao espermatozóide, sendo conhecidas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30KDa, que possivelmente induzem alterações moleculares na membrana plasmática, essenciais para a sua capacitação (THERIEN, 1998; BERGERON, 2004).

Uma proteína de 30 KDa foi identificada em 25% dos touros Nelore aptos e em 75% dos parcialmente aptos para atividade reprodutiva (CHACUR et al., 2006). Estudo feito por Peres; Diniz (2006) descreve a diversidade de proteínas presentes no plasma seminal de touros Nelore, sendo o peso molecular variável de 14 a 97 KDa.

Peptídeos de 12, 30, 55, 66, 80, 90, e 105 Kda, quando presentes no plasma seminal, contribuem positivamente com o quadro espermático (CHACUR, et al., 2006).

Killian; Chapman; Rogowski (1993) demonstraram análises dos perfis eletroforéticos das proteínas das membranas dos espermatozóides, comparando a fertilidade de touros e encontraram associações de duas proteínas 26 KDa pI (ponto isoeletrico) 6,2 e 55 KDa pI 4,5, predominantes, com frequência, em touros com alta fertilidade; e duas proteínas de 16KDa pI 4,1 e 16KDa pI 6,7 em touros de baixa fertilidade.

Segundo Chacur et al. (2006) a proteína 26 KDa esteve presente em 25% das amostras de plasma seminal dos animais aptos para a reprodução; e em 75% dos touros Nelore parcialmente aptos, pertencentes às 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 (KILLIAN, 1999; RONCOLETA, et al., 1999; CHACUR et al., 2003).

Tedeshi (2000) identificou a proteína 26 KDa como Z13 e relatou que a mesma se liga na superfície do espermatozóide, no momento da ejaculação.

A pesquisa relata a presença dos peptídeos de 10, 16, e 26 Kda no plasma seminal, interferindo, de forma negativa, na aptidão reprodutiva (CHACUR et al., 2006).

Pesquisas realizadas não encontraram relação entre a avaliação andrológica por pontos, dos touros com o perfil protéico do plasma seminal não apresentando bandas protéicas distintas. Segundo os autores, não houve correlação da fertilidade dos touros com o perfil protéico do plasma seminal (PERES; DINIZ., 2006).

Chacur et al. (2003) estudaram a correlação da fertilidade e proteínas do plasma seminal em touros Limousin e constataram que proteínas de 55 e 66 KDa estavam relacionadas a excelente quadro espermático. No entanto as proteínas com 16 e 36 KDa apareceram, exclusivamente, no touro com pior quadro espermático.

Pesquisas feitas por Oberst et al. (2002) Identificam, em 14 reprodutores *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, a banda de 55 KDa e a banda de 66kDa, como osteopontina e albumina, respectivamente, por meio de imunoidentificação, utilizando anticorpos monoclonais específicos.

A albumina (66KDa) foi identificada em 6,6 % dos animais aptos para a reprodução; e em 33,3% dos parcialmente aptos, segundo Killian (1999). Ainda, e de acordo com Jobim; Mattos (2002), esta auxilia na gametogênese e no metabolismo das células de Sertoli.

A osteopontina (55 KDa) é uma glicoproteína ácida identificada e isolada da matriz óssea bovina, cartilagens, pele fetal, cérebro, rins, ovário e útero, bem como na urina, bile e leite bovino (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993; KERR et al., 1991). Ela foi localizada nas ampolas e vesículas seminais, mas não foi detectada no testículo, epidídimo, canal deferente, próstata e glândulas bulbo

uretrais, indicando que a proteína não se ligaria ao espermatozóide, ou teria apenas uma associação transitória com a membrana espermática (CANCEL et al., 1999).

Kilian et al. (1993); Rogowski et al. (1993) e Cancel (1999) observaram que a osteopontina seria um dos marcadores de alta fertilidade existentes no plasma seminal. Modula a função celular pelos receptores e modifica as características da membrana plasmática do espermatozóide, favorecendo a fertilidade, além de participar da capacitação espermática.

No entanto, alguns pesquisadores relatam a alta correlação entre o perfil protéico do plasma seminal e a fertilidade de touros em trabalhos com raças européias (BELIN et al., 1998; CHACUR et al., 2003).

A proteína de 29 KDa se apresentou, em 25% das amostras de plasma seminal, em touros da raça Nelore, aptos para a reprodução; e em 75% dos touros Nelore parcialmente aptos, pertencentes às variedades padrão e mocho, sendo essa proteína alvo de estudos, por supostamente conferir baixa fertilidade aos touros, quando presente no plasma seminal (CHACUR et al., 2003).

Em 100 % das amostras analisadas por Oberst et al. (2002), foram identificadas três proteínas, que apresentaram pesos moleculares entre 55 e 195 KDa e PI entre 4,5 a 7,5, com densidade óptica média de 1,22 a 2,13. A banda de 55 KDa, PI 4,5 foi imunoidentificada como osteopontina, que, na comparação entre sub-espécies, foi a única banda que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), ocorrendo maior densidade óptica nas amostras de reprodutores taurinos, em relação às amostras de zebuínos.

Segundo Killian et al. (1993), a proteína de 26KDa é idêntica e, em 86%, homóloga à do tipo lipocalin prostaglandina D Sintase (PGDS), uma das proteínas mais prevalentes em touros de alta fertilidade, e age tanto no desenvolvimento quanto na maturação dos espermatozoides.

Estudos feitos por Chacur et al. (2006 e 2007) relatam achados de bandas protéicas com pesos entre 5 a 105 KDa, estando presente em 100% dos touros da raça Nelore *Bos taurus indicus*, aptos no exame andrológico, bandas com peso de 13, 18 e 20 KDa.

Romão (2002) descreve a proteína de 13 KDa como PDC- 109, conferindo alta fertilidade aos touros, agindo, de forma direta, no metabolismo do espermatozóide. Kemme et al. (1984) citou a proteína de 20KDa como seminalplasmin, promotora de alta fertilidade, com ação antimicrobiana no sêmen.

Chacur et al. (2006) sustentam que a ação conjunta dos peptídeos do plasma seminal auxilia na espermatogênese.

Segundo Chacur; Machado Neto (no prelo), as diferentes estações do ano podem influenciar a presença ou ausência de proteínas no plasma seminal. Foi observada nos géis, presença de cadeias polipeptídicas com pesos entre 6,5 KDa e 205 KDa, no inverno, e de 14,9 KDa a 80KDa, no verão, concluindo que as proteínas de 20, 55, 66 e 80 KDa contribuíram, positivamente, para a qualidade do sêmen, sendo que a proteína 20 KDa esteve presente no inverno e no verão.

A banda de 55 KDa esteve presente em três (25%) dos 12 touros Limousin, no inverno, e dois (22%) dos nove touros, no verão, (CHACUR; MACHADO NETO, 2007).

TABELA 1 Proteínas do plasma seminal bovino, pesos moleculares, função, local e relação com a fertilidade.

AUTOR	RAÇA	PROTEÍNAS	PESO MOLEC.	FUNÇÃO	LOCAL	FERTILIDADE
VIERULA (1983)	Ayrshire	Osteopontina	85 KDa	Envolve a reação com o cálcio. Ativação do espermatozóide. Reação do acrossoma	Plasma seminal	Alta
	-----	-----	44 KDa 35 KDa 17 KDa	----- Fator desca- pacitante	-----	Baixa
KEMME et al. (1986)	-----	Seminal plasmin	20 KDa	Proteína antimicrobial do sêmen	Plasma seminal	Alta
MANJUNA TH (1987)	-----	Seminal plasmin	6 KDa	Atividade antimicrobial. Captar íons Ca ⁺² para o espermatozóide epididmal bovino.	Plasma seminal	-----
KILLIAN et al. (1993)	-----	-----	12 KDa	Afetam a motilidade do espermatozóide.	Plasma seminal	Alta
DESNOYE RS et al. (1994)	Santa Gertudis. Gelbvien Holstein	BSP -----	13 KDa	-----	Plasma seminal	Alta
ROMERO et al. (1997)	Bos taurus	PDC-109	13 KDa	Maior fosforilcolina, atase à proteína do plasma seminal do touro	-----	-----

TABELA 2 Proteínas do plasma seminal bovino, pesos moleculares, função, local e relação com a fertilidade.

AUTOR	RAÇA	PROTEÍNAS	PESO MOLEC.	FUNÇÃO	LOCAL	FERTILIDADE
GASSET et al. (1997)	Holstein	PDC-109	20 KDa	Interação com a fosforilcolina, contêm proteínas ligadoras a heparina, que se atam a superfície do espermatozóide na ejaculação.	Plasma seminal	----- -
MORANI et al. (1998)	-----	Albumina	66 KDa	Potencial gametogênico dos testículos e células de Sertoli.	-----	Alta
KILLIAN et al. (1999)	-----	Osteopontina	55 KDa	Indicadora da capacidade da fertilidade	Plasma seminal	Alta
		Prostaglandina D	26 KDa	-----	-----	-----
GATTI et al. (1999)	-----	-----	105KDa	-----	Epidídimo	-----
CANCEL et al. (1999)	Holstein	Osteopontina	55 KDa		-----	-----
BRANDON et al. (1999)	-----	SP-2	75 KDa	-----	-----	Alta
BARRIOS et al. (2000)	-----	-----	20 KDa	Pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermática, depois de serem submetidos ao choque térmico ao frio, no qual se produz a ruptura da membrana .	-----	Baixa
GERENA et al. (2000)	Holstein	Lipocalina	26 KDa	-----	Acrossoma do espermatozóide	-----

TABELA 3 Proteínas do plasma seminal bovino, pesos moleculares, função, local e relação com a fertilidade.

AUTOR	RAÇA	PROTEÍNAS	PESO MOLEC.	FUNÇÃO	LOCAL	FERTILIDADE
RONCOLETTA et al. (2000)	Gir	-----	26 KDa	Baixa fertilidade	-----	Baixa
	-----	Lactoferrina	80 KDa	Ação do acrossoma na cabeça do espermatozóide.	Plasma seminal	-----
THEDESCHI et al. (2000)	Holstein	Z-13	26 KDa 13 KDa	Ata-se à superfície do espermatozóide no momento da ejaculação.	-----	Alta
RAMAKRISHAN et al. (2001).	-----	BSP-A1	13 KDa	Capacitação do espermatozóide	-----	Alta
JOBIM et al. (2002)		Osteopontina	66 KDa	-----	Células de Sertoli, Epitélio seminal	Alta
		Albumina	55 KDa			
CHACUR et al. (2003)	Limousin	Osteopontina	55 KDa	Fertilização	Plasma seminal	Alta
RONCOLETTA et al. (2004)			44,1KDa	Fertilização	Plasma seminal	-----

2.2.1 Eletroforese SDS-PAGE do plasma seminal

O tipo de eletroforese de proteínas mais amplamente usado é o SDS-PAGE. Seu nome significa eletroforese em géis de poliácridamida, que se realiza na presença de SDS (“SDS-POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS”). Foi descrito por Laemmli (1970) um tipo de eletroforese desnaturizante, na qual as amostras são desnaturadas pelo calor, quando na presença de agentes que fazem essa função, como o beta-mercaptoetanol, que rompe as pontes de dissulfeto.

Um gel de poliácridamida é utilizado com uma matriz inerte, por meio da qual as proteínas migram. O tamanho do poro do gel pode ser ajustado, de forma que sejam suficientemente pequenas, para retardar a migração das moléculas de proteínas. As próprias proteínas não estão em uma solução aquosa, mas em uma solução que inclui um detergente forte, carregado negativamente, duodecil sulfato de

sódio (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 (ALFRENAS, 1998).

A eletroforese é uma técnica que vem sendo utilizada desde a década de 50, para mapear e identificar componentes protéicos solúveis de ejaculados, na busca de marcadores bioquímicos para 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 (MORANI, 1998; RONCOLETTA, 1999).

Sistemas de eletroforese contendo dodecil sulfato de sódio SDS "Sodium Dodecyl Sulfate "(SDS-PAGE) são usados na separação de cadeias polipeptídicas. A proteína é desnaturada por aquecimento a 100° C, na presença de β - mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT) e do detergente SDS. Mercaptoetanol e DTT reduzem as ligações dissulfídicas (S-S) por ruptura e os polipeptídios adquirem a carga negativa do SDS. A organização da cadeia peptídica, na sua estrutura terciária, é deteriorada em virtude da ação do detergente. Na eletroforese, as cadeias polipeptídicas, providas de acentuada carga negativa, proporcional ao comprimento da cadeia peptídica, migrarão com velocidades definidas apenas por diferenças de seus tamanhos moleculares (peneiramento molecular), (ALFRENAS, 1998).

O detergente de ação desnaturante SDS se une às cadeias polipeptídicas desnaturadas com uma relação de 1,4g do SDS por grama de proteína, ligando, aproximadamente, uma molécula de SDS para cada dois aminoácidos da cadeia (REINA, 2002).

A separação dos complexos SDS-proteínas é proporcional em relação à massa da proteína, uma vez que todas têm a mesma carga por unidade da massa. Proteínas marcadoras de peso molecular conhecido podem ser usadas para determinar o tamanho das moléculas de proteína da amostra. As mobilidades das proteínas, nos géis de SDS-PAGE, são funções lineares do logaritmo de seu peso molecular (COUTO et al., 1998).

A matriz funciona como um filtro separando as moléculas de acordo com o tamanho e a carga elétrica líquida que possuem, ao serem submetidas a um campo elétrico. No caso de ácidos nucleicos, o grupo fosfato é responsável pela forte carga negativa em condições de pH neutro, fazendo com que os fragmentos migrem para o pólo positivo (ânodo), durante a eletroforese. Como a carga elétrica líquida dos fragmentos é negativa, a separação ocorrerá com base no comprimento dos fragmentos. Para realizar-se a corrida de eletroforese, é preciso uma fonte elétrica de boa capacidade e qualidade. O tempo de corrida varia, naturalmente, com o tamanho do gel e a voltagem escolhida (ALFRENAS, 1998).

2.3 Peso e Perímetro Escrotal

A seleção de um touro deve abranger a avaliação da sua saúde reprodutiva e do seu desempenho para ganho de peso, por meio do exame clínico reprodutivo, avaliando as características morfofisiológicas do aparelho reprodutor, como o perímetro escrotal e espermograma (COSTA; SILVA, 1994; UNANIAN et al., 2000).

Outros aspectos que devem ser avaliados no processo de seleção de reprodutores incluem o comportamento sexual e o levantamento de doenças da reprodução, de acordo com o histórico da região e do rebanho (COSTA; SILVA, 1994).

