

**EFEITO DOS FATORES CLIMÁTICOS NOS PARÂMETROS SEMINAIS, NAS
PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL, NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE
CORTISOL E TESTOSTERONA E NA TEMPERATURA ESCROTAL EM
TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*)**

ALINE APARECIDA DA SILVA

**EFEITO DOS FATORES CLIMÁTICOS NOS PARÂMETROS SEMINAIS, NAS
PROTEÍNAS DO PLASMASEMINAL, NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE
CORTISOL E TESTOSTERONA E NA TEMPERATURA ESCROTAL EM
TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*)**

ALINE APARECIDA DA SILVA

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

636.21
S586e

Silva, Aline Aparecida da.

Efeito dos fatores climáticos nos parâmetros seminais, nas proteínas do plasma seminal, na concentração sérica de cortisol e testosterona e na temperatura escrotal em touros Nelore (*Bos taurus indicus*) / Aline Aparecida da Silva. – Presidente Prudente, 2012.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: Marcelo George Mungai Chacur.

1. Touro Nelore. 2. Sêmen. 3. Hormônios. 4. Estações do Ano. I. Título.

ALINE APARECIDA DA SILVA

**EFEITO DOS FATORES CLIMÁTICOS NOS PARÂMETROS SEMINAIS, NAS
PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL, NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE
CORTISOL E TESTOSTERONA E NA TEMPERATURA ESCROTAL EM
TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*)**

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

Presidente Prudente, 20 de setembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Luis Carlos Vianna
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Alexandre Wolf
Faculdades Adamantinenses Integradas – FAI
Adamantina-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais:

Eu sei que tenho meus próprios anjos na Terra, para me ajudar a encontrar o meu caminho...

Para me amar e me guiar e sempre estar por perto

Para orar por mim a cada noite e dia

Para pegar na minha mão e me guiar através da vida

Para me ajudar a sempre ser verdadeiro...

De todos os anjos colocados na Terra

Meus anjos, pai e mãe, são vocês".

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e conquistas de todos os dias.

Aos meus pais pela graça de poder estudar sempre, pois esta etapa só seria possível com a ajuda deles. Também a todo o amor incondicional que me proporcionam, isto que dá vontade e alegria de viver e buscar conhecimento sempre para trazer orgulho para eles.

Agradeço ao meu irmão, que é meu melhor amigo e meu alicerce na vida, ponto de equilíbrio, força e fé!!!

Agradeço a todas as pessoas que participaram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho: alunos da graduação de medicina veterinária da Unoeste, aos residentes de reprodução, aos técnicos de laboratório, estagiários e trabalhadores da fazenda.

A todos os docentes do mestrado, obrigada pela paciência e pelos ensinamentos.

Obrigada ao meu orientador Dr. Professor Marcelo George Mungai Chacur, principalmente pela paciência e por todas as orientações, conselhos que com certeza serão levados por toda a vida.

“Haverá um dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais, e, nesse dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a humanidade.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Efeito dos Fatores Climáticos nos Parâmetros Seminais, nas Proteínas do Plasma Seminal, na Concentração Sérica de Cortisol e Testosterona e na Temperatura Escrotal em Touros Nelore (*Bos Taurus Indicus*)

Os touros têm uma grande influência sobre a composição genética dos rebanhos por isso é necessário conhecer as provas modernas de avaliação e aplicá-las, obtendo, assim, melhoramento genético para as características reprodutivas, por meio do uso de sêmen com qualidade. O espermiograma aliado às técnicas como termograma escrotal e a eletroforese, para detecção de possíveis proteínas do plasma seminal marcadoras de fertilidade poderão contribuir significativamente na escolha de reprodutores superiores. Neste estudo foram utilizados 10 touros da raça Nelore com idade de 24 meses criados em uma propriedade rural no município de Presidente Prudente –SP, que foram avaliados durante os meses de agosto a novembro, quando foram realizadas 12 colheitas de sêmen com intervalo de 15 dias. Foram realizados o espermiograma, a eletroforese do plasma seminal em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), aferida a temperatura da superfície do escroto, por meio de termometria de infravermelho para a obtenção do gradiente de temperatura escrotal destes animais e dosagem sérica de testosterona e cortisol. O ambiente foi monitorado diariamente, para as temperaturas mínima e máxima, umidade relativa do ar e índices pluviométricos. O objetivo deste estudo foi estudar a influência dos fatores climáticos na temperatura da superfície do escroto, espermiograma e perfil protéico (SDS-PAGE) do plasma seminal em touros Nelore, nas estações primavera e verão.

Palavras-chave: Touro Nelore; Sêmen; Termorregulação Testicular; Plasma Seminal.

ABSTRACT

Effect of Climatic Factors in Parameters Seminal, Plasma Seminal in Protein in Concentration of Serum Testosterone and Cortisol and Temperature in Bulls Scrotal Nelore (*Bos Taurus Indicus*)

The Bulls have a great influence on the genetic composition of livestock so it is necessary to know the evidence of modern evaluation and apply them, thus obtaining, breeding for reproductive traits through the use of semen quality. The spermogram conjunction with techniques such as scrotal thermogram and electrophoresis, to detect possible proteins in seminal plasma markers of fertility may contribute significantly to the selection of superior breeding. This study will use 10 Nelore bulls aged 30 months raised on a farm in the municipality of Presidente Prudente-SP, which will be evaluated during 6 months of the year (spring and summer), will be held 12 semen samples with an interval of 15 days. Be done spermogram electrophoresis on polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and the measured surface temperature for half of the scrotum infrared thermometer for obtaining the temperature gradient scrotal animals. The environment will be monitored daily for the minimum and maximum temperatures and relative humidity. The goal from study to study the influence of climatic factors on the surface temperature of the scrotum, spermogram and protein profile (SDS-PAGE) of seminal plasma in Nelore bulls in the spring and summer seasons