O perímetro escrotal (PE) é facilmente mensurável e de alta repetitividade. Esse permite prever-se o potencial reprodutivo de machos jovens, por estar associado ao desenvolvimento testicular, produção diária de espermatozoides e puberdade (PINEDA et al., 2000; SMITH, 1989; SILVA, 1993). Fields (1979) observou maior volume testicular por unidade de peso corporal em animais precoces, com peso aproximado de 300 kg e idades entre 8 e 30 meses.

O tamanho dos testículos está diretamente relacionado com a capacidade de produção espermática. Touros com testículos mais desenvolvidos apresentam maior volume e maior concentração espermática no ejaculado, podendo cobrir maior número de fêmeas ou produzir maior número de doses de sêmen

quando em rotina de colheita e congelação (PEÑA; QUEIROS; FRIES, 2000; BARBOSA, 2003).

Segundo Fonseca et al. (2000), o potencial reprodutivo do touro é a soma dos fatores: idade, puberdade, qualidade do sêmen, perímetro escrotal e libido; e está devidamente suportada por condições físicas adequadas, que permitam colocarem-se em prática os processos que culminam com a monta.

Gressler et al. (2000) indicam que a seleção de touros com maior perímetro escrotal, aos 12 meses de idade, está associada aos maiores níveis de hormônios gonadotróficos, culminando com o início da puberdade; transmitindo para fêmeas e no início da atividade reprodutiva das fêmeas concepções mais precoces na primeira estação de monta e conseqüentemente antecipação do primeiro parto. Aos 18 meses de idade, a maioria dos animais já são púberes, sendo a seleção praticada para maiores perímetros escrotais, estando associado o ganho de peso.

Touros com sêmen de baixa qualidade geralmente têm baixo perímetro escrotal, que, por sua vez, tem sido relacionado com alterações nos túbulos seminíferos. Menor fertilidade ocorre em touros sexualmente maduros com hipoplasia, ou em touros com testículos pequenos, devido às lesões do parênquima testicular. O tamanho dos testículos também é indicativo de puberdade em touros jovens, associados à idade e ao peso corporal ou perímetro escrotal, ressaltando-a como a característica mais precisa e indicativa de desenvolvimento sexual em touros, relacionada com a idade do animal (SMITH et al., 1989).

Pinho (2000) afirma que o peso corporal associado ao perímetro escrotal e à qualidade do sêmen, em touros jovens, tem sido de importância para a seleção de animais com maior potencial destinado às produções quantitativas e qualitativas de sêmen e, conseqüentemente, melhor fertilidade.

Fatores ligados ao reprodutor, como idade, capacidade de produção e maturação espermática estão relacionados ao perímetro escrotal e ao peso dos testículos, além da libido, estimada pelos testes de comportamento sexual (BARBOSA, 2003).

Segundo Barbosa et al. (1991) e Freitas et al. (2000), as características físicas e morfológicas do sêmen melhoraram com o avanço da idade dos 27 aos 39 meses, correspondendo ao aumento do perímetro escrotal dos touros.

Silva et al. (2002) observaram interação entre a raça e época de avaliação, característica que também reflete o efeito da idade. A diminuição, com o

avanço da idade, das diferenças entre médias do perímetro escrotal de zebuínos e mestiços, provavelmente existe, porque o início da puberdade é mais tardio nos zebuínos.

Sugere-se que o PE, possa ser usado como característica, para se prever a quantidade e a qualidade do sêmen, porém não deve ser suficiente para aferir a fertilidade em touros (MARTINEZ et al., 2000).

Em touros de raças Tabapuã, foi encontrada correlação ($p < 0,05$) para o PE e características do sêmen: motilidade; defeitos espermáticos maiores e totais. Os animais tiveram a habilidade de expressar essas características, até mesmo jovens, em condições melhoradas de pastagem. De acordo com avaliação do aparelho reprodutor, os valores foram considerados altos, com 78.64 pontos, de acordo com a seleção “Breeding Soundness Evaluation for zebu bulls (BSE-Z)” (GONÇALVES et al., 2006).

Foi relatada a média do PE em um estudo realizado por Martinez et al. (2000), de 36,9 cm, em touros da raça Gir com idade média de $38,5 \pm 14,9$ meses. Nas raças Canchim e Nelore, selecionadas para carne, avaliadas com idade média de 39 meses, o PE foi de 34, 7 e 32,3 cm, respectivamente (BARBOSA et al., 1991).

O PE mínimo aceitável varia conforme as subespécies, raças e com a faixa etária, em que se encontra o reprodutor. “Para as subespécies “*Bos taurus taurus*”, esses parâmetros podem ser norteados conforme proposta da “Beef Improvement Federation”, 1994” (Tabela 4).

TABELA 4 Classificação de touros *Bos taurus taurus* baseada no perímetro escrotal.

IDADE (meses)	MUITO BOM (cm)	BOM (cm)	QUESTIONÀVEL (cm)
12-14	>35	30-35	< 30
15-20	>37	31-37	< 31
21-30	>39	32-39	< 32
Acima de 30	> 40	33- 40	< 33

Fonte: Beef Improvement Federation, (1994): apud CBRA (1998).

Para o *Bos taurus indicus*, a classificação, de acordo com Fonseca (1997), para touros da raça Nelore, está expressa na tabela 5. (Citado por CBRA, 1998).

TABELA 5 Classificação andrológica de touros *Bos taurus indicus*, baseada no perímetro escrotal.

IDADE (meses)	EXELENTÉ (cm)	MUITO BOM (cm)	BOM (cm)	QUESTIONÁVEL (cm)
7 a < 12	21,0	19,5 < 21,0	17,5<19,5	<17,5
12 a < 18	26, 0	24,0 < 26,0	21,5<24,0	<21,5
18 a < 24	31,5	28,5 <31,5	26,0<28,5	<26,0
24 a < 36	35, 0	32,0 < 35,0	29,0<32,0	<29,0
36 a < 48	37, 0	33,5 < 37,0	30,5<33,5	<30,5
> 48	39, 0	36,0 < 39,0	33,0<36,0	<33,0
Acima de 60	> 38	36-38	33-,36	<33

Fonte: FONSECA et al. (1997)

2.4 Aspectos Qualitativos e Quantitativos do Sêmen

A seleção de touros pela qualidade do sêmen é um fator muito importante para se obter progresso genético e maior produtividade do rebanho (HÁMORI, 1983). A avaliação da capacidade reprodutiva do macho somente se completa com o exame espermático. O método de obtenção do sêmen deve ser eficiente para que não haja contaminação, e de boa qualidade para a avaliação do animal, além disso, deve ser de fácil repetitividade e sem prejuízo para o touro, (Embrapa gado de corte 1993).

O sêmen é um líquido ou uma suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (HAFEZ, 2004).

Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos, nos testículos, as espermatídes arredondadas passam por um processo chamado espermiogênese (fase de golgi, capuchão, acrossomo e maturação) originando o espermatozoide que por sua vez é liberado durante a espermição na luz dos túbulos seminíferos (HAFEZ, 2004). O acrossoma é uma estrutura de dupla parede

situada entre a membrana plasmática, e a porção anterior do núcleo do espermatozóide (YOUNGQUIST, 1997).

As características genéticas associadas à eficiência reprodutiva dos machos é necessária, para auxiliar na identificação dos animais aptos à reprodução e geneticamente superiores. Os aspectos qualitativos e quantitativos do sêmen dos bovinos também têm sido objeto de estudo, sendo importante conhecer a magnitude do componente genético aditivo, associado a essas características reprodutivas e a suas interrelações (SARREIRO et al., 2002).

As características do sêmen, normalmente consideradas para se avaliar a qualidade da amostra, incluem aspectos físicos tais como volume, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração além dos aspectos morfológicos: defeitos maiores, menores e totais (BARBOSA et al., 1991). Essas características seminais apresentam estimativa de herdabilidade e podem ser influenciadas por fatores ambientais (SARREIRO et al., 2002).

A capacidade reprodutiva de touros também é avaliada, pelos testes funcionais, constituídos da reação acrossômica induzida e integridade do acrossoma e cromatina, que permitem identificar a funcionalidade dos testículos para produção qualitativa do sêmen (UNANIAN et al., 2000).

De acordo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), as características seminais, em valores médios para bovinos, estão representadas na tabela 6.

TABELA 6 Valores médios para as características de sêmen fresco de touros.

VARIÁVEL	VALORES MÉDIOS
Volume	5 mL
Movimento de massa	presente
Vigor	3 (1-5)
Nº total de espermatozóides	7×10^9 /mL
Motilidade espermática	70%
Espermatozóides normais	80%
Ejaculados/ semana	6-10

Fonte: (1986) Apud: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998)

Vários fatores influenciam na qualidade espermática e fertilidade dos touros, como fotoperíodo, temperatura, nutrição, sistema endócrino, individualmente ou interrelacionados, dentro das variações estacionais, provocando conseqüentemente, alterações na atividade sexual do macho (FIELDS et al., 1979).

As altas temperaturas nos testículos reduzem a qualidade do sêmen produzido, ocasionando aumento das patologias espermáticas e diminuição da motilidade, vigor e espermatozóides vivos, por deprimir a espermatogênese nos touros. Além disso, pode apresentar redução do volume do ejaculado e alteração da concentração espermática (VAN DEMARK et al, 1970; GABALDI, 2000).

Climas quentes afetam a produção espermática em ruminantes, devido à redução na taxa de crescimento corporal e testicular, influenciada pela disponibilidade nutricional. Essa baixa taxa de crescimento do testículo é acompanhada da diminuição de espermátócitos e maturação de espermátides, principalmente devido à redução da capacidade esteroidogênica das células de Leydig, levando a uma significativa queda da produção espermática (SETCHELL, 1998).

Embora vários fatores afetem as características do sêmen e o perímetro escrotal dos touros, os mais comumente considerados, nas análises, são: raça, idade e peso. Outro aspecto importante é a época do ano, em que se colhem e avaliam as amostras do sêmen (BARBOSA et al., 1991).

No Brasil, têm sido observadas variações significativas do perímetro escrotal e da qualidade espermática entre as estações seca e chuvosa, caracterizando a recuperação de um quadro degenerativo testicular, leve ou médio, ainda durante a estação de monta (Fonseca et al., 1993 apud COSTA; SILVA.,1994).

Silva et al. (1991a, b), estudaram o efeito da época do ano nas raças Nelore e Fleckvieh avaliando PE, volume, motilidade, vigor e concentração. Nesse estudo concluíram que, na época chuvosa (janeiro a maio), o volume foi de $4,5 \pm 0,37$ mL, motilidade $73,4 \pm 1,54\%$ e vigor $3,7 \pm 0,07$, significativamente maiores ($p < 0,05$) do que na seca. Mas, em contrapartida, a concentração do ejaculado $1,7 \times 10^9$ /mL mostrou-se inversamente proporcional ao volume, apresentando-se significativamente menor ($p < 0,05$) na época chuvosa.

Segundo Chacur e Machado Neto (2007), as medidas obtidas para o PE foram de $35,54 \pm 2,96$ cm no inverno e de $34,61 \pm 3,26$ cm no verão, sendo as

mesmas, classificadas como boas para a faixa etária de 21 a 30 meses, segundo normas para touros *Bos taurus taurus* (CBRA 1998), sugerindo que a maturidade sexual está mais intimamente relacionada ao peso do animal do que à idade, e sofre a influência de fatores como raça, heterose, balanceamento hormonal e manejo.

2.4.1 Coloração e aspectos do sêmen

A avaliação da coloração e do aspecto do sêmen depende, fundamentalmente, da concentração de espermatozoides e eventual presença de sangue, pús, urina, células epiteliais e detritos (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998). O aspecto do sêmen pode variar de cremoso a marmóreo, leitoso, opaco, até aquoso (ZEMJANIS, 1970).

A cor pode ser esbranquiçada, branca, marfim ou amarelada. As colorações avermelhadas, marrons e cinza escuras são indicativos de, respectivamente, sangue vivo, sangue hemolisado e sujidades. (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998).

Os ejaculados podem apresentar cor amarelada, devido à presença de riboflavina, que é inócua (HAFEZ, 2004). Segundo Chacur e Machado Neto (2007), a coloração dos ejaculados mostrou-se branco marmórea, com aspecto viscoso, em um estudo com touros da raça Limousin.

2.4.2 Volume do ejaculado e concentração espermática

O volume é expresso em mililitros (mL) e dependendo do método de colheita de sêmen. A colheita feita com vagina artificial apresenta valores mais próximos dos fisiológicos. Outros métodos eficientes para a colheita do sêmen são: eletroejaculação e massagem da ampola (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL., 1998).

Milicevic et al. (1968) *apud* Silva (2000), constataram influência direta da temperatura ambiente sobre o pH do sêmen e negativa sobre o volume e a capacidade de sobrevivência *in vitro* dos espermatozoides das raças européias. Raças zebuínas também apresentaram alteração da qualidade seminal, pH e congelabilidade, cerca de 3 semanas após serem submetidas a uma temperatura ambiente, acima de 33°C (SILVA; CASAGRANDE, 1976).

O volume pode variar, conforme o método de colheita, de 2 a 6 mL, por meio da vagina artificial, até 25 mL na eletroejaculação, em zebuínos. No entanto a variação depende, algumas vezes, do próprio animal, da eficiência da contração dos ductos deferentes e cauda do epidídimo, em resposta aos estímulos elétricos (GALLOWAY., 1974).

Em um estudo realizado por Martinez et al. (2000), em touros da raça Gir, com idade média de 38,5±14,9 meses, encontraram média de 5,16 mL de sêmen produzido por ejaculado. Esse valor foi maior que o volume produzido (4,0 mL) por touros Nelore; e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore com idade semelhante no estudo de Silva et al. (1991b). Porém o volume produzido teria sido inferior ao reportado por Chacur et al. (2006) em touros da raça Nelore, variedade padrão e mocho, respectivamente, o volume foi de 5,82±0,48 mL e 5,17±0,29 mL, inferior ao reportado por Barbosa et al. (1991), 15,2 e 13,3 mL para touros Canchim e Nelore, respectivamente, com a mesma idade dos touros Gir deste trabalho. O número de espermatozoides x 10⁶ por mL (concentração) foi muito maior (1379 x 10⁶, para o Gir; 351 x 10⁶ por mL, para o Canchim; e 361 x 10⁶, para o Nelore).

Ejaculações freqüentes resultam em volume médio menor. Desse modo, quando duas ejaculações são obtidas conseqüentemente, a segunda geralmente apresenta volume menor. O pequeno volume de sêmen não é prejudicial, mas, se acompanhado de baixa concentração espermática, a produção total declina (HAFEZ, 2004).

Segundo Chacur e Machado Neto (2007), na análise do sêmen de touros Limousin, os volumes dos ejaculados foram de 5,10±0,60 mL (inverno) e 6,22±1,86 mL (verão), superiores ao descrito por Silva (2002), de 4,0 mL e inferior aos 12 mL citados por Martinez et al. (2000), estando esse aspecto quantitativo sujeito às variações, principalmente frente ao método de colheita por meio da eletroejaculação.

A concentração espermática obtida é dada pela quantidade de células no ejaculado e pode variar com o método de colheita (menor na eletroejaculação), com a nutrição, estações do ano, raça, indivíduo, estado psíquico, além de concentrações e patologias espermáticas (GALLOWAY 1974; DEDE et al., 1983 ; SILVA et al., 1987).

A concentração varia de 2×10^8 espermatozoides por mL, em touros jovens; de $1,8 \times 10^9$ mL, em touros adultos, segundo Hafez (2004).

Nos animais de centrais de inseminação, onde a colheita é constante e regular, a produção espermática também se mantém constante (AMMAN; SCHANBACHER,1983).

Nos zebuínos a concentração normal é de 200 mil a 1,2 milhão de espermatozoides/mL, por meio do eletroejaculador; e 800 mil a 1,2 milhão de espermatozoides/mL com vagina artificial, segundo a EMBRAPA gado de corte (1993).

2.4.3 Motilidade espermática progressiva e vigor

Visconti et al. (1998) relatam que, durante o trânsito epididimário, o espermatozoide adquire motilidade progressiva. As modificações fisiológicas que conferem a capacidade fertilizante são chamadas, coletivamente, de capacitação espermática e ocorrem no trato reprodutivo da fêmea e pode estar relacionada com alterações na motilidade do espermatozoide e hiperativação.

A motilidade é expressa em porcentagem, conforme a proporção de espermatozoides que apresentam movimento, sendo uma avaliação subjetiva, que pode estar sujeita a variação na dependência do treinamento do Médico Veterinário. O valor deve expressar a porcentagem total de espermatozoides móveis. O exame é realizado em microscópio, preferencialmente binocular, com objetiva de 10 a 40X, utilizando lâmina coberta por lamínula, previamente aquecidas e mantidas a 37°C durante a avaliação (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL CBRA, 1998).

A porcentagem de espermatozóides, com motilidade progressiva, é mais bem apreciada em sêmen diluído, pois a alta concentração pode prejudicar a avaliação (EMBRAPA, 1993).

Muitos fatores influenciam a motilidade espermática. O diluidor pode alterar, levemente, a motilidade, geralmente aumentando as mensurações da velocidade. Depois da diluição inicial, uma alta porcentagem de espermatozóides pode exibir um movimento circular, que geralmente desaparece depois de 5 a 10 minutos no diluidor (HAFEZ, 2004).

A motilidade apresenta correlação com a fertilidade (SULLIVAN.,1970) e deve ser avaliada imediatamente após a colheita.

A motilidade espermática é extremadamente suscetível às condições ambientais (excesso de calor ou frio), de modo que é necessário proteger o sêmen de condições ou agentes prejudiciais antes da análise (HAFEZ, 2004).

Um animal pode apresentar baixa motilidade numa colheita, e alta, alguns dias após. Deve ser observado que a motilidade sofre o efeito da estacionalidade, seja ela representada pela temperatura, nutrição ou umidade relativa (DEDE et al., 1983; SILVA et al., 1987).

A qualidade de sêmen pode ser afetada pelas altas temperaturas. Durante a segunda semana que segue ao estresse térmico, a motilidade do sêmen e a porcentagem de espermatozóides anormais aumenta (COSTA E SILVA, 1994).

Chiquitelli Neto (2002), num trabalho realizado em touros Brangus com idade média de 14 meses, mantidos em semiconfinamento, estudou o efeito da disponibilidade de sombra sobre a qualidade seminal, encontrando uma redução da motilidade espermática dos touros mantidos sem sombreamento.

Martinez et al. (2000) relatam motilidade espermática progressiva dos espermatozóides de 59,3 %, obtida em touros da raça Gir, sendo essa ligeiramente maior que a obtida por Barbosa et al. (1991), com o sêmen dos touros Canchim (54,3%); mas inferior à dos touros Nelore (63 e 68%) encontrados, respectivamente, nos trabalhos de (SILVA et al., 1991b); e inferior, também, à reportada por Chacur et al. (2006), de $73,50 \pm 2,81\%$ e $75,62 \pm 0,97\%$ para a raça Nelore, respectivamente para as variedades padrão e mocho.

Estudo realizado revela motilidade espermática de 65,3% Silva (1993). Sarreiro (2002) relata motilidade de 62,7%. Outros pesquisadores Chacur; Machado

Neto (2007) relataram médias de $68,27 \pm 3,44\%$ (inverno) e $61,11 \pm 24,72\%$ no verão em touros Limousin.

O vigor espermático é um parâmetro de grande importância a ser avaliado nos ejaculados e representa a intensidade do movimento que acaba influenciando na motilidade progressiva dos espermatozóides (CHACUR, 1999).

O vigor do espermatozóide é dado em uma escala de 0 a 5, que representa a intensidade de deslocamento da célula no campo do microscópio. O número representa a totalidade dos espermatozóides em movimento progressivo-retilíneo, com a nota de 1 a 5, com todas as células imóveis, e 0 (zero) com ausência de espermatozóides (MILES FILHO., 1975).

Martinez et al. (2000) relatam que a média, para vigor, na raça Gir, foi de 4,9, sendo maior que as obtidas por Barbosa et al. (1991) e Silva et al. (1991b), que encontraram 3,7 para Nelore, 3,1 para o Canchim e 3,3 para os mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore; e maior, também, os valores reportados por Chacur et al. (2006) na raça Nelore, variedade padrão ($4,3 \pm 0,19$) e Mocho ($4,27 \pm 0,11$).

2.4.4 Morfologia espermática

Os espermatozóides completamente desenvolvidos são células alongadas, consistidas de uma cabeça contendo o núcleo achatado de forma oval, contendo cromatina altamente condensada, composta de ácido desoxirribonucleico (DNA). A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo situado entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça. O colo conecta-se à cabeça do espermatozóide com a cauda (flagelo), que é subdividida em peças intermediária, principal e terminal, necessárias para a motilidade celular (HAFEZ, 2004).

Para a avaliação das características morfológicas dos espermatozóides, poderão ser utilizados esfregaços corados ou preparação úmida, em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não (CBRA, 1998).

As anormalidades espermáticas alcançam 30% de herdabilidade (BRINKS, 1972) e possuem alta correlação com a taxa de fertilidade (HANCOCK, 1959).

Toda amostra de sêmen possui células espermáticas com morfologia anormal, as quais apresentam alta relação com a fertilidade dos rebanhos. O estresse térmico provoca alta incidência de espermatozoides deformados. Períodos de alta temperatura ambiente, combinados com alta umidade, podem manter um macho estéril por até 6 semanas (HAFEZ, 2004).

Segundo Velhankar (1969), a fertilidade do touro é dependente da porcentagem de células anormais no ejaculado. Por isso, o estado do sêmen é muito importante, para se conhecer a eficiência reprodutiva do touro.

As anormalidades morfológicas são classificadas, segundo Blom (1973), com base na importância dos defeitos e seus efeitos na fertilidade, em: defeitos maiores e menores. Por outro lado, Hafez (2004), classifica as anormalidades morfológicas como primárias, secundárias e terciárias. As primárias estão associadas à cabeça e ao acrossomo; as secundárias referem-se à presença de gotas citoplasmáticas na peça intermediária da cauda; as terciárias relacionam-se com outros defeitos da cauda.

Chacón (2001) observou, em touros zebu de diversas raças, maior percentual de gota citoplasmática proximal no ejaculado de touros com idade inferior a dois anos e, em touros considerados inaptos para a reprodução.

Segundo Martinez (2000), a porcentagem de defeitos totais em touros Gir foi cerca de 13 % inferior ao observado por Silva et al. (1991), que encontraram cerca de 28% no Nelore e 31 % nos mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore, quando estes tinham média de idade de 48 meses.

Chacur et al. (2006) relatam, médias para a raça Nelore para a morfologia espermática, nas variedades padrão e mocho, de 5,06% e 5,32% para os defeitos maiores; 9,91 e 8,36 para os defeitos menores; e, para os defeitos totais, 14,76% e 13,82%, respectivamente.

Barbosa et al. (1991) indicaram porcentagem de defeitos totais de 16,5% e 13,9 % para o Canchim e Nelore, respectivamente, com média de idade de 39 meses.

Os defeitos espermáticos que mais contribuíram para o total de espermatozoides anormais, na época chuvosa, foram os de cabeça (22,7%) e cauda (32,7%) nos mestiços; e cabeça (18,5%), cauda (32,9%) e gota citoplasmática distal (24,2%) nos Nelore. Na época seca, a gota citoplasmática distal (66,3%) se destacou nos Nelore; e os defeitos de cauda foram de 41,6% nos mestiços (SILVA, et al., 1991b).

As porcentagens para a morfologia espermática, no período de inverno e verão, foram de $20,96 \pm 3,26\%$ e $8,2 \pm 5,5\%$ para os defeitos maiores; e de $6,18 \pm 3,24\%$ e $21,80 \pm 12,20\%$ para os defeitos menores (CHACUR; MACHADO NETO, 2007).

Em touros da raça Gir, selecionados para leite, quando comparados com os apresentados na literatura em touros selecionados para carne, avaliados em idades semelhantes, sugerem ligeira superioridade para o sêmen do Gir, visto que apresentaram menor porcentagem de defeitos, maior concentração, melhor vigor e maior motilidade. Este fato pode ser explicado pela média da circunferência escrotal de 36,9cm, sendo superior em relação aos touros selecionados para carne (MARTINEZ et al., 2000).

A baixa temperatura ambiente pode ser uma das causas da alta incidência de defeitos maiores no período de inverno. A morfologia espermática, supostamente, é influenciada pelos constituintes do plasma seminal, sendo o mesmo um dos responsáveis pela fertilidade observada em touros Limousin (CHACUR et al., 2003; 2004) e Nelore (CHACUR et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAMOVIC, T.; McCLEARY, B.V. Optimizing the response. **Feed Mix**, v. 4, n. 4, p. 14-17. 1996.
- ALFENAS, C.A. **Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998.
- ALVES, P.A.P.M. et al. Uso de probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Sacharomyces cerevisiae* na dieta de vitelos bovinos:: efeitos sobre o desempenho e a qualidade da carne. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 416 - 422, 2000.
- AL-SOMAI, N. Anionic and Cationic Components From Protein Aggregates in Bovine Seminal Plasma and Their Effects on Sperm Motility. **Biological Sciences**. New Zelanda, v. 39, p. 328-336 mar. 1994.
- ARCE, R.D.D. **Introdução à anatomia e fisiologia animal**. São Paulo: Nobel 1979 Cap. 12. Sistema reprodutor masculino
- ARENAS, S.E. et al. Efeito do probiotico proenzime® no ganho de peso em bovinos. **Arch Zoootec**. v. 56, n. 213, p. 75 - 78, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). Manual de Inseminação Artificial. São Paulo, 2003. 42 p.
- AVILA, F.A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arq. Bras.de Med. Vet. E Zootec**. v. 52, n. 1, p. 41-46, 2000.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola**. 3.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 44 p.
- BARBOSA, F.F.H., et al. Perfil de Susceptibilidade Antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46. **Rev. de Biol. e Ciên. da Terra**. v. 1. n. 2, 2001
- BARBOSA, R.T. et al. Biometria testicular e aspectos do Sêmen de Touros da s raças Cachim e Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim**. v. 15. n. 3. p. 159-170, 1991
- BARBOSA, R.T. **Criação de Bovinos de Corte na Região Sudeste**. Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoSudeste/reproducao.htm>. Acesso em: 01/07/2003.
- BARRETO, M. G. P; SILVA. N ;SILVA.E.N;BOTELHO, L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Braz. Food Technol**, v.6, n. 1, p.119-126, 2003.

BARRIOS, B. et al. Seminal plasma protein revert the cold-shock damage of ram sperm membrane. **Biology of reproduction**, Zaragoza, v. 63, n. 1, p.1531-1537, 2000.

BELLIN, M. et al. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin binding protein in sperm membranes and seminal fluid. **Journal Animal Science**. Kinsville, v. 72, p. 2441–2448, 1994.

_____. Fertility- associated antigen bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**. v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BENYACOUB, J.; CZARNECKI-MAULDEN, G.L.; CAVADINI, C.; SAUTHIER, T.; ANDERSON, R.E.; SCHIFFRIN, E.J.; VON DER WEID, T.. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. **J Nutr**. v. 133, p. 1158-1162, 2003.

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. **Abstracts...** Belo Horizonte; Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v.1, p. 226.

BERGEY'S HOLT, J.G. **Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nor. Veterinaemed.**, v. 25, n. 77-78, p. 383-391, 1973.

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

BRINKS, J. S. Herdability of fertility components in beef bulls. **A. I. Digest.**, v. 20, n. 10, p. 6-7, 1972.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de Ingredientes na alimentação animal**. Campinas, SP: Colégio brasileiro de nutrição animal, 2002. Cap. 6. Aditivos. p. 299-364.

CALVETE, J. J. et al. Characterization of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. **Febs Letters**, Vapencia, v. 3, p. 260-264, 1999.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton Fertility- Associated Protein in Holstein Bull Seminal plasma. **Biology of reproduction**, Valencia, v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CANCEL, A.M. et al. osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Byology of Reproduction**. v. 60, p. 454-460, 1999

CERA, K. R.; MAHAN, D.C., REINHART, G.A. Weekly digestibilities of diets suplement with corn oil, lar or tallor by weanling swine. **Journ. Anim. Scien.** v. 66, n. 6 p. 1430- 1437, 1988.

CHACÓN, J.C. Assessment of sperm morphology in Zebu bull under field conditions in the tropics. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 36, p. 91-99, 2001.

CHACUR, M. G. M. **Estresse térmico em touros Bufalinos *Bubalus Bubalis* avaliações das características fisiológicas da reprodução.** 1999. Tese de Doutorado (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHACUR, M. G. M.; RABESQUINE, M. M.; MACHADO NETO, N. B. 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.

_____. Season influence upon seminal plasma proteins in bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro, 2004 **Abstracts...** Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004, v. 1, p. 236.

CHACUR, M.G.M; MARTINEZ, A.I.S; MACHADO NETO, N. B. Perfil em SDS- PAGE do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore *Bos taurus indicus*. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2006.