Keywords: Nelore bull. Semen. Hormones. Seasons of the Year

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Influência do Clima na Produção Espermática	11
2.2 Termometria da Superfície do Escroto	12
2.3 Morfometria do Escroto	14
2.4 Métodos de Colheita de Sêmen	15
2.5 Espermograma	16
2.5.1 Aparência e volume do sêmen.....	16
2.5.2 Turbilhonamento do sêmen.....	17
2.5.3 Motilidade espermática progressiva	17
2.5.4 Vigor espermático.....	18
2.5.5 Concentração espermática	18
2.5.6 Morfologia espermática	19
2.6 Proteínas do Plasma Seminal.....	20
REFERÊNCIAS	25
ARTIGO 1 - Efeito da Estação Seca e Chuvosa no Sêmen, Proteínas do Plasma Seminal e Hormônios em Touros Nelore Jovens.....	31
ARTIGO 2 - Avaliação do Sêmen e Termometria Escrotal por Infravermelho em Touros Nelore, <i>Bos Taurus Indicus</i> nas Estações Seca e Chuvosa.....	43

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é constituído por, aproximadamente, 80% de animais de origem indiana e seus mestiços. A sua posição no contexto da pecuária mundial é a de segundo colocado em termos quantitativos, porém qualitativamente o seu desempenho apresenta baixos índices reprodutivos e, em consequência, baixa produtividade.

Os touros têm uma grande influência sobre a composição genética dos rebanhos, sendo de extrema importância para as centrais de inseminação artificial e uso de touros a campo e para se determinar o potencial reprodutivo real de um touro a única alternativa é por meio do exame de suas funções reprodutivas onde se podem diagnosticar anormalidades em um ou mais órgãos genitais, problemas físicos ou qualidade espermática inferior, que podem determinar média ou baixa fertilidade e até mesmo esterilidade (SILVA; DODE, 1993).

Parâmetros convencionais utilizados para a avaliação espermática têm se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz, devido ao fato que cada espermatozóide apresenta múltiplos compartimentos com diferentes funções a serem avaliadas. Embora nenhuma técnica de avaliação tomada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen bovino (MAZIERO et al., 2009).

Os criadores devem ter cada vez mais consciência e interesse de conhecer as provas modernas de avaliação de touros e aplicá-las em seus rebanhos, obtendo melhoramento genético para as características reprodutivas, por meio do uso de sêmen com qualidade superior.

A avaliação espermática clássica, juntamente com novas técnicas de avaliação, como termograma escrotal e técnicas moleculares, como a eletroforese, para a detecção de possíveis proteínas do plasma seminal marcadoras de fertilidade, poderão contribuir significativamente na escolha de reprodutores superiores.

Em países de clima tropical como o Brasil, poucos são os trabalhos direcionados com o estudo dos fatores climáticos (altas temperaturas e umidade) na reprodução de touros. Desta forma, se faz importante a avaliação da produção de sêmen nessas condições climáticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Influência do Clima na Produção Espermática e na Concentração Séria de Testosterona e Cortisol

Existem diversos fatores que afetam a produção animal, entre eles a temperatura, umidade, nutrição, doenças e alterações ambientais de diferentes origens (HORN; MORAES; GALINA, 1999)

Para um funcionamento eficiente, os testículos dos mamíferos devem ser mantidos em uma temperatura entre 2 e 6°C abaixo que a temperatura corporal (KASTELIC; COOK; COULTER, 1995; WAITES, 1970). Características anatômicas dos testículos e do escroto permitem a regulação da temperatura testicular. Receptores de temperatura localizados na pele escrotal podem provocar respostas para diminuir a temperatura do corpo todo e provocar aumento da frequência respiratória e transpiração (ROBERTSHAW, et al., 1980). A pele do escroto é dotada de grande quantidade de glândulas sudoríparas adrenérgicas, e seu componente muscular, a túnica dartos, permite alterar a espessura e a área da superfície do escroto e modificar a proximidade de contato do testículo em relação ao corpo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

De acordo com Kastelic (2001), uma moderada elevação da temperatura testicular em touros submetidos à insulação escrotal reduz de forma drástica a produção espermática, a motilidade progressiva e a quantidade de espermatozóides vivos por ejaculado, e aumenta a porcentagem de espermatozóides morfologicamente anormais.

Mudanças climáticas que afetam a gametogênese podem levar a baixa eficiência reprodutiva em touros (VALE FILHO, 2001). Segundo Voglmayr et al. (1970) as altas temperaturas afetam o metabolismo dos espermatozóides

e conforme Waites e Setchell (1964), isto parece ser causado pela hipóxia que acomete o testículo quando este é exposto a altas temperaturas.

O estresse interfere na espermatogênese através de um mecanismo hormonal. Concentrações altas de testosterona são necessárias para a função testicular e epididimária normais. O LH estimula as células de Leydig a produzir e secretar testosterona e o FSH age nas células de Sertoli para a produção de proteína ligadora de andrógeno (ABP) a qual aumenta as concentrações de testosterona no túbulo seminífero. Com o estresse, há o aumento das concentrações de cortisol, que afetam negativamente a liberação de LH e conseqüentemente a produção de testosterona, interferindo na espermatogênese (BARTH; BOWMAN, 1994).