CHACUR, M. G. M; MACHADO NETO, N. B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. **Veterinária Notícias**, v. 13, n. 1, 2007. (no prelo)

CHESSON, A. Feed enzymes. **Anim. Feed Sci. Techn.**, v. 45, n. 1, p. 65-79, 1993.

CHIQUITELLI NETO, M. **Efeito do sombreamento artificial no comportamento e no desempenho de touros jovens da raça Brangus.** Dissertação de mestrado, faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP, Jaboticabal - SP, 2002. 63p.

CHUKEATIROTE, E. Potencial use of probiotics. Songklanakarin. **J. Sci. Technol.** v. 25, n. 2, p. 275-282, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

COLLIER, B., HARDY, B.. The use of enzymes in pig and poultry feeds. Part 2. Results of animal trials. **Feed compouder**, v. 6, n. 2, p. 28-30, 1986.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CORRING, T.; AUMAITRE, A.; DURAND, G. Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. I. Pancreas and pancreatic enzymes. **Nutr. Metab.**, v. 22, n. 1, p. 231-243, 1978.

COSTA; SILVA, E.V. Comportamento, Manejo e Seleção de Touros Nelore In: WORKSHOP DE NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO, 1, **Palestras...** Goiânia: UFG, cd-room (1994)

COUTO, A. **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins**. Viçosa: UFV, 1998.

CROCIANI, F. et al. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, p. 199-210, 1994.

DANN, H. M. et al. Effects of yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. **J. Dairy Sci.** v. 83, p. 123-127, 2000.

DEDE, T.I.; AKPOKODJE, J.U.; ODITI, P.I. Seminal characteristics and libido of Holtstein/Friesian bulls raised in a tropical environment. **Trop. Vet.**, v. 1, p. 77-84, 1983.

DESNOYERS, L. et al. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrylamide gel electroforesis. **Molecular Reproduction and development**, Quebec, v. 37, p. 425-435, 1994.

DIAS, J.M. et al. Crystalization and preliminary X-ray diffraction Studies of a SFP, a bovine seminal plasma protein with a single CUB domain architecture, **Protein Science**, USA, v. 6, p. 725-727, Dec., 1997.

DONOVAN, D.C. et al. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or enteroguard. **J. Dairy Sci**, v. 85, p. 947-950, 2002.

EASTER, R.A. Acidification of diets for pigs. In: HARESING, W., COLE, P.J.A. (Eds.). **Recent advance in animal nutrition**. 1988. p.61-71.

EINSPANIER, R. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Gattingen, v. 179, n. 2, p. 1006-1010, 1991.

EMBRAPA GADO DE CORTE. **Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: Avaliação da capacidade reprodutiva do touro**. Campo Grande, MS em 1993. , Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc51/03avaliacaocapacidade.html>. Acesso em: 15 maio 2007.

FIELDS, M. J. Age, season and breed effect of testicular volume and semen traits in young beef bull. **Journal of Animal Science**, London, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979.

FONSECA, V.O. et al. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfofísicas do sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 2, p. 36-39, 1997.

FONSECA, O. U. et al. Potencial reproductivo e econômico de touros Nelore acasalados colectivamente na proporção de um touro para 80 vacas. **Arq. Méd. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v. 52, n. 1, fev. 2000.

FOOKS A. R; et al. Review article - European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiol. Infect**, v. 131, p. 1029-1039, 2003.

FOOD and agriculture organization of the united nations, world health organization. Evaluation of health and nutrition properties of probiotics. In: Food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acesso em: 30/11/2006.

FOUCHECOURT, S. et al. Stallion epidymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1790-1803, 2000.

FOUCHECOURT, S. et al. Mammalian lipocalin – type prostaglandin D2 synthesis in the fluids of the male genital tract: Putative Biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 468-467, 2002.

FÜRL, M.; GARLT, C.; LIPPMAN, R. **Klinische Labordiagnostik**. Leipzig: Hirzel verlag, 1981, p. 147. 1981.

FREITAS, A. R. et al. Avaliação do procedimento na estimação de parâmetros genéticos em bovinos de corte. **Rev. Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 10-22, jan. 2000.

FREITAS, J. C. F. et al. Efeito de um aditivo alimentar contendo probiótico e enzimas digestivas no ganho de peso de bovinos nelore em regime de pasto. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO ESTADO E DA REGIÃO DO PANTANAL, 4., 2006. **Anais...** Encontro de pesquisa e iniciação Científica do Estado e da Região do pantanal, 2006, p. 69-79.

GABALDI, S. H. Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal. Botucatu, 2000, 85 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ- Universidade Estadual Paulista. Botucatu, p. 85, 2000.

GALLOWAY, D.B. **Fatores que afetam a fertilidade bovina**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1979.

GASSET, M. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 250, p. 735-744, 1997.

GATTI, J. L. et al. Kilodalton protein in epididymal fluids of domestic mammals in angiotensin – I covering enzyme (ACE) evidence that sperm are the source of this ace. **Biology of Reproduction**. monnaie, v. 60, p. 937-945, 1999.

GERENA, R. L. et al. Immunocytochemical 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.

GONÇALVES, P.E. et al. **Abstracts. International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, Belo Horizonte, p.15-18, nov. 2006.

GRAHAM, T.W. Serum zinc and copper concentrations in relation to spontaneous abortion in cow: implication for human fetal loss. **Journal and reproduction and fertility**, n. 102, p. 253-262, 1994.

GRESSLER, S.L. et al. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características Reprodutivas de fêmeas Nelore. **Rev. Brás. Zootec.**, v. 29, n. 2, p. 427-437, 2000.

GREUBE et al. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. **Biochemistry**. v. 40, p. 8326-8334, 2001.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. 7.ed. Barueri, SP: Manole, 2004.

HAMORI, D. **Constitutional disorders and hereditary diseases in domestic animals**. New York: Elsevier, 1983. 728 p.

HANCOCK, G. L. The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility. **Int. J. Fert.**, v. 4, p. 347-59, 1959.

HARPER, H.; RODWELL, V.; MAYES, P. .Bioquímica. São Paulo: ATHENEU, 1994. Digestão e absorção no trato gastrointestinal. p. 254-272. 1994

IGNOTZ. et al. Characterization of a Fucose-Binding Protein from Bull Sperm and Seminal Plasma that may be Responsible for Formation of the Oviductal Sperm Reservoir. **Biology of Reproduction**, New York, v. 64, p. 1806-1811, fev. 2001

INBORR, J.; OGLE, R.B. Effect of enzyme treatment of piglets feed on performance and post-weaning diarrhea. **Swedish J. Agric. Res.**, v. 18, n. 2, p. 129-133, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (www.ibge.gov.br)- Pesquisa Pecuária Municipal, 1999.

JOBIM, M. I. et al. Albumin and osteopontin- proteins seminal plasma related with semen freezability. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**. v. 26, p. 293-305, 2002.

JONAKOVA, V. et al. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. **Mol. Reprod.**, Prage, v. 56, p. 275-277, 2001

JORGE, C.F.J.F. et al. Efeito de um aditivo alimentar contendo probiótico e enzimas digestivas no ganho de peso de bovinos Nelore em regime de pasto. In: IV ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO ESTADO E DA REGIÃO DO PANTANAL, 2006. **Anais do IV Encontro de pesquisa e iniciação Científica do Estado e da Região do pantanal**, , p. 69-79, 2006

JUÁRES - TOMÁS, M.C. et al. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. **J. med. Microbiol.**, v. 52, p. 1117- 1124, 2003.

KABIR, S. M. L. et al. The dynamics of probiotics on growth performance and immune in broilers. Int. **J. Poultry Sci.**, v. 3, n. 5, p. 361-364, 2004.

KEER, J.M. al. the cDNA cloning and RNA distribuição of bovine osteopontin. **Gene**, Amsterdam, v. 108, p.237-243, 1991.

KEMME, M. et al. Characterization of Basic proteins of bull seminal plasma. **Hoppe-seyler's Physiological Chemical Biology**, Bellin, v. 365, p. 1173-1181, Oct., 1986.

KILLIAN, G.J. The role of marker protein in reproductive efficiency. Pennsylvania. **Veterinary Science Extension**, Pennsylvania, v. 29, p. 1112-1120, 1999.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility- Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KLINFELTER, G.R. Localization of the sperm protein SP 22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 48-63, 2002.

KIMOTO H. et al. New *lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of th1-type immune response. **Microbiol Immunol.**, v. 48, n. 2, p. 75-82, 2004.

KORSCHUNOV, V.M. et al. Therapeutic use of an antibiotic-resistant Bifidobacterium preparation in men exposed to high-dose γ -irradiation. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, p. 70-74, 1996.

LAEMILLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. **Nature**, London, v. 277, p. 680-685, 1970.

LALANCETTE, C. Characterization of 80-Kilodaltons bull sperm protein identified as Ph-20. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 628-636, 2001.

LANE, M.E. et al. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine capacitation by different mechanisms. **Biology of reproduction**, Canadá, v. 60, p. 169-175, 1999.

- LARROIA, S.; MARTIN, H. Bifidobacterium as possible dietary adjuncts in cultured dairy products - a review. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 25, p. 18-22, 1990.
- LEEDLE, J. Probiotics and DFMs- Mode of action in the gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL., 2000. **Anais...** Campinas, 2000, p. 24-37.
- LEPARGNEUR, J.; ROUSSEAU. Role protector de flore de Doderlein. **J. Ginecol. Obstet. Reprod.**, v. 31, p. 485-494, 2002.
- LIMA, A.C.F. et al. Efeito do uso de probióticos sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frango de corte. **Rev. Bras. Zootec**, Viçosa, v. 32, n. 1, Jan/Fev, 2003.
- LIM, K.S; HUH, C.S.; BAEK, Y.J. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2168-2174, 1993.
- LODDI, M.M. Probioticos e Prebioticos na nutrição de aves. **Rev. CRMV. Suplem. téc**, n. 23 ,2002.
- LOZADA, A.E. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. **Enferm. Infec. Microbiol.** v. 21, n. 3, p. 106- 114, 2001.
- MAC FARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health. **BMJ**, London, v. 18, p. 999-1003, 1999.
- MANJUNATH, P. Purification and biochemical characterization of three major acidic protein (BSP-A₁, BSP-A₂, and BSP-A₃) from bovine seminal plasma. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 241, p. 685-692, 1987.
- MARTINEZ, L.M. et al. Correlação entre Características da Qualidade do sêmen e a Circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. **Rev. Bras. Zootec**. v. 29, n. 3, p. 700-706, 2000.
- MARQUES DA COSTA. D. **Criação de Bovinos**. O touro e a eficiência reprodutiva de rebanho. 7. ed. Belo horizonte: CVP-Consultoria Veterinária e Publicações. ano
- MAKKINK, C.A. et al. Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 72, n. 11, p. 2843-2850. 1994.
- MCGILLIARD, M.L.; STALLINGS, C.C. Increase in milk yield of commercial dairy herds fed a microbial and enzyme supplement. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 1353-1357, 1998.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001, p.141-157.

MILLS, C. F. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals copper, cobalt and zinc. **Journal of Animals Science**, CHAMPAIGN, v. 65, p. 1702-1711, 1987.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **Jornal of industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1990.

MORANI et al. Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações na precocidade sexual em bovinos da raça Nelore doadores de sêmen. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 33, n. 6, 1998.

MORTARINO, M. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of Bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, Milano, v. 19, p. 797-801, 1998.

MOTA, R. M. et al. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins; a tool to develop live oral vaccines. BMC. **Biotechnology**, v. 6, n. 2 p. 1-11, 2006.

NICODERMO, M.L.F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 54 p. (Documentos 106).

NOCEK, J.E. et al. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. **J. Dairy Sci.** v. 86, n. 1, p. 331- 335, 2003.

OBERST, E.R. et al. Imunoidentificação de Albumina e Osteopontina no plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos. **Semina; Ciências agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 21-28, 2002.

OCAÑA, V.S.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.A.; NADER MACIAS, M.E. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salvaricus* strain, Appl. **Environ. Microbiol.** v. 65, n. 12, p. 5631-5635, 1999.

_____. Selection of Vaginal H₂O₂- generation *Lactobacillus* species for probiotic use. **Curr. Microbiol.**, v. 38, p. 279-284, 1999.

OEZTUERK, H. et al. Influence of living and autoclaved yeast of *Saccharomyces boulardii* on in vitro ruminal microbial metabolism. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 2894-2900, 2005.

OFFICER, D.I. Effect of multi-enzyme supplements on the growth performance of piglets during the pre and post-weaning periods. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 56, p. 55-65, 1995.

OSSET, J. et al. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cell. **J. infect. Dis.**, v. 183, p. 485-491, 2001.

OTERO, M.C.; NADER- MACÍAS, M.E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂ – producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 96, p. 35-46, 2006.

OYETAYO, V.O.; OYETAYO, F.L. Potencial of probiotics as biotherapeutics agents targeting innate immune system. Afr. **J. Biotechnol.**, v. 4, n. 2, p. 123-127, 2005.
PEÑA ; C.D.O.; QUEIROS, S.A. de; FRIES, L.A. Estimação de fatores de correlação do perímetro escrotal para idade e peso corporal em touros jovens da raça Nelore. **Rev. Brás. Zootec.**, v. 29 n. 2, p. 1667-1675, 2000.

PERDIGON G. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. **Biocell**, v. 27, n. 1, p. 1-9, 2003.

PERDIGON G.; FULLER R, RAYA R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 27-42, 2001.

PERDIGÓN, G. et al. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, suppl. 4, p. 21-26S, 2002.

PERES, R.F. G.; DINIZ, E.G. Classificação andrológica por pontos e sua relação com o perfil protéico do Plasma Seminal de Touros Nelore. **Revista Horizonte Científico**, v. 1, n. 6, 2006. Disponível em:
www.propp.ufu.br/revistaeletronica/Edicao%202006_1/E/rogerio_fonseca.pdf .
Acesso em: 10/03/2006.

PINHO, T.G. et al. Características seminais de touros jovens (Nelore) *Bos taurus indicus* de acordo com a biometria e morfologia testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, p. 187-189, 2000.

PINEDA, N.R.; FONSECA, V.O.; ALBUQUERQUE, L.G. Estudo preliminar da influência do perímetro escrotal sobre a libido em touros jovens da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 4-11, fev. 2000.

PRASAD, A.S; OBERLEAS, D. ribonuclease and deoxybonuclease activities in zinc deficient tissues. **Journal of laboratory and Clinical Medicine**, oxford, v. 82, p. 461-466, 1973.