2.2 Termometria da Superfície do Escroto

A termografia infravermelha vem assumindo, em nível clínico e experimental, papel cada vez mais relevante por se tratar de um método seguro, não invasivo e capaz de analisar o estado de perfusão dos tecidos orgânicos, em várias e distintas situações, por meio de determinações precisas de temperatura (WATSON et al., 2002; DE WEERD; MERCER; SETSA, 2006; CADEDDU; JACKMAN; SCHULAM, 2001; SAXENA et al., 1999).

A termografia de infravermelho (TIV) tem sido empregada de várias formas nos animais de produção, como avaliação da qualidade da carne suína (SCHAEFER et al., 1989) e cobertura de penas em frangos (COOK et al., 2006); pode também auxiliar na avaliação do bem-estar (STEWART et al., 2005) resultantes das mudanças na temperatura da superfície corporal associada com as adaptações das mudanças da temperatura microclimática (KIMMEL; ARKIN; BERMAN, 1992; KNIZKOVA et al., 1996, 2002)

A termografia infravermelha também tem sido utilizada para avaliar a termorregulação escrotal e testicular em touros, fornecendo uma imagem pictórica das emissões de infravermelho (energia do calor irradiado), com uma precisão de 0,10°C (PUROHIT et al. 1985; COULTER, 1988). Para validar a termografia infravermelha como uma ferramenta de pesquisa ou

clínica, é essencial determinar os fatores que podem influenciar a medição da temperatura da superfície escrotal (KASTELIC et al., 1996a).

Estudos relacionados com qualidade espermática e temperatura da pele da superfície escrotal (PUROHIT et al., 1985; LUNSTRA e COULTER, 1997) e sua capacidade de resposta à temperatura ambiente (KASTELIC et al., 1996a, 1997) também foram avaliadas. Existe uma alta correlação da temperatura da superfície do escroto com a temperatura interna do testículo (GOLD et al., 1977; CENA; CLARCK, 1978) e o termograma por infravermelho (TIV) da superfície do escroto fornece informações precisas sobre a termorregulação testicular (PUROHIT et al., 1985; WOLFE et al., 1985; COULTER; SENGER; BAILEY, 1988).

De acordo com Kastelic (2001), uma moderada elevação da temperatura testicular em touros submetidos à insulação escrotal reduz, de forma drástica, a produção espermática, a motilidade progressiva e a quantidade de espermatozóides vivos por ejaculado, e aumenta a porcentagem de espermatozóides morfologicamente anormais.

Os efeitos deletérios da insulação escrotal na qualidade do sêmen dependem da duração da insulação, por isso a importância da termorregulação. A temperatura escrotal em touros deve estar de 4-5°C abaixo da temperatura corpórea (KASTELIC et al, 1996b), e isto justifica o uso da termometria como ferramenta de auxílio em um exame andrológico, para determinar a temperatura exata na superfície da pele escrotal.

As medições podem ser realizadas a qualquer hora do dia, a bolsa escrotal deve estar seca, e se estiver molhada ou úmida deve ser limpa e seca. Embora a temperatura da superfície escrotal possa ser mensurada ao longo de uma ampla gama de temperaturas ambientes, o ideal seria em temperaturas de moderadas a baixa (15°C/5°C). Mudanças bruscas de temperatura devem ser evitadas, pois podem alterar o termograma resultando em uma sobre compensação. A temperatura ambiente tem maior efeito na temperatura inferior da superfície do escroto e menor na temperatura superior. A técnica parece ser suficientemente válida para avaliações feitas em condições de campo, especialmente se os animais não estiverem

recentemente alimentados ou deitados, e se não existir mudanças drásticas na temperatura ambiente, por exemplo, grandes diferenças entre a área de exploração e a área de realização do exame (KASTELIC et al., 1996a).

A avaliação da termorregulação do escroto e dos testículos pela termografia infravermelha, seja para fins clínicos ou de investigação, deve ser realizada antes da coleta de sêmen, pois existe um aumento da temperatura da superfície do escroto, principalmente na parte inferior – área da cauda do epidídimo - logo após a ejaculação espontânea ou eletroejaculação, devido às contrações da cauda do epidídimo durante a ejaculação (KASTELIC et al., 1996b).

Dados preliminares de avaliações de touros exibiram qualidade de sêmen comprometida indicando que touros com termograma escrotal anormal produzem sêmen com motilidade reduzida e aumento de defeitos espermáticos (COULTER; SENGER; BAILEY, 1988; COOK; COULTER; KASTELIC, 1994). As médias para temperatura da superfície do escroto em diferentes temperaturas ambientes foram relatadas por Barros et al. (2009), e nas porções dorsal e medial dos testículos houve uma elevação desta temperatura com a elevação da temperatura ambiente.

Desta forma, relações entre o termograma infravermelho escrotal e os vários aspectos da qualidade e fertilidade do sêmen merecem maior investigação em touros de corte.

2.3 Morfometria do Escroto

No processo de seleção de touros reprodutores, preocupando-se em aumentar a precisão desta seleção, além de serem feitas avaliações das medidas do aparelho reprodutor, como o perímetro escrotal ou circunferência escrotal e avaliações quanti-qualitativas do sêmen, o volume e a forma dos testículos também ocupam lugar de destaque neste processo (BAILEY, et al., 1996;1998).

Programas de melhoramento genético enfatizam as características de desempenho ponderal, sendo a circunferência escrotal (CE) uma das poucas características reprodutivas que compõem os índices de

seleção adotados (YOKOO et al., 2007). Facilidade da medição, alta herdabilidade e correlação genética favorável com as características reprodutivas da fêmea aumentam a utilização desta característica em programas de seleção, visando o melhoramento da fertilidade do rebanho.