RABESQUINE, M.M.; CHACUR, M.G. M.; GARCIA, J.P. Morfometria testicular, aspectos seminais e influência do peso corpóreo Sobre a morfologia espermática na raça Limousin. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, 2003.

RAMAKRISHNAN, M. et al. Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. **J Biophys.**, v. 81, n. 4, p. 2215-25, 2001.

RASTEIRO, V.S. et al. Adição de probiótico na mistura mineral elevada o ganho de peso de bovinos no período da seca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 24 a 27 de junho de 2006, p.1-3.

REINA, M. **Métodos en biología celular**. Desenvolvida por la facultat de informàtica de Universidad de Barcelona. Disponível em: www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm. Acesso em: 15 mar. 2003.

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, may 2002.

ROMERO, A. et al. Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of Bovine Seminal Plasma PDC-109, a Protein Composed of Two Fibronectin Type II Domains. **Proteins: Structure Function, and Genetics.**, v. 28, p. 454-456, jan. 1997.

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**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 143-148, 1999.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E.. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier; successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, n. 2-4. p. 347- 358, 1996.

SALVADOR, F.D; ANDRADE, V.J; FILHO, V.R.V. Potencial das proteínas do plasma seminal ou ligadas à membrana espermática como indicadores da fertilidade de touros. **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia**, n. 35, p. 61-71, 2001.

SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 44, p. 64-66, 1991.

SANCHEZ, A. I.; CHACUR, M.G.M.; COUTINHO, N.V. Semen physical and morphological characteristics and corporal mass index of Nelore (*Bos taurus indicus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro, 2004. **Abstracts...** Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v.1, p.196

SARREIRO, L.C. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal, libido e características seminais de touros Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 602-608, 2002.

SETCHEL, B. P. Heat and the testis. **J. Reprod. Fert.**, v. 114, p. 179-194, 1998.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.E.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W. H. (eds). **The Lactic Acid Bacteria**. v.. 2. Londres: *The Blackie Academic*, 1995. p. 279-306.

SILVA, A.E.D.F. et al. Efeito da estacionalidade nas características testiculares espermiáticas de touros Nelore e mestiços. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7, Belo Horizonte, 1987. **Resumos...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 55.

SILVA, A.E.D.F. et al. Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore: características biométricas testiculares. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, n. 10, p. 1745 -1750, 1991a.

_____. Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore: características espermiáticas. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, n. 10, p. 1751-1760, 1991b.

SILVA, A. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidade e fatores que a influenciam.** Campo Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1993. (Relatório).

SILVA, R. G; CASAGRANDE, J.F. Influence of high environmental temperatures on some characteristics of zebu bull semen, In: international congress animal reproduction artificial insemination, 8, 1976. Kraków, Poland. **Proceedings...** Kraków, v. 4, p. 939-942, 1976.

SILVA, R.G. **introdução à Bioclimatologia animal.** São Paulo: Nobel, 2000. 286 p.

SILVA, A. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SILVA, A.M. et al. Effect of Bifidobacterium longum ingestion on experimental salmonellosis in mice. **J Appl Microbiol**, v. 97, n. 1, p. 29-37, 2004.

SIMON, O. Micro- Organism as Feed Aditives Probiotic. Additives Probiotic. **Advanc. in Pork Product.**, v. 16, n. 34, p. 161-167., 2005

SMITH, M. F. Estimulation of genetic parameters among soundness examination components and growth traits in pearling bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 2892-2896, 1989.

SNEATH, P.H.A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. v. 2. p 1418-1434.

SULLIVAN, J.J. Sperm numbers required for optimum breeding efficiency in cattle. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 3., Chicago, 1970. **Proceedings...** S.I.: NAAB, 1970. p.36-43.

SALGUEIRO, M.J. et al. Zinc status and immune system relationship: a review. **Biological trace Elements Research.**, v. 7, n. 3, p. 193-205, 2000.

- TAPIERO, H.; TEW, K.D. Trace elements in human physiologi and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedical pharmacolotherapy**, v. 57, n. 9, p. 399-411, 2003.
- TEDESCHI, G. et al. Purification and primary struture of a new bovine spermadhesin. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, p. 6175-6179, 2000.
- 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.
- TIMMERMAN, H.M.; MULDER, L; EVERTS, H. et al. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 2154-2165, 2005.
- UNANIAN, M. M. et al. Características Biométricas Testiculares para Avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 29, n.1, p. 136-144, 2000.
- VAN DEMARK, N.L.; FREE, M.J. Temperature effects. In: JOHNSON, A.D; GOMES, W. R. **The testis**. 1ed. New York:: **Academic press**, 1970. v. 3. p. 233-312.
- VELHANKAR, D.P. **The normal and abnormal sperm morphology**. In: FAO-SWEDISH INT. POSTGRADUATE VET. COURSE IN ANIMAL REPRODUCTION, 8., Stockholm: Royal Vet. College, 1969. 10p.
- VIERULA, M. et al. Effect of seminal plasma and calcium on the stability of the surface protein composition of ejaculated bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 15, p. 435-445, 1983.
- VISCONTI, et al. Regulation of protein phosphorilation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 59, p. 1-6, 1998.
- WEMPE, F. et al. Seminalplasmin the major basic protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of the seminal vesicle. **Biochimica Biophysical**, v.1034, n. 3, p. 260-262, 1990.
- WOHLTH, J.E.; CORCIONE, T.T.; ZAJAC, P.K. Effect of yeast on feed intake and performance of cow fed diets based on corn silage during early lactation. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 1345 - 1352, 1998.
- XU, Z.R. et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poult. Sci., Savoy**, v. 82, n. 6, p. 1030-1036, 2003.
- YOUNQUIST, R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 1997

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M.E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cell. *Appl. Microbiol.* v. 4, p. 174-180, 2006.

ZEMJANIS, R. **Diagnostic and therapeutic techniques in animal reproduction.** 2.ed. Baltimore: Williams Wilkins Co., 1970. 242 p.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE AS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL NA RAÇA TABAPUÃ (*Bos taurus indicus*)

SEASONAL EFFECT UPON SEMINAL PLASMA PROTEINS IN TABAPUA BREED (*Bos taurus indicus*)

Oliveira, A.M.N.C. ^{1*}, M.G.M.Chacur. ², G.B. Godoy³, V.S. Gandolfo³,
N.B. Machado Neto⁴, S.N. Kronka⁴ e M.L. Guaberto⁵

¹ Discente do Curso de Mestrado em Ciência Animal - UNOESTE

² Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias - UNOESTE,
Rod. Raposo Tavares, km 572, cep: 19067-175, Pres. Prudente-SP, Brasil

³ Discentes do Curso de Graduação em Medicina Veterinária – UNOESTE

⁴ Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Ciências Agrárias - UNOESTE

⁵ Discente do Curso de Mestrado em Agronomia – UNOESTE

*Autor para correspondência: E-mail: chacur@unoeste.br

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Touro zebu, líquido seminal, estação do ano, SDS-PAGE.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da sazonalidade, inverno e verão, sobre as proteínas do plasma seminal em touros Tabapuã. Foram colhidas amostras de sêmen de 11 animais com 30 meses de idade, por eletroejaculação, durante o inverno e o verão, com 120 dias de intervalo, em um total de 22 amostras. Os ejaculados foram centrifugados a 1.500 g / 15 minutos e 1mL do plasma seminal de cada amostra foi estocado em microtubo e armazenado a -20°C. A extração de proteína foi realizada com a utilização de tampão composto por 6,25 mM Tris HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 5% SDS, 2% mercaptoetanol e água destilada (13,6 mL) na proporção 1:5 9 (v:v). As proteínas foram quantificadas e as eletroforeses realizadas. Os géis foram fixados em isopropanol: ácido acético: água e revelados em ácido acético 10%, com 2% de Coomassie blue R-250, até a visualização das bandas. Em cinco touros, a ausência de proteínas de alto peso molecular (APM 55 KDa, 66 KDa e 80 KDa) foi verificada no verão; e uma que se supõe ser de baixa fertilidade (BF 40 KDa) presente em dois touros, no inverno e verão. Sete touros mostraram presença de proteínas de APM (55 KDa) no inverno. Em três touros, a proteína APM (55 KDa) e, em um animal, as proteínas APM (66 KDa e 80 KDa) estiveram presentes com uma condição satisfatória de sêmen. Oito touros mostraram presença de proteínas APM (125 KDa) no inverno e verão. Sugere-se que as diferentes estações do ano podem influenciar a presença ou ausência de proteínas no plasma seminal.

ABSTRACT –

The objective of this work was the evaluation of seasonal effect, winter and summer, upon seminal plasma proteins in Tabapuã bulls. Semen samples of 11 animals with 30 months old were collected with electroejaculation, during winter and summer, at 120 days intervals in

a total of 22 samples semen. Samples were centrifuged at 1.500 g / 15 min and conditioned in eppendorf tubes and stored at -20°C until further processing. The Proteins were extracted from 200 μL of each sample in 2 mL of extraction buffer composed by 0.625 M Tris-HCl; pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol and 20% of glycerol. The protein was quantified and the electrophoresis performed; gels were fixed, in isopropanol: Acetic acid: water and stained 10% acetic acid in the same solution with 2% of Coomassie Blue R250. In five bulls the absence high molecular weight (HMW 55 KDa, 66 KDa and 80 KDa) proteins was verified in the summer the one which suppose to be of low fertility (LF 40 KDa) verified in two bulls in winter and summer. Seven bulls showed presence of HMW (55KDa) in the winter. In three bulls - HMW (55 KDa) and one animal - HMW (66 KDa and 80 KDa) proteins were present with a satisfactory semen condition. Eight bulls showed presence of HMW proteins (125 KDa) in winter and summer. It suggests that different seasons of the year may influence the presence or absence of proteins in seminal plasma.

INTRODUÇÃO

Pela monta natural, um touro fértil deixa cerca de 120 a 400 descendentes, quando selecionado por meio da avaliação andrológica. Com a utilização da inseminação artificial, esse número ultrapassa os 100.000 descendentes, quando se revela a importância de se utilizarem os indivíduos com características desejáveis, segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial – ASBIA (2003).

A biologia molecular, na área da reprodução animal, traz novas ferramentas para o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal, cuja seleção de genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas, possa ser incrementada (Roncoletta *et al.*, 1999; 2004).

O plasma seminal serve como veículo para os espermatozóides ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções do testículo e glândulas sexuais acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos até o trato genital feminino, viabilizando a fertilização. Os perfis eletroforéticos das proteínas do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica, em casos de infertilidade em touros (Manjunath; Sairam, 1987; Einspanier, et al. 1991; Gasset, et al. 1997; Mortarino, et al. 1998). Na década de 90, vários trabalhos (Killian, 1993; 1999; Killian *et al.*, 1993) relataram a presença de quatro “proteínas associadas à fertilidade”, dando início às pesquisas com proteínas do plasma seminal. Nos mamíferos, este grupo de proteínas do plasma seminal se ligam ao espermatozóide, sendo conhecidas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30KDa, que possivelmente induzem as alterações moleculares na membrana plasmática, essenciais para a capacitação (Therien, et al. 1998; Bergeron, 2004).

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da sazonalidade, inverno e verão, sobre as proteínas do plasma seminal, por meio da eletroforese SDS-PAGE em touros Tabapuã criados extensivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e local do experimento

Foram utilizados 11 touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*), com idade média de 30 meses, criados extensivamente em uma propriedade, no município de Presidente Prudente, SP – Brasil, sendo mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens*, com sal mineral e água “*ad libitum*”.

Os touros foram submetidos às avaliações clínicas e espermáticas, para efeito de seleção para monta natural, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Colheita e processamento do sêmen

Duas colheitas de sêmen foram efetuadas em todos os touros, pelo método da eletroejaculação, perfazendo 22 amostras. O intervalo entre as colheitas foi de 120 dias, sendo a primeira realizada no inverno e a segunda no verão.

Após as avaliações dos aspectos qualitativos e quantitativos do sêmen, as amostras foram centrifugadas a 1.500g por 15 minutos, e 1mL do plasma seminal separado e estocado em tubos devidamente identificados e armazenados a 20°C negativos, para a posterior realização das análises por meio da eletroforese SDS-PAGE, com extrações e quantificações das proteínas foi feita segundo Laemlli (1970) e Bradford (1976), respectivamente.

A extração de proteína foi realizada com a utilização de tampão, composto por: 6,25 mM Tris HCl pH 6,8, 20% glicerol, 5% SDS e 2% mercaptoetanol e água destilada (13,6 mL) na proporção 1:5 (v:v). As amostras foram aquecidas até a ebulição, durante três minutos. As proteínas foram quantificadas conforme Bradford (1976). As amostras de proteínas foram aplicadas na quantidade de 3,5 µg por animal.

A corrida eletroforética foi iniciada a 50 V por 30 minutos e, posteriormente, a 16 mA, até que a banda de frente atingisse 1 cm da borda inferior do gel. Os géis foram fixados em isopropanol: ácido acético: água e revelados em ácido acético 10%, com 2% de Coomassie blue R-250, até a visualização das bandas. As imagens foram capturadas com a utilização de transluminador e câmera digital CCD.

O modelo matemático utilizado foi:

$$x_{ij} = m + c_i + e_{ij}$$

sendo:

x_{ij} = valor observado no grupo i e repetição j ; m = média geral; c_i = efeito da colheita

e_{ij} = efeito do acaso

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F (Banzatto e Kronka, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perante as avaliações clínicas e espermáticas, para efeito de seleção para monta natural, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), o perímetro escrotal médio foi de 29,90 cm e 34,30 cm no inverno e verão, respectivamente, resultado esse similar às médias de 32,2 cm descritas por Pineda et al. (2000); de 35,54±2,96 cm no inverno; e de 34,61±3,26 cm no verão, relatada por Chacur e Machado Neto (2007) em touros limousin, com idades de 24 meses, sendo as mesmas classificadas como boas para a faixa etária de 21 a 30 meses, segundo a classificação andrológica de touros *Bos taurus taurus* (CBRA, 1998).

O vigor espermático revelou médias e desvios - padrão, com diferença significativa ($P < 0,01$) de 2,09mL e 1,76mL no inverno e verão, respectivamente. Para os defeitos menores (Dm) e totais (Dt) houve diferença significativa ($P < 0,05$), (Dm) 14,99 % e 20,84 % no inverno e verão, respectivamente e para (Dt) foi de 25,14 % no inverno e 32,81 % no verão.