A CE apresenta estimativas de correlações genéticas positivas com características de sêmen e crescimento (KNIGHTS et al., 1984), mas somente a circunferência escrotal não constitui medida representativa da produção espermática, e, segundo Baley et al. (1996), testículos mais longos, como os encontrados nas raças zebuínas, apresentam maior superfície de contato com o meio ambiente, facilitando a termorregulação.; constataram também que testículos de formas alongadas apresentam volumes semelhantes às demais formas testiculares, sendo assim, favoráveis à reprodução.

2.4 Métodos de Colheita de Sêmen

Para realizar a colheita de sêmen, podem ser utilizados vários métodos, entre eles, a eletroejaculação, a vagina artificial e a massagem trasretal das glândulas acessórias (HAFEZ; HAFEZ, 2000; PALMER, 2005).

O método de obtenção do ejaculado deve ser tão eficiente que se obtenha o máximo de sêmen sem contaminação e de boa qualidade para avaliação do animal, podendo ser repetido sem prejuízo do animal (BUENO, 1999) e em função das vantagens e desvantagens destes métodos, os dois primeiros são os mais aplicáveis, respectivamente, à realidade diária do manejo em campo e nas centrais de inseminação (BATH, 1997).

A colheita do sêmen com a vagina artificial, por mimetizar as condições naturais da vagina, é a que mais se assemelha com a monta natural (LISLE, 1995; HAFEZ e HAFEZ, 2000; PALMER, 2005), no entanto exige um treinamento do touro doador e da vaca manequim, se não for usado um manequim inanimado. Este é o método mais indicado para evitar alterações comportamentais e fisiológicas dos animais (BARTH, 1997).

A eletroejaculação é geralmente utilizada para a realização de exame andrológico em touros, e em animais férteis, mas com incapacidade de realizar monta (MIES FILHO, 1987). As ejaculações obtidas com este método

apresentam grandes volumes. É comum touros fornecerem de 7 a 10mL de sêmen com 1,0 a 1,5 bilhões de espermatozoides/mL e com média de motilidade progressiva de 60 a 75% (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Geralmente, os touros se habitua com este método que não apresenta efeito desfavorável. No momento da passagem da corrente elétrica, o animal eleva o dorso e posiciona os membros posteriores para trás. As amostras recolhidas têm maior volume, porém menor concentração que as obtidas por vagina artificial, embora esta circunstância não tenha importância sobre a fecundidade do sêmen (DERIVAUX, 1980).

Diversos fatores podem diminuir a motilidade estimada da amostra de sêmen que é coletado com o auxílio do eletroejaculador, inferior às condições de campo. A presença de urina na amostra causa grande redução na motilidade, e esta urina pode vir na amostra quando usado o eletroejaculador (MORROW, 1986).

Na impossibilidade da utilização do eletroejaculador ou da vagina artificial para coletar o sêmen, pode-se obter uma amostragem por meio de massagem dos órgãos genitais internos, nas vesículas seminais e ampolas dos ductos deferentes (SILVA; DODE, 1993). Este é um método muito limitado para a obtenção de esperma para inseminação artificial, apesar do sêmen ser mais concentrado do que o obtido pela eletroejaculação (SILVA; DODE, 1993).

2.5 Espermiograma

2.5.1 Aparência e volume do sêmen

O sêmen deve ser relativamente uniforme e de aparência opaca, o que indica alta concentração espermática. Os touros podem apresentar sêmen amarelado, que indica a presença de riboflavina, substância inócua e que não deve ser confundida com presença de urina no sêmen, diferenciada por meio do odor. O pequeno volume não é prejudicial, mas se acompanhado de baixa concentração espermática, a produção total diminui (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O volume é representado em mililitros (mL) e lido na graduação do copo coletor ou mensurado com uma pipeta graduada. O parâmetro mínimo para touros com idade superior a dois anos é de 4mL, enquanto para touros jovens é de 2mL (ROSENBERGER, 1990).

2.5.2 Turbilhonamento do sêmen

É o movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen. A intensidade do movimento é resultante da motilidade, do vigor e da concentração espermática (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Para se avaliar o turbilhonamento, coloca-se uma gota de sêmen, recém-colhido, sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C e leva-se ao microscópio convencional, com aumento de 100 vezes. A interpretação é subjetiva (escore de 0 a 5) e exige treinamento para que esta característica seja corretamente avaliada (FONSECA et al., 1991).

2.5.3 Motilidade espermática progressiva

A determinação da motilidade envolve análises subjetivas da viabilidade dos espermatozóides e da qualidade da motilidade. A análise em microscópio óptico é a mais comumente utilizada (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Constitui-se num dos mais importantes aspectos físicos do sêmen em todas as espécies domésticas. A motilidade é dada em porcentagem (0 a 100:%) e significa o número de espermatozóides com motilidade progressiva em cada 100 deles observados. É de extrema importância considerar apenas os espermatozóides com motilidade retilínea e progressiva. Portanto, não devem ser considerados móveis aqueles com movimentos circulares e oscilatórios (FONSECA et al., 1991).

A motilidade espermática é extremamente suscetível às condições ambientais, excesso de calor ou de frio, de modo que é necessário proteger o sêmen de condições ou agentes que podem prejudicar a análise. O sêmen fresco deve ser preparado em fina camada sobre uma lâmina coberta com lamínula de modo que as células sejam visíveis individualmente.

Geralmente utiliza-se aumento de 200X a 400X para a estimativa da motilidade (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A motilidade sofre efeito de estacionalidade, seja ela representada pela temperatura, nutrição ou umidade relativa (SILVA; DODE, 1993).

2.5.4 Vigor espermático

A motilidade progressiva individual ou vigor do espermatozóide é dada em uma escala de 0 a 5, que representa a intensidade de deslocamento da célula no campo do microscópio (MIES FILHO, 1987).

A seleção de touros com alto vigor espermático é importante dentro das características reprodutivas (CHACUR et al., 2003).

2.5.5 Concentração espermática

A concentração é outro dos aspectos físicos do sêmen de maior importância, pois se a colheita for corretamente realizada, indica a eficiência dos túbulos seminíferos para produzir espermatozóides. A concentração espermática associada à motilidade, ao vigor e ao volume, confere ao sêmen o turbilhonamento, que é visto somente nos ruminantes (FONSECA et al., 1991).

De acordo com ROSENBERGER (1990), a definição para concentração do ejaculado bovino é o número de espermatozóides (em milhões) por milímetro cúbico (mm^3). Para sua determinação, recomenda-se a contagem das células espermáticas em uma câmara de contagem de células sangüíneas. O sêmen é diluído na proporção de 1:200. Posteriormente, as duas metades de uma câmara de contagem de Neubauer, preparada da forma rotineira, são preenchidas, usando-se uma pipeta capilar, com o sêmen já previamente diluído contido no tubo de ensaio. A câmara precisa permanecer em repouso horizontal, no mínimo por cinco minutos, para que os espermatozóides se sedimentem no fundo. Finalmente, é realizada a contagem dos espermatozóides encontrados em cinco quadrados grandes, em microscópio óptico, em aumento de 200X. Na contagem, consideram-se

apenas as cabeças dos espermatozóides, incluindo aquelas que se encontram sobre a linha esquerda inferior, e também as cabeças destacadas.

A concentração (C) calculada a partir da seguinte fórmula:

$$C \text{ (milhões/mm}^3\text{)} = (N / a \times h \times d) \times 10.000$$

Onde:

N: total de células contada (n)

C = concentração

a = área contada (5/25 mm²)

h = altura da câmara (1/10 mm)

d = diluição utilizada (1/200)

Este método pode ser substituído por um espectrofotômetro ou por um colorímetro calibrado a um hemocítmetro. Eles apresentam a vantagem de serem precisos e rápidos. O espectrofotômetro é preferível para a determinação da concentração espermática (HAFEZ; HAFEZ, 2004)

2.6 Morfologia Espermática

Toda amostra de sêmen possui células espermáticas anormais. As anormalidades morfológicas dos espermatozóides apresentam a mais alta relação com a fertilidade dos rebanhos. A fertilidade diminui geralmente quando as células espermáticas anormais excedem 20% (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Para a microscopia de contraste de fase, após homogeneização, toma-se uma gota da solução de formol-salina e sêmen e coloca-se entre lâmina e lamínula (preparação úmida). Esta técnica exige uma microscópio especial e está limitada a poucos laboratórios. Este é um método que deve ser utilizado quando o de "lâminas coradas" deixa dúvidas quanto à avaliação de anormalidades das células espermáticas (SILVA; DODE, 1992).

O estudo morfológico dos elementos figurados do sêmen necessita de recursos de preparações coradas. Diversos meios de coloração têm sido utilizados, alguns são empregados simplesmente com a finalidade de melhor destacar a morfologia geral dos espermatozóides, enquanto que outros,

denominados colorações vitais, permitem diferenciar os espermatozóides vivos dos mortos, determinando-se a porcentagem de cada ocorrência (DERIVAUX, 1980).

O corante Panótico Rápido® demonstrou ser eficiente para a coloração de esfregaços de sêmen, possibilitando a identificação de alterações morfológicas nos espermatozóides sendo uma técnica rápida e prática (CHACUR et al., 2001, 2004).

Os defeitos maiores ocorrem durante o processo da espermiogênese, portanto dentro dos testículos, atribuindo a estes defeitos os de cabeça, peça intermediária e cauda (FONSECA et al., 1991). Estes defeitos não podem ultrapassar 20% e, cada forma individual 5%, em caso contrário, a eficiência reprodutiva na monta natural estará comprometida (FONSECA et al., 1992).

Já os defeitos menores surgem após os espermatozóides terem deixado os testículos, conseqüentemente, durante sua passagem pelo epidídimo e ou durante a ejaculação ou manipulação do sêmen (FONSECA et al., 1991). Não devem ultrapassar um total de 25%, e 10% de anormalidades individuais, pois reduzem a fertilidade, porém devem-se levar em conta as condições da realização do exame (SILVA; DODE, 1993).

O total de anormalidades, de acordo com o Ministério da Agricultura, não deve ultrapassar 30% numa contagem de, no mínimo, 200 células espermáticas (SILVA; DODE, 1993).

2.7 Proteínas do Plasma Seminal

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 fecundação (CHACUR; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006). O espermatozóide tem a capacidade de ligar-se à heparina e às moléculas semelhantes, como as glicosaminoglicanas (GAGs) da tuba uterina. Esta ligação tem sido associada à presença de proteínas do plasma seminal ligadas à superfície espermática, o que leva a

modulação do acrossomo induzida pelas glicosaminoglicanas da zona pelúcida (MILLER; WINER, 1990).

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; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006).