Silva et al. (1991a,b), quando avaliaram nas raças Nelore e Fleckvieh a influência da época do ano, para as características do PE, para volume, motilidade, vigor e concentração, concluíram que, na época chuvosa (janeiro a maio), o volume foi de 4,5± 0,37mL, motilidade 73,4± 1,54% e vigor 3,7± 0,07, significativamente maior ($p < 0,05$) do que na seca. Mas, em contrapartida, a concentração do ejaculado 1,7x10⁹/mL mostrou-se inversamente proporcional ao volume, apresentando-se menor ($p < 0,05$) na época chuvosa.

Os pesos médios foram de 355,5 Kg no inverno e de 509,1 Kg no verão, revelando crescimento dos animais durante o período experimental. No inverno, o peso médio dos touros foi inferior à média de 434 kg descrita em Brangus por Lopez *et al.* (2007) aos 13 meses de idade.

As características do sêmen: volume, motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais, nas estações do inverno e verão são apresentadas na tabela I. Com relação ao

espermograma, no verão 8/11 (72,72%) dos touros, apresentaram defeitos maiores acima do limite de 10% preconizado pelo CBRA em 1998, com valores entre 14% e 34%.

A despeito de os animais zebuínos estarem mais adaptados aos climas quentes, em relação aos taurinos, sugere-se que, no verão, as altas temperaturas reflitam, de forma direta, na termorregulação testicular, resultando em acréscimo dos defeitos espermáticos maiores e menores. Na mesma linha de raciocínio, devido ao acompanhamento do quadro espermático dos touros durante diferentes épocas do ano, a elevação dos defeitos espermáticos, no verão, é constantemente relatada por centrais de inseminação artificial.

Outros trabalhos descrevem que as altas temperaturas, nos testículos, reduzem a qualidade do sêmen produzido, ocasionando o aumento das patologias espermáticas e a diminuição da motilidade, do vigor e de espermatozóides vivos, devido à depressão da espermatogênese nos touros. Além disso, pode apresentar redução do volume do ejaculado e alteração da concentração espermática (Van Demark, et al, 1970; Gabaldi, 2000).

LOCAL PARA INSERIR-SE A TABELA I.

As proteínas do plasma seminal foram observadas nas amostras colhidas no inverno e verão, por meio de eletroforese SDS-PAGE, sendo visualizadas cadeias polipeptídicas com pesos moleculares entre 6 KDa e 125 KDa, conforme a **tabela II**. Dentre as bandas protéicas identificadas nas estações do ano, as percentagens de ocorrência estiveram entre 9,09% e 100%, com variações entre os animais estudados.

Os resultados revelaram a presença da proteína de 6KDa em dez animais dos Onze, no verão (90,90%), e, em nove dos onze, no inverno (81,81%). Wempe *et al.* (1990) relataram que a proteína “seminalplasmin”, de 6 KDa, tem atividade antimicrobiana, capta íons Ca^{2+} para o espermatozóide nos epidídimos dos bovinos, e inibe a proliferação de linfócitos. Sugere-se que a alta percentagem da presença dessa banda protéica esteja mais relacionada com a atividade antimicrobiana do que com a estação do ano.

Proteínas de 9KDa foram identificadas, na presente pesquisa, em 90,90% das amostras no inverno, e 72,72% no verão; e de cadeias polipeptídicas com pesos de 12 Kda, com frequência de 63,63%, no inverno, e de 45,45% no verão. Supõe-se que as proteínas de 9 KDa e 12 KDa sejam do grupo das espermedesinas. Essas duas bandas apresentaram maior incidência no inverno, estação onde todos os touros apresentaram quadro espermático

satisfatório. Bandas protéicas de 9 KDa e 12 KDa são classificadas como espermedesinas, conferindo alta fertilidade aos touros (Romão, 2002).

Foram encontradas, com menos frequência, proteínas de 13KDa em 9,09% das amostras no verão e de 45,45% no inverno. Trabalhos descrevem a proteína de 13 KDa como PDC-109, conferindo alta fertilidade aos touros, agindo, de forma direta, no metabolismo dos espermatozoides (Desnoyers, 1994). No presente estudo, a qualidade do sêmen foi superior no inverno.

No verão, houve maior visualização de uma banda protéica de 17 KDa em 63,63% das amostras, que, no inverno 27,27%. Conforme Veirula (1983), esta proteína atua como fator decapitante para o espermatozóide, levando à queda da fertilidade em bovinos. Sugere-se que a banda de 17 KDa e o aumento das patologias espermáticas possam ser concomitantes.

No inverno e no verão, não foi observada oscilação na presença da banda protéica de 20 KDa, verificada em três touros, perfazendo 27,27%. Essa proteína pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermática, depois de ser submetida ao choque térmico pelo frio (Barrios *et al.*, 2000). Em taurinos, a proteína de 20 KDa esteve presente em 100% das amostras de plasma seminal, em reprodutores Limousin, nas mesmas estações do ano (Chacur *et al.*, 2004; Chacur e Machado Neto, no prelo).

A eletroforese revelou a presença de uma proteína de 26 KDa, identificada em 54,54% das amostras, no inverno, e em 100%, no verão, sendo evidente a maior incidência no verão, similar aos resultados encontrados por Chacur e Machado Neto (2007) em taurinos. No presente estudo, oito (72,72%) dos touros apresentaram quadro espermático insatisfatório no verão, com defeitos maiores acima de 10%, na presença da banda de 26 KDa. Por outro lado, no inverno, quatro (36,36%) desses mesmos animais, com a banda de 26 KDa, tinham os aspectos qualitativos e quantitativos do sêmen dentro dos padrões.

Essa proteína de 26 KDa tem sido alvo de estudos por conferir baixa fertilidade aos touros, quando presente no plasma seminal (Killian, 1999; Roncoletta *et al.*, 1999; Chacur *et al.*, 2003 e 2006b). Por outro lado, Sorrentino *et al.* (1998) relatam que a mesma possui a função de transportar o ácido retinóico, necessário para manter a espermatogênese. Já Thedeschi *et al.* (2000) citaram haver ligação na superfície do espermatozóide, no momento da ejaculação, denominando-a como proteína Z-13.

LOCAL PARA INSERIR-SE A TABELA II.

A proteína de 35 KDa esteve presente em 36,36% dos animais, no inverno, e em 63,63%, no verão. Segundo a literatura consultada, a banda de 35 KDa é responsável pela alteração lipídica da membrana espermática, inibindo a reação acrossômica (Brandon, 1991). Supostamente, as altas temperaturas do verão interferem na reação acrossômica, evento esse necessário no processo do transporte dos espermatozóides.

Uma banda protéica de 40 KDa foi identificada em dois animais no inverno. Outra banda protéica apresentou peso de 44 KDa, estando presente em 18,18% dos touros, no inverno, e em 72,72%, no verão. Vierula (1983) relatou que as proteínas de 40 KDa e 44 KDa participam da reação acrossômica.

A banda de 55 KDa esteve presente em 63,63% dos animais, no inverno, reduzindo sua presença, no verão, para 27,27%. A banda protéica de 55 KDa esteve ausente no inverno e presente em 44,44% dos touros Limousin, no verão (Chacur *et al.*, 2004; 2006a).

Ação benéfica da proteína de 55 KDa sobre a qualidade do sêmen é descrita, pertencente ao grupo das osteopontinas, identificada como uma das proteínas de fertilidade em touros de origem leiteira, presente no fluido das glândulas sexuais acessórias (Moura *et al.*, 2006). Essa proteína modula a função celular pelos receptores e modifica as características da membrana plasmática do espermatozóide, favorecendo a fertilidade, além de participar da capacitação espermática (Killian *et al.*, 1993; Morani, 1998; Cancel, 1999; Gerena, 2000).

Observou-se, no presente trabalho, uma proteína de 66 KDa, identificada em dois touros (B e D), no inverno, e em quatro animais (D, H, I e K), no verão. A literatura descreve essa banda e a denomina albumina (Morani, 1998; Killian, 1999). Segundo relatos de Jobim *et al.* (2002), a mesma auxilia na gametogênese e no metabolismo das células de Sertoli.

Uma banda de 75 KDa foi visualizada em 54,54% dos touros, no inverno e no verão. A proteína chamada de SP-2 possui peso de 75 KDa, sendo que sua presença está relacionada, de forma negativa, com a fertilidade (Brandon *et al.*, 1999).

A eletroforese revelou a existência da proteína de 80 KDa, provavelmente a lactoferrina, encontrada, comumente, no plasma seminal de garanhões (Inagaki, 2002). Atua como antioxidante, protegendo a membrana plasmática dos espermatozóides (Fouchecourt *et al.*, 2002). Essa proteína esteve presente em um touro (9,09%), no inverno, e, em quatro animais (36,36%), no verão.

No inverno, 27,2% dos animais e, no verão, 18,18% apresentaram a proteína de 85KDa. A osteopontina, com 85 KDa, está relacionada com a ação do cálcio que ativa o espermatozóide e atua na reação do acrossoma (Vierula, 1983).

Observou-se uma banda de 105 KDa em quatro touros (36,36%), no inverno, e em três (27,27%), no verão. Essa proteína, segundo Gatti *et al.*, 1999, foi encontrada na região do epidídimo, que influencia a motilidade espermática.

A eletroforese identificou uma proteína de 125 KDa, presente em 81,81% dos touros, no inverno, e em 90,90%, no verão. Na literatura consultada, não há relatos dessa banda protéica. As bandas protéicas de 6 KDa, 9 KDa e 125 KDa apresentaram, nas duas estações, as maiores percentagens dentre todas as bandas identificadas, o mesmo ocorrendo com a banda de 26 KDa no verão. Novas investigações, nas diferentes raças, faixas etárias e épocas do ano são necessárias para uma melhor compreensão dos fatores que levam à oscilação na presença das proteínas do plasma seminal, na espécie bovina.

Como resultado do estudo da influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Tabapuã, conclui-se que: as estações de inverno e verão revelaram influência na percentagem de bandas protéicas, com pesos específicos, e tem influência na composição protéica do plasma seminal.

As estações do ano podem influenciar na presença ou ausência de proteínas do plasma seminal, entretanto isso não tem relação direta com a qualidade espermática.

BIBLIOGRAFIA

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). 2003. Manual de Inseminação Artificial. São Paulo, 42p.
- Banzatto, D.A. e S.N. Kronka. 2006. Experimentação Agrícola. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 237p.
- Barrios, B., R. Pérez- Pé, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muiño-Blanco e J.A. Cebrián-Pérez. 2000. Seminal plasma protein revert the cold-shock damage of ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* , 63: 1531-1537.
- Bergeron, A. 2004. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal plasma of different species. In: XV International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. Abstracts... Belo Horizonte; Brazilian College of Animal Reproduction, v.1, p.226.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248-54.
- Brandon, C. I. 1991. The causes of pathologic change of testicular degeneration in large animals. *Vet. Med.*, 23:1: 531-36.

- Cancel, A.M. 1999. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 60:454-460.
- Chacur, M.G.M., M.M. Rabesquine e N.B. Machado Neto.. 2003. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal: correlação com o quadro espermático. *Rev. Bras. Reprod. An.*,27:2: 185-186.
- Chacur, M. G. M., N.B. Machado Neto e M.M. Rabesquine. 2004. Season influence upon seminal plasma proteins in bulls. In: XV International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, 2004. Abstracts... Porto Seguro, Brazilian College of Animal Reproduction, v.1, p.236.
- Chacur, M.G.M., N.B. Machado Neto e D.R. Cristancho. 2006a Winter-spring and summer influence upon seminal plasma proteins in bulls. *An. Reprod.*, 3:251.
- Chacur, M.G.M., A.I.S. Martinez, N.B. Machado Neto, 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.
- Chacur, M.G.M. e N.B. Machado Neto. 2007. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. *Veterinária Notícias*, .13:1. (no prelo).
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, 49p.
- Desnoyers, L. 1994. Characterization of the mayor proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrylamide gel electroforesis. *Molec. Reprod. Develop.*, 37: 425-43.
- Einspanier, R.; A. Einspainer e F. Wempe, F. 1991. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, 179:2: 1006-1010.
- Fouchecourt, S., S. Métayer, A. Locatelli, F. Dacheux e J.L. Dacheux. 2002. Mammalian lipocalin – type prostaglandin D2 synthesis in the fluids of the male genital tract: Putative biochemical and physiological functions. *Biol. Reprod.*, 66: 3: 468-467.
- Gabaldi, S. H. Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal. Botucatu, 2000, 85 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ- Universidade Estadual Paulista. Botucatu, p. 85, 2000.
- Gasset, M., J.L. Saiz, J. Lainez, L Sanz, M. Gentzel, E. Töpfer-Petersen e E J. Calvete. 1997. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur. J. Biochem.*, 250: 5: 735-744.
- Gatti, J. L., X. Druart, Y. Guérin, F. Dacheux e J.J. Dacheux. 1999. Kilodalton protein in epididymal fluids of domestic mammals in angiotensin – I covering enzyme (ACE) evidence that sperm are the source of this ace. *Biol. Reprod.*, 60: 937-945.

- Gerena, R. L., D. Irikura, N. Euchii, Y. Urade e G.J. Killian. 2000. Immunocytochemical localization of lipocalin. Type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis and in ejaculated sperm. *Biol. Reprod.*, 62: 547-556.
- Inagaki, M. 2002. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. *J. Vet. Med. Sci. London*, v.64, p. 75-77.
- Jobim, M.I., E.R. Oberst, C.G. Salbego, D.O. Souza., H.I. Cimarosti e R.C. Mattos. 2002. Albumin and osteopontin-proteins seminal plasma related with semen freezability. *Braz. J. An. Reprod.*, 26: 296-305.
- Killian, G. J. 1993. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 49: 1202-1207.
- Killian, G. J., D.A. Chapman e L.A. Rogowski. 1993. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 49: 1202-1207.
- Killian, G.J. 1999. The role of marker protein in reproductive efficiency. *Vet. Sci. Extension.*, 29: 1112-1120.
- Laemlli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Manjunath, P. e M.R. Sairam. 1987. Purification and biochemical characterization of three major acidic protein (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *J. Biochem.*, 241: 685-692.
- Morani, C.V. 1998. Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações na precocidade sexual em bovinos da raça Nelore doadores de sêmen. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 33: 6: 1015-1021.
- Mortarino, M., G. Tedeschi, A. Negri., F. Ceciliani, L. Gottardi, G. Maffeo e S. Ronchi. 1998. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis*, 19: 797-801.
- Moura, A.A., H. Koc, D.A. Chapman e G.L. Killian, G.J. 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J. Androl.*, 27: 201-211.
- López, M.N., A. F. Mariñelarena, A. R. Godinez, J. J. Castro, G. C. Flores e J.A.G. Macias. 2007. Caracterización de toretes Brangus y Charolés por medidas *in vivo*. *Arch. Zootec.*, 56: 83-86.
- Pineda, N.R., V.O Fonseca.,L.G Albuquerque. 2000. Estudo preliminar da influência do perímetro escrotal sobre a libido em touros jovens da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v 52, p.4-11.
- Roncoletta, M., P.H. Franceschini, V.F.M.H. de Lima, L.H. Rodrigues, M.A. Oliveira, M.A. e C. da Silva. 1999. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. *Bras. J. Vet. Anim. Sci.*, 36: 2: 143-148.