As diferenças na fertilidade observadas entre os animais, muitas vezes não são detectadas pelos testes rotineiros empregados na avaliação da qualidade do sêmen. Neste sentido, estudos desenvolvidos mostram que há evidência de associações significativas entre a expressão de proteínas seminais e a fertilidade dos machos avaliada “in vivo” e “in vitro”. Tais proteínas são candidatas a marcadores moleculares da fertilidade e congelabilidade (KILLIAN; CHAMPAN; ROGOWSKI, 1993; MOURA; CHAMPAN; KILLIAN, 2006a, 2006b; MOURA et al. 2007).

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).

Segundo Manjunath (1987); Gasset (1997); Montario (1988); Einspanier (1991) e Roncoletta et al. (1999), os perfis eletroforéticos do plasma seminal auxiliam a avaliação clínica, em casos de infertilidade em touros.

As principais proteínas presentes no plasma seminal de bovinos são as proteínas ligadoras de heparina, as BSPs (Proteínas do plasma seminal bovino) (CHANDONNETE et al., 1990), sendo estas produzidas pela vesícula seminal e se ligam ao espermatozóide durante a ejaculação e as GAGs no trato reprodutivo feminino (MANJUNATH et al., 1993).

O estudo do perfil proteico do plasma seminal dos reprodutores zebuínos e taurinos e a relação do mesmo com a fertilidade vem sendo alvo de compilações na literatura, visando esclarecer o papel de dezenas de proteínas na produção de efeitos benéficos ou não para a fertilidade bovina (CHACUR et al, 2012).

A eletroforese de proteínas é geralmente executada em géis de um polímero que apresenta ligações cruzadas, a poliacrilamida. O gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, em que as moléculas de menor peso migram verticalmente mais facilmente pelo gel e as moléculas de maior peso molecular ficam retidas na porção superior do gel. A porosidade deste gel de poliacrilamida pode ser escolhida, sendo que quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros da malha formada (ROCHA et al., 2005).

Durante a eletroforese de proteínas, a taxa de migração ou mobilidade eletroforética é influenciada pela carga protéica no meio eletroforético, assim como pela sua forma, tamanho e associação com outros compostos ionizáveis. Os componentes dos extratos protéicos migram com velocidades individuais em um campo elétrico (ALFENAS, 1998).

Um método eletroforético comumente utilizado para estimar a pureza e o peso molecular utiliza o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS liga-se as proteínas, provavelmente por ligações hidrofóbicas em quantidades aproximadamente proporcionais ao peso molecular da proteína, cerca de uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos (NELSON; COX, 2002). Grande parte da carga negativa do SDS mascara a carga intrínseca da proteína; logo, as proteínas tratadas com SDS tendem a apresentar relações carga-massa idêntica e formas semelhantes. Conseqüentemente, a eletroforese de proteínas em um gel de poliacrilamida contendo SDS separa as amostras na ordem das suas massas moleculares devido ao efeito filtrador do gel (VOET; VOET, 2006).

Estudos realizados por Bellin, et al (1994) identificaram, no plasma seminal bovino, algumas proteínas ligadoras de heparina (HPB) 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).

Peptídeos de 12, 30, 55, 66, 80, 90 e 105 KDa, quando presentes no plasma seminal, contribuem positivamente com o quadro espermático (CHACUR; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006).

São conhecidas várias funções das proteínas presentes no plasma seminal, tanto as que colaboram com a qualidade do sêmen quanto as que são desfavoráveis para as funções dos espermatozóides, agindo dessa forma a favor ou não da fertilidade. Conforme publicado por Bergeron (2004), a proteína com 13 kDa participa da capacitação espermática, colaborando de forma positiva com a fertilidade.

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

A osteopontina foi localizada nas ampolas e vesículas seminais, mas não foi detectada no testículo, epidídimo, canal deferente, próstata e glândulas bulbouretrais, indicando que esta proteína não se ligaria ao espermatozóide, ou teria apenas uma associação transitória com a membrana espermática (CANCEL et al., 1999).

A banda protéica de 20 kDa do plasma seminal pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermática, após a mesma ser submetida ao choque térmico pelo frio, no qual se rompe a membrana (BARRIOS et al., 2000). Na década de 80, Kemme et al. (1984) citaram a proteína de 20 kDa como *seminalplasmim*, promotora de alta fertilidade com ação antimicrobiana no sêmen.

Killian, Champan e Rogowski (1993) demonstraram análises dos perfis eletroforéticos das proteínas das membranas dos espermatozóides, comparando com a fertilidade de touros, e encontraram associações de duas proteínas 26 KDa pI (ponto isoelétrico) 6,2 e 55KDa 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, Martinez e Machado Neto (2006) a presença de peptídeos de 10, 16 e 26KDa no plasma seminal interferem de forma negativa na aptidão reprodutiva.

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 espermatozóides (KILLIAN; CHAMPAN; ROGOWSKI, 1993).

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 6,5KDa a 205KDa, no inverno, e de 14,9KDa a 80Kda, no verão, concluindo que as proteínas de 20, 55, 66 e 80KDa contribuíram de forma positiva para a qualidade do sêmen, sendo que a proteína de 20KDa esteve presente no inverno e no verão (CHACUR; MACHADO NETO, 2007).