- Roncoletta, M. 2004. Sperm membrane and seminal plasma 2-D protein profiles and their relation with bull's fertility. In: XV International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. Anais... Belo Horizonte: Brazillian College Animal Reproduction, v.1, p.187.
- Romão, M. 2002. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (a SFP) at 1.9 resolution a bovine polypeptide of the espermadhesin family 1. *J. Molec. Biol.*, 274: 4: 650-660.
- Silva, A.E.D.F., M.,A. Dode, J.A Porto., U.G.P Abreu. 1991a Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore: características biométricas testiculares. ***Pesq. Agropec. Bras.***, 26:10:1745 -1750.
- Silva, A.E.D.F., M.,A. Dode., J.A Porto., U.G.P Abreu. 1991b. Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore: características espermáticas. ***Pesq. Agropec. Bras.***, 26:10:1751-1760.
- Sorrentino, C., B. Silvestrini, L. Braghiroli, S.S.W. Chung, S. Giacomelli, M.G. Leone, Y. Xie, Y Sui, M. Mo e C.Y. Cheng, . 1998. Rat prostaglandin D₂ synthetase: its tissue distribution, changes during maturation and regulation in the testis and epididymis. *Biol. Reprod.*,59: 843-853.
- Thedeschi, G., E. Oungre, M. Mortarino, A. Negri, G. Maffeo, e Ronchi, S. 2000. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Europ. Journ. Of Biochem.* 267: 6175-6179.
- Therien, I. R. Moreau, e P. Manjunath. 1998. Major protein of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, 59: 768-776.
- Van Demark, N. L.Free, M.J. 1970 Temperature effects. In: Johnson, A.D. GOMES, W. R. **The testis**. 1ed. New York:: **Academic press**. 3: 233-312.
- Vierula, M., H. Rajaniemi. 1983. Effect of seminal plasma and calcium on the stability of the surface protein composition of ejaculated bull spermatozoa. *Andrologia*, 15: 435-445.
- Wempe, F., S. Wagner, H.V.D. Kammer, E. Krauhs e Heinz Scheitk. 1990. Seminalplasmin the major basic protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of the seminal vesicle. *Biochimica Biophysical*, 1034:3: 260-262.

Tabela I. Características do sêmen durante o inverno e verão, em touros Tabapuã.
(Semen characteristics during winter and summer in Tabapua bulls).

colheita	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (1 a 5)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)	Defeitos totais (%)
inverno	3,89 a	56,00 a	2,09 a	19,05 a	14,99 b	25,14 b
verão	5,51 a	49,61 a	1,76 b	22,93 a	20,84 a	32,81 a

Teste: F

colheitas	2,26 ^{NS}	3,37 ^{NS}	14,65 **	0,89 ^{NS}	6,46 *	4,30 *
-----------	--------------------	--------------------	----------	--------------------	--------	--------

^{NS} – não significativo (P>0,05); * - significativo (P<0,05); ** - significativo (P<0,01)
a, b - em cada coluna, para cada colheita, médias com a mesma letra não diferem (P>0,05).

Tabela II. Percentagens de ocorrência de bandas protéicas específicas no plasma seminal de touros Tabapuã, nas estações do inverno e verão. (Occurrence percentages of specific proteic bands in bulls seminal plasma in winter and summer stations).

Touros	Proteínas (KDa)	Inverno (n = 11)	Verão (n = 11)
A, B, C, D, E, F, H, I, J, K,	6	9/11 (81,81%)	10/11(90,90%)
A, B, C, D, E, F, G, H, J, K	9	10/11(90,90%)	8/11(72,72%)
D, E, F, H, I, J, K	12	7/11(63,63%)	5/11(45,45%)
A, B, C, D, E	13	5/11(45,45%)	1/11(9,09%)
A, B, C, E, F, G, J	17	3/11(27,27%)	7/11(63,63%)
A, D, E, F, J	20	3/11(27,27%)	3/11(27,27%)
A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K	26	6/11(54,54%)	11/11(100%)
A, B, C, E, F, H, I, J, K	35	4/11(36,36%)	7/11 (63,63%)
A, B, E, F, G, H, J, K	44	2/11(18,18%)	8/11(72,72%)
A, C, D, E, F, H, I, J	55	7/11(63,63%)	3/11(27,27%)
B, D, H, I, K	66	2/11(18,18%)	4/11(36,36%)
A, C, D, E, F, I, J, K	75	6/11(54,54%)	6/11(54,54%)
A, B, C, I	80	1/11(9,09%)	4/11(36,36%)
A, C, F, I, J	105	4/11(36,36%)	3/11(27,27%)
A, B, C, E, F, G, H, I, J, K	125	9/11 (81,81%)	10/11(90,90%)

INFLUÊNCIA DO PROBIÓTICO NO PESO, PERÍMETRO ESCROTAL E ESPERMIOGRAMA EM TOUROS TABAPUÃ (*Bos taurus indicus*)

Andrea Marisol Novoa Castillo Oliveira¹, Marcelo George Mungai Chacur², Gabriella Biondi de Godoy³, Valéria da Silva Gandolfo⁴, José Luis Zanesco⁵, Sérgio do Nascimento Kronka⁶

1. Médica Veterinária, mestranda em Ciência Animal – UNOESTE. E-mail: andreanovoamv@gmail.com
2. Médico Veterinário, doutor, professor titular - UNOESTE - Faculdade de Ciências Agrárias - Departamento de Reprodução Animal – Campus II – 19.067 175 – Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: chacur@unoeste.br.
3. Graduanda em Medicina Veterinária – bolsista de IC FAPESP. / 4. Graduanda em Medicina Veterinária. / 5. Médico Veterinário, / 6. Engenheiro Agrônomo, doutor, professor titular – UNOESTE.

RESUMO

A proposta deste estudo foi investigar a influência do probiótico (Proenzime®) no peso, perímetro escrotal e espermograma de touros Tabapuã. Duas amostras de sêmen de 21 touros Tabapuã, com idades de 30 meses, foram colhidas nos dias 0 e 120 por eletroejaculação, totalizando 42 amostras. Os touros foram divididos em grupo 1 (G1)=10 (controle) e grupo 2 (G2)=11 (grupo probiótico: 4g/animal/dia, durante 120 dias). Houve diferença ($P<0,01$) entre as colheitas (C1 e C2) nos grupos G1 e G2, respectivamente, para: perímetro escrotal (G1 - C1: 30,50 cm e C2: 33,55 cm; G2 - C1: 29,90 cm e C2: 34,30 cm) e peso (G1 - C1: 362,70 kg e C2: 509,60 kg; G2 - C1: 355,50 kg e C2: 509,10 kg). Houve diferença ($P<0,05$) entre colheitas (C1 e C2) nos grupos G1 e G2, respectivamente, para: defeitos menores (G1 - C1: 13,84 % e C2: 21,79 %; G2 - C1: 14,99 % e C2: 20,84 %) e defeitos totais (G1 - C1: 22,29 % e C2: 29,24 %; G2 - C1: 25,14 % e C2: 32,81 %). Os resultados demonstram que, entre os grupos, não houve alteração significativa das características seminais.

PALAVRAS-CHAVE: Zebu, touros, probiótico, perímetro escrotal, sêmen.

PROBIOTIC INFLUENCE UPON WEIGHT, SCROTAL PERIMETER AND SPERMIOGRAM IN TABAPUA BULLS (*Bos taurus indicus*)

ABSTRACT

The purpose of this study was the investigates of one probiotic (Proenzime®) influence upon weight, scrotal perimeter and spermogram in Tabapua bulls. Two ejaculated samples from 21 Tabapua bulls, aging 30 months, were collected (day 0 and day 120) by electroejaculation, totalizing 42 samples. The bulls were, divided in group 1 (G1) =10 (control) and group 2 (G2)=11 (probiotic group: 4g/animal/day, during 120 days). There was difference ($P<0,01$) between collects (C1 and C2) in the groups G1 and G2, respectively: scrotal perimeter (G1 - C1: 30.50 cm and C2: 33.55 cm; G2 - C1: 29.90 cm and C2: 34.30 cm) and weight (G1 - C1: 362.70 kg and C2: 509.60 kg; G2 - C1: 355.50 kg and C2: 509.10 kg). There was difference ($P<0,05$) between collects (C1 and C2) in the groups G1 and G2, respectively for minor defects (G1 - C1: 13.84 % and C2: 21.79 %; G2 - C1: 14.99 % and C2: 20.84 %) and total defects (G1 - C1: 22.29 % and C2: 29.24 %; G2 - C1: 25.14 % and C2: 32.81 %). The results shown allowed the conclusion that there were no significant alterations between groups for the seminal characteristics with the use of probiotic.

KEY WORDS: Zebu, bulls, probiotic, scrotal perimeter, semen.

INTRODUÇÃO

Probiótico é um suplemento alimentar que contém microrganismos vivos, produtores de efeitos benéficos no hospedeiro (MOTA et al., 2006), estabiliza a população da microbiota do aparelho digestório e melhora a conversão alimentar (AVILA et al., 2000). O “Food and Drug Administration” (FDA) define probiótico como fonte de microrganismos, que pode ser adicionada à alimentação dos animais (LOODY, 2002).

Existem poucos trabalhos sobre o efeito do probiótico na fertilidade dos machos, sendo relatado que, em fêmeas, o *Lactobacillus sp* previne a metrite no pós-parto (OTERO & NADER-MACIAS, 2006). Nos bovinos, o probiótico atua como imunoestimulante, aumentando a resistência às doenças infecciosas (LEEDLE, 2000; CHUKEATIROTE, 2003; COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; SAAD, 2006). Atua como promotor de crescimento e ganho de peso (ALVES et al., 2000; JORGE et al., 2006).

A habilidade para a seleção de touros com alta fertilidade resulta na produção de doses de sêmen com qualidade superior, aumentando a taxa de concepção. Normalmente, a análise do sêmen é realizada, considerando-se as características qualitativas e quantitativas, nem sempre resultando na seleção de touros férteis (CHACUR & MACHADO NETO, 2007). Por monta natural, um touro fértil deixa cerca de 120 a 400 descendentes, quando selecionado por meio da avaliação andrológica. Utilizando-se a inseminação artificial, esse número pode ultrapassar os 100.000 descendentes, demonstrando a importância de se utilizarem indivíduos com características desejáveis, conforme normas da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2003).

Um dos parâmetros morfométricos tradicionais na seleção de touros é o perímetro escrotal (PE), facilmente mensurável e de alta repetitividade. Este permite estimar-se o potencial reprodutivo de machos jovens, por estar associado ao desenvolvimento testicular, à produção diária de espermatozoides e à puberdade (SMITH, 1989; SILVA, 1993; PINEDA et al., 2000). A presença de um maior volume testicular, por unidade de peso corporal, foi relatada em animais precoces, com peso aproximado de 300kg e idades entre 8 e 30 meses (FIELDS, 1979). O perímetro escrotal e a qualidade do ejaculado, em touros jovens, têm sido importantes para a seleção de animais com maior potencial para a produção qualitativa e quantitativa de sêmen e, conseqüentemente, melhor fertilidade (PINHO, 2000).

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar-se a influência do probiótico (Proenzime®) no peso corpóreo, perímetro escrotal e espermograma em touros da raça Tabapuã, criados extensivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 21 touros da raça Tabapuã, com idade média de 30 meses, divididos em dois grupos: grupo 1 (G1) = 10 (controle) e grupo 2 (G2) = 11 (tratados com probiótico - Proenzime®), criados extensivamente na região de Presidente Prudente – SP, em pasto de *Brachiaria decumbens*, com sal mineral e água “ad libitum”.

Os touros foram classificados por avaliações clínicas e espermáticas, para efeito de seleção para monta natural, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Após a mensuração do perímetro escrotal (PE), os ejaculados colhidos foram analisados macroscopicamente, quanto ao volume, cor e aspecto; e, microscopicamente, quanto à motilidade espermática progressiva, vigor e morfologia, por meio de microscópio de contraste de fase, com câmara de vídeo CCD, nas dependências do Laboratório de Reprodução Animal da FCA-Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente - SP.

Duas colheitas de sêmen foram efetuadas, em todos os touros, pelo método da eletroejaculação, perfazendo 42 amostras. A primeira colheita foi realizada em setembro, antes do início do fornecimento do probiótico (dia zero), com início imediato da adição de 4g do probiótico (Proenzime®) por animal / dia, no grupo 2 (tratado), conforme posologia do fabricante. Durante 120 dias consecutivos, o produto foi servido diariamente, em cocho coberto, observando-se a total ingestão diária pelos touros. Transcorrido esse período, foi realizada, em janeiro (dia 120), a segunda colheita de sêmen em todos os animais.

Os dados experimentais foram analisados em esquema fatorial inteiramente casualizado, com os fatores: grupos (1 e 2) e colheitas (1 e 2), com números iguais ou diferentes de repetições, conforme a variável considerada.

Modelo matemático:

$$x_{ijk} = m + g_i + c_k + (g c)_{ik} + e_{ijk}$$

Sendo:

x_{ijk} = valor observado no grupo i , colheita k e repetição j ; m = média geral; g_i = efeito do grupo i ; c_k = efeito da colheita k ; $(g c)_{ik}$ = efeito da interação entre o grupo i e a colheita k ;

e_{ijk} = efeito do acaso

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 42 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F (BANZATTO & KRONKA, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, houve aumento do perímetro escrotal (PE) médio diário de 0,0338cm para o G1 e de 0,0488cm para os animais do G2, perfazendo um total de 9,09% e 12,82% de acréscimo para o PE dos grupos 1 e 2, respectivamente. Frente à mensuração do PE, houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre as colheitas do grupo 1 (30,50 cm e 33,55 cm) e do grupo 2 (29,90 cm e 34,30 cm), observada na Tabela 1. Todavia não houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2.

O perímetro escrotal, em touros, é um parâmetro obtido com praticidade e repetitividade, apresentando relação com o peso e a idade. As médias obtidas, no presente estudo, para o PE, variaram entre 29,90 cm e 34,30 cm. Segundo a classificação andrológica de touros *Bos taurus indicus*, baseado no PE, para a faixa etária de 30 meses, os animais classificam-se como muito bons, segundo FONSECA et al. (1997); semelhantes às médias de 32,2 cm descritas por PINEDA et al. (2000) e de 34,0cm relatada por CHACUR et al. (2006c), na faixa etária de 48 meses, em Nelores criados, no Centro-Oeste do Brasil.

Foi observado desenvolvimento corporal satisfatório dos touros, no presente experimento, similar às observações de EVANS (1996), sugerindo que a maturidade sexual está mais intimamente relacionada ao peso do animal do que à idade, sofrendo a influência de fatores, como raça, heterose, balanceamento hormonal e manejo.

Houve acréscimo de peso médio diário de 1,63kg para o G1 e de 1,70kg para os animais do G2, perfazendo um total de 28,76% e 30,17% de acréscimo para os grupos 1 e 2, respectivamente. Para o peso corpóreo, houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre as colheitas do grupo 1 (362,70 kg e 509,60 kg) e do grupo 2 (355,50 kg e 509,10 kg), ilustrada na Tabela 1. A diferença observada, supostamente está relacionada ao ganho de peso obtido no período experimental, totalizado em 90 dias. Os ganhos de peso dos animais, nos dois grupos, demonstram que os mesmos tiveram acesso à alimentação, com quantidade e qualidade satisfatórias, levando-se em consideração que o experimento foi conduzido, em sua maior parte, na estação do inverno e verão (setembro a janeiro).

TABELA 1. Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação no grupo 1 (n = 10) e grupo 2 (n = 11), para perímetro escrotal (PE), volume do ejaculado, peso, motilidade, vigor, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais em touros da raça Tabapuã, Presidente Prudente – SP.

grupo	colheita	PE (cm)	Volume (mL)	Peso (kg)	Motilidade (%)	Vigor (1 a 5)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
					arc sen $\sqrt{\%}$	$\sqrt{X + 1}$	arc sen $\sqrt{\%}$	arc sen $\sqrt{\%}$	arc sen $\sqrt{\%}$
1	1	30,50 b A	2,90 a A	362,70 b A	53,03 a A	2,04 a A	16,45 a A	13,84 b A	22,29 b A
1	2	33,55 a A	3,57 a A	509,60 a A	44,95 a A	1,80 a A	17,96 a A	21,79 a A	29,24 a A
2	1	29,90 b A	3,89 a A	355,50 b A	56,00 a A	2,09 a A	19,05 a A	14,99 b A	25,14 b A
2	2	34,30 a A	5,51 a A	509,10 a A	49,61 a A	1,76 b A	22,93 a A	20,84 a A	32,81 a A
Teste F:									
GRUPOS (G)		0,01 ^{NS}	3,69 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,94 ^{NS}	0,00 ^{NS}	1,75 ^{NS}	0,00 ^{NS}	0,83 ^{NS}
COLHEITAS (C)		31,57 ^{**}	2,26 ^{NS}	170,53 ^{**}	3,37 ^{NS}	14,65 ^{**}	0,89 ^{NS}	6,46 [*]	4,30 [*]
INTERAÇÃO G x C		1,04 ^{NS}	0,39 ^{NS}	0,09 ^{NS}	0,05 ^{NS}	0,42 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,01 ^{NS}
Desvio padrão		2,10	2,41	36,38	11,93	0,23	7,45	7,06	9,17
C.V. (%)		6,55	60,71	8,38	23,44	11,98	39,01	39,53	33,50

^{NS} – não significativo (P>0,05) * - significativo (P<0,05) ** - significativo (P<0,01)

a, b – em cada coluna, para cada grupo, médias de colheitas com a mesma letra minúscula não diferem (P>0,05).

A - em cada coluna, para cada colheita, médias de grupos com a mesma letra maiúscula não diferem (P>0,05).

As percentagens de ganho de peso obtidas nos grupos do presente estudo foram superiores às relatadas por ALVES et al. (2000) e JORGE et al. (2006), com 22% e 25%, respectivamente, para bovinos confinados; e RASTEIRO et al. (2006), com incremento de 19,4% no peso dos bovinos em pastejo extensivo, no período de seca. Por outro lado, inferiores ao de ARENAS et al. (2007), verificando 33,3 % de acréscimo no peso.

Para a motilidade espermática progressiva, não houve diferenças significativas entre as colheitas (1 e 2) e grupos 1 e 2 (Tabela 1). Supostamente, o metabolismo espermático dos zebuínos do presente estudo mostrou-se mais eficiente em relação aos taurinos da raça Limousin (CHACUR et al. 2006b) e em touros Canchim, para o mesmo período do ano (CHACUR et al. 2006).

Não houve diferença significativa entre as médias de peso entre os grupos. Supõe-se que a formulação do probiótico Proenzime® não seja específica para ganho de peso, quando fornecido a touros em regime de criação extensiva.

Com relação ao espermograma, todas as amostras de sêmen dos dois grupos experimentais revelaram as seguintes características macroscópicas: coloração branco-marmóreo e aspecto viscoso, não sendo verificada qualquer variação entre as colheitas e grupos. Por outro lado, o vigor espermático revelou médias e desvios-padrão, com diferença significativa ($P < 0,01$) entre as colheitas do grupo 2: 2,09 e 1,76 (Tabela 1). No grupo 1, não houve diferença para o vigor espermático. Supostamente, o aumento da temperatura ambiente, no período da segunda colheita de sêmen, tenha influenciado nesse parâmetro. Por outro lado, vigor espermático médio de 4,3 foi relatado para Nelores, na primavera, sugerindo uma melhor adaptação dos zebuínos ao clima quente (CHACUR et al., 2006).

Para os defeitos menores (Dm) e totais (Dt) houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as colheitas para os dois grupos, sendo: grupo 1 (Dm) 13,84 % e 21,79 %; grupo 2 (Dm) 14,99 % e 20,84 %. Para (Dt) no grupo 1 (22,29 % e 29,24 %) e grupo 2 (Dt) 25,14 % e 32,81 % (Tabela 1), resultados esses superiores aos defeitos menores descritos, em Nelores, por Chacur et al. (2006), com valores de 9,91% e 8,36%, nas variedades padrão e mocho, respectivamente. Por outro lado, similar aos defeitos menores relatados por Chacur e Machado Neto (2007) em 21,80%.

Para os defeitos totais, o presente estudo revelou percentagens superiores às de 13% na raça Gir (MARTINEZ, 2000); 28% a 31% em bovinos mestiços (SILVA et al. 1991); de 13% a 14% em touros Nelore (CHACUR et al. 2006); e de 13% a 16,5% para as raças Canchim e Nelore, respectivamente (BARBOSA et al., 1991).

No presente trabalho, os defeitos menores foram superiores aos relatados, nas mesmas estações do ano, por Chacur e Machado Neto (2007), com 6,18% no inverno e 21,80% no verão.

Supostamente, os defeitos menores e totais foram superiores no verão, devido à ação da temperatura ambiente, bem como da inatividade sexual dos touros.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as colheitas nos grupos para volume, motilidade e defeitos maiores (Tabela 1). O volume dos ejaculados foi semelhante ao descrito por SILVA et al. (2002), de 4,0 mL, e inferior aos 12 mL citados por MARTINEZ et al. (2000), estando esse aspecto quantitativo sujeito a variações, principalmente quando se trata do método de coleta por meio da eletroejaculação.

A característica motilidade espermática, do presente estudo, apresentou médias inferiores, nas colheitas (C1 e C2), nos grupos G1 e G2, respectivamente, para motilidade (G1 - C1: 53,03% e C2: 44,95%; G2 - C1: 56,00 % e C2: 49,61%), às relatadas por SILVA (1993), com 65,3%; SARREIRO (2002), obtendo 62,7% em touros zebuínos; e CHACUR et al. (2006c), com média de 75% em Nelores, na pré-estação de monta. No presente trabalho, as médias para as percentagens de defeitos maiores, foram superiores ao limite de 10%, preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Sugere-se que a baixa temperatura ambiente do inverno, associada à inatividade sexual dos touros, durante o período experimental, possa ter influenciado na percentagem de defeitos maiores, os quais apresentaram médias mínima e máxima de 16,45 % e 22,93 %, respectivamente.

A morfologia espermática, supostamente, é influenciada pelos constituintes protéicos do plasma seminal, os quais variam conforme a estação do ano, repercutindo na fertilidade de touros Limousin, criados em regime semi-intensivo (RABESQUINE et al. 2003; CHACUR et al., 2004 e 2007); na raça Canchim, aos 14 e 48 meses de idade (CHACUR et al. 2006), e na raça Nelore, criada extensivamente (SANCHEZ et al., 2004; CHACUR et al., 2006c).

A utilização de probióticos em bovinos é uma opção para suplementá-los na época da seca, devendo ser objetivo de um maior número de estudos para a padronização de protocolos nutricionais para reprodutores criados de forma extensiva.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o probiótico Proenzime® não ocasionou efeito deletério no espermograma dos touros, podendo ser fornecido a reprodutores. O probiótico utilizado não demonstrou ação promotora para o ganho de peso e aumento do perímetro escrotal, para touros criados extensivamente.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, UNOESTE e EMBRAUPEC, pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALVES, P.A.P.M; CAMPOS, O.F; ALMEIDA, M.I.V; LIZIEIRE, R.S; MODESTA, R.C.D; ALMEIDA, F.Q; NESCIAMENTO, C.G.H. Uso de probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Sacharomyces cerevisiae* na dieta de vitelos bovinos: efeitos sobre o desempenho e a qualidade da carne. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37, n.5, 2000. (<http://www.scielo.br>)

ARENAS, S.E.; REIS, L.S.L.S.; FRAZATTI-GALLINA, N.M.; GIUFFRIDA, R.; PARDO, P.E. Efeito do probiótico Proenzime® no ganho de peso em bovinos. **Archivos de Zootecnia**. v.56, p.75-78, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **Manual de Inseminação Artificial**. São Paulo, 2003. 42p.

AVILA, F.A.; PAULILLO, A.C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; LUCAS, F.A.; ORGAZ, A.; QUINTANA, J. L. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.52, p.41-46, 2000.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

BARBOSA, R.T. et al. Biometria testicular e aspectos do Sêmen de Touros das raças Cachim e Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 15. n. 3. p. 159-170, 1991

CHACUR, M.G.M.; ARAÚJO, M.C.; KRONKA, S. Características seminais, corpóreas e anatômicas do aparelho reprodutor de reprodutores da raça Canchim aos 14 e 48 meses de idade. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v.9, p.21-27, 2006.

CHACUR, M.G.M.; MACHADO NETO, N.B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. **Veterinária Notícias**, v.13, n.1, 2007 (no prelo).

CHACUR, M.G.M.; MACHADO NETO, N.B.; CRISTANCHO, D.R. Winter-spring and summer influence upon seminal plasma proteins in bulls. **Animal Reproduction**, v.3, p.251, 2006b.

CHACUR, M.G.M.; MACHADO NETO, N.B.; RABESQUINE, M.M. Season influence upon seminal plasma proteins in bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro, 2004 **Abstracts...** Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004, v.1, p.236.

CHACUR, M.G.M.; SANCHEZ-MARTINEZ, A.I.; MACHADO NETO, N.B. 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, p.87-93, 2006c.

CHUKEATIROTE, E. Potencial use of probiotics. **Journal of Science and Technology**. v.25, p.275-282, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COPPOLA, M.M; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**. v.34, p.1297-1303, 2004.

EVANS, A.C.O. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v.46, p.345-357, 1996.

FIELDS, M.J. Age, season and breed effect of testicular volume and semen trails in young beef bull. **Journal of Animal Science**. v.48, p.1299-1304, 1979.

FONSECA, V.O. et al. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfofísicas do sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 2, p. 36-39, 1997.

JORGE, C.F.J.F.; ROSA, G.O.; SILVA, I.S. et al. Efeito de um aditivo alimentar contendo probiótico e enzimas digestivas no ganho de peso de bovinos Nelore em regime de pasto. In: IV ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO ESTADO E DA REGIÃO DO PANTANAL, 2006. *Anais do IV Encontro de pesquisa e iniciação Científica do Estado e da Região do pantanal, 2006*, p. 69-79.

LEEDLE, J. Probiotics and DFMs-Mode of action in the gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. 2000. **Anais do Simpósio Sobre Aditivos Alternativos na Nutrição Animal**, 2000, p.24-37.

LODDI, M.M. Probioticos e Prebioticos na nutrição de aves. **Rev. CRMV. Suplem. téc**, n. 23, 2002.

MARTINEZ L.M.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; PAULA, L.R.O.; CRUZ, M.; CAMPOS, J.P.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, F.; BRUSCHI, J.H.; DURÃES, M.C. Correlações entre características da qualidade do sêmen e circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1-15, 2000.

MOTA, A.; MOREIRA, J.L.S; SOUZA, M.R.; HORTA, M.F; TEIXEIRA, S.M.R.; NEUMANNE B.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus sp* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins; a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v.6, p.1-11, 2006.

OTERO, M.C.; NADER-MACIAS, M.E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂ producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Animal Reproduction Science**. v.96, p.35-46, 2006.

PINEDA, N.R.; FONSECA, V.O.; ALBUQUERQUE, L.G. Estudo preliminar da influência do perímetro escrotal sobre a libido em touros jovens da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.4-11, 2000.

PINHO, T.G. Características seminais de touros jovens Nelore *Bos taurus indicus* de acordo com a biometria e morfologia testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.187-189, 2000.

RABESQUINE, M.M.; CHACUR, M.G.M.; GARCIA, J.P. Morfometria testicular, aspectos seminais e influência do peso corpóreo sobre a morfologia espermática na raça Limousin. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.185-186, 2003.

RASTEIRO, V.S.; BREMER-NETO, H.; ARENAS, S.E. Adição de probiótico na mistura mineral eleva o ganho de peso de bovinos no período da seca. In: 43^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2006. João Pessoa. Anais da 43^a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2006, p.1-3.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, p.1-16, 2006.

SANCHEZ, A.I.; CHACUR, M.G.M.; COUTINHO, N.V. Semen physical and morphological characteristics and corporal mass index of Nelore (*Bos taurus indicus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro, 2004. **Abstracts...** Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v.1, p.196.

SARREIRO, L.C. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal, libido e características seminais de touros Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.602-608, 2002.

SILVA, A. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidade e fatores que a influenciam**. Campo Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1993. (Relatório).

SILVA, A.E.D.F. Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh e Chianina x Nelore: características espermáticas. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 26, n.10, p.1751-1760.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; FREITAS, A.R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1157-1165, 2002.

SMITH, M.F. Estimulation of genetic parameters among soundness examination components and growth traits in pearling bulls. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2892-2896, 1989.