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. (Ed). **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998, 574 p.
- BALEY, T. L. et al. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, n.10, p.581-598, 1998.
- BALEY, T. L. et al. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 881-887, 1996.
- BARRIOS, B. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-schock damage of ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, p. 1531-1537, 2000.
- BARROS, C. M. Q. et al. Efeito da temperatura ambiente sobre as temperaturas escrotal, intratesticular, intravascular e fluxo sanguíneo testicular de touros. **Vet. e Zootec.**, v. 16, n. 2, p. 354-362, jun., 2009.
- BARTH, A. D. Evaluation of potencial breeding soundness of the bull. In: Youngquist, R.S. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. [s.l.]: Soundres company, 1997. p.222-236.
- BARTH, A. D., BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexametasone treatment in bulls. **Can. Vet. J.**, v. 35, p. 93-102, 1994.
- 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**, v. 76, p. 2441-2448, 1994.
- BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal plasma of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Ceres, 2004.
- CADEDDU, J. A.; JACKMAN, S. V.; SCHULAM, P. G. Laparoscopic infrared imaging. **J. Endourol.**, v. 15, n. 1, p. 111-6, 2001.
- CANCEL, A. M. et al. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 454-460, 1999.
- CENA, K.; CLARK, J. A. Veterinary applications of thermography. **Acta Thermographica**, v. 3, p. 135-141, 1978.

CHACUR, M. G. M. et al. Influência da estação do ano nas características do sêmen e na concentração de hormônios em touros Nelore e Simental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 3, p. 540-546, 2012.

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.

CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. Perfil SDS-PAGE do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore *Bos taurus indicus*. **Veterinária notícias**, v.1 2, n. 1, p. 87-93, 2006.

CHACUR, M.G.M. et al. Season influence u seminal plasma proteins in bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro, 2004. v. 1, p. 236.

CHACUR, M. G. M. et al. Fertility selection in bulls and seminal plasma proteins, spermatic evaluation correlation. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 185-186, 2003.

CHACUR, M. G. M. et al. Importance of ultrasonography in diagnosis of seminal vesiculitis and acrobustitis in bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 260-262, 2001.

CHANDONNETE, L. et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction Development**, v. 26, p. 313-318, 1990.

COOK, N. J. et al. Assessing feather cover of laying hens by infrared thermography. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 15, p. 274-279, 2006.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology** , v. 41,p. 653-671, 1994.

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

COULTER, G. H.; SENGER, P. L.; BAILEY, D. R. C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular in the ram. **J. Reprod. Fertil.**, v. 84, p. 417-423, 1988.

DE WEERD, L.; MERCER, J. B.; SETSA, L. B. Intraoperative dynamic infrared thermography an free-flap surgery. **Ann. Plast. Surg.**, v. 57, n. 3, p. 279-84, 2006.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1980. p. 133-148.

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.

FONSECA, O. F. et al. **Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. 79 p.

FONSECA, V.O. et al. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. p. 1-79.

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

GOLD, R. H. et al. Scrotal termography. **Radiology**, v. 122, p. 129-132, 1977.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animais**. 7.ed. São Paulo: [s.n.], 2000.

HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; GALINA, C. S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus – Ibagé frente a degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, p. 523-526, 1999.

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

KASTELIC, L. et al. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality en 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, n. 65, p. 111-115, 2001.

KASTELIC, J. P. et al. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 153-159, 1996a.

KASTELIC, J. P. et al. Ejaculation increases scrotal surface temperature in bulls with intact epididymides. **Theriogenology**, v. 46, p. 889-892, 1996b.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Insulation the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull.

Theriogenology, v. 45, p. 935-941, 1995.

KEMME, M. et al. Hoppe. **Seyler's Z. Physiol. Chem.**, v. 365, p. 1173-1181, 1984.

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

KIMMEL, E.; ARKIN, H.; BERMAN, A. Evaporative cooling of cattle: transport phenomena and thermovision. **Am. Soc. Agric. Eng.**, p.14, 1992.

KNIGHTS, S. A. et al. Estimates of heritabilities and of genetic and phenotypic correlations among growth and reproductive traits in yearling Angus bulls. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 4, p. 887-893, 1984.

KNIZKOVA, I. et al. Evaluation of naturally ventilated dairy barn management by a thermographyc method. **Livest. Prod. Sci.**, v. 77, p. 349-353, 2002.

KNIZKOVA, I. et al. Evaluation of evaporative cooling on the changes of cattle surface body temperatures with use of thermovision. **Zivocisna Vyroba**, v.41, p. 433-439, 1996.

LUNSTRA, D. D.; COULTER, G. H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 767-774, 1997.

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.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal casicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 27-37, 1993.

MAZIERO, R. R. D. et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 6.ed. [s.l.]: Sulina, 1987. v.1, 359 p.

MILLER, D.J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 899-915, 1990.

MORROW, D. A. Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia: [s.n.], 1986. v.2. p. 132-133.

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

MOURA, A. A. et al. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocytepenetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 214-222, 2007.

MOURA, A. A.; CHAMPAM, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J Androl**, v. 27, p. 201-211, 2006a.

MOURA, A. A.; CHAMPAM, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **J Androl**, v. 27, p. 534-541, 2006b.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to eletroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 469-479, 2005.

PUROHIT, R. C. et al. Thermography of the bovine scrotum. **J. Am. Med. Assoc.**, v.1 86, p. 2388-2392, 1985.

ROBERTSHAW, D.; VERCOE, J. E. Scrotal thermoregulation of the bull. **Aust. J. Agric. Res.** 31:401, 1980

ROCHA, T. L. et al. Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas. **Embrapa Comunicado Técnico**, v. 136, 2005.

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

ROSENBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 420.

SAXENA, A. K. et al. Thermography of Clostridium perfringens infection in childhood. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 15, n. 1, p. 75-6, 1999.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidade e fatores que a influenciam**. Campo Grande: Embrapa – CNPGC, 1993. p.128, (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 51).

STEWART, M. et al. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. **Anim. Welf.** v. 14, p. 319-325, 2005.

VALE FILHO, V. R. do. Subfertilidade em touros: Parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte: F.E.P.M.V.Z. n. 35, p. 81-87, ago. 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 149-150.

VOGLMAYR, J. K. et al. The effect of heating the testis on the metabolism of testicular spermatozoa and the testis fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 21, p. 365-366, 1970.

WAITES, G. M. H. Temperature regulation and the testis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDERMARK, N.L. **The testis**. New York: Academic Press. p. 241-179, 1970.

WAITES, G. M.; SETCHELL, B. P. Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 8, n. 1, p. 339-349, 1964.

WATSON, J. C. et al. Real-time detection of vascular occlusion and reperfusion of the brain during surgery by using infrared imaging. **J. Neurosurg**, v. 96, n. 5, p. 918-23, 2002.

WOLFE, D. F. et al. Effect of unilateral orchiectomy on semen quality in bulls. **J. Am. Vet. Assoc.**, v. 186, p. 1291-1293, 1985.

YOKOO, M. J. et al. Estimativas de parâmetros genéticos para altura do posterior, peso e circunferência escrotal em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1761-1768, 2007.

1 EFEITO DA ESTAÇÃO SECA E CHUVOSA NO SÊMEN, PROTEÍNAS DO
2 PLASMA SEMINAL E HORMÔNIOS EM TOUROS NELORE JOVENS
3 (*Effect of dry and rainy season on semen, plasma seminal proteins and hormones in*
4 *young Nellore bulls*)
5

6 **A.A. SILVA^{1*}; B. F. AGOSTINHO¹; L. GUALBERTO¹; L. R. A. G. FILHO²;**
7 **MARTINS, E. A.F¹; E. OBA³; M. G. M. CHACUR¹**
8

9 ¹ Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente

10 ² Universidade Estadual Paulista – UNESP, Tupã

11 ³Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu

12 *alinemedvet@yahoo.com.br
13

14 **RESUMO**

15 O objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito das estações seca e chuvosa na
16 qualidade do sêmen, perfil proteico do plasma seminal e concentrações séricas de
17 cortisol e testosterona em touros Nelore jovens, criados extensivamente. Utilizou-se 10
18 touros da raça Nelore na estação seca e chuvosa. Foram realizadas seis colheitas de
19 sêmen por animal em cada estação por meio de eletroejaculação com intervalos de 14
20 dias. O sêmen foi analisado quanto às características quantitativas e qualitativas e o
21 plasma seminal centrifugado a 1500g/15min para extrair proteínas e realizar a
22 eletroforese em SDS-PAGE. Efetuaram-se colheitas de sangue para quantificar cortisol
23 e testosterona por radioimunoensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância
24 e os grupos comparados pelo teste de Tukey a 5%. Na estação seca, houve superioridade
25 ($P < 0,05$) para motilidade, concentração espermática, defeitos menores e totais. As
26 bandas proteicas encontradas variaram entre 8 e 139 kDa. Para testosterona e cortisol
27 não houve diferença ($p > 0,05$) entre estações. Conclui-se que na estação seca a qualidade
28 do sêmen em geral foi superior. A estação seca e chuvosa não influenciou, de forma
29 significativa, a síntese de cortisol e testosterona. A composição proteica do plasma
30 seminal e a incidência das bandas sofreram variação devido à influência das estações.

31 **Palavras-chave:** Estação do ano, sêmen, SDS-PAGE, Cortisol, Testosterona.
32

33 **SUMMARY**

34 The aim of this study is to evaluate the effect of dry and wet seasons in semen quality,
35 seminal plasma protein profile and serum cortisol and testosterone in young Nellore

36 bulls, bred extensively. We used 10 Nelore bulls in the dry and rainy seasons. Six
37 harvests were made per animal semen in each station by means of electro at intervals of
38 14 days. Semen was analyzed for quantitative and qualitative characteristics and
39 seminal plasma centrifuged at 1500g/15min to extract proteins and perform
40 electrophoresis on SDS-PAGE. We carried out blood samples to measure cortisol and
41 testosterone by radioimmunoassay. Data were subjected to analysis of variance and
42 groups compared by Tukey test at 5%. In the dry season, there was superior ($P < 0.05$)
43 motility, sperm concentration, total and minor defects. Protein bands found varied
44 between 8 and 139 kDa. For testosterone and cortisol did not differ ($p > 0.05$) between
45 stations. It is concluded that in the dry semen quality was higher. The dry and rainy
46 seasons did not influence significantly the synthesis of cortisol and testosterone. The
47 protein composition of seminal plasma and incidence of bands suffered variation due to
48 the influence of the seasons.

49 **Keywords:** Season, semen, SDS-PAGE, Cortisol, Testosterone

50

51

52

INTRODUÇÃO

53 A fertilidade dos touros é importante para a eficiência reprodutiva em regime de
54 produção extensiva (Barth e Bowman, 1994), e as mudanças climáticas que afetam a
55 gametogênese podem levar a baixa eficiência reprodutiva em touros (Vale Filho, 2001).

56 A variação sazonal foi abordada com enfoque nas características físicas e
57 morfológicas do sêmen em bovinos criados nos trópicos, descrevendo que a queda na
58 qualidade do sêmen pode ocorrer devido ao desconforto térmico dos animais frente às
59 elevadas temperaturas (Galina e Arthur, 1991).

60 Proteínas solúveis e estruturais do plasma seminal têm um importante papel no
61 metabolismo do espermatozoide, com interferência na fertilidade dos touros (Roncoletta
62 et al., 2004), e as análises dos perfis proteicos do sêmen de touros mostram relação com
63 a alta e a baixa fertilidade, sendo uma ferramenta valiosa para identificar a presença de
64 proteínas relacionadas à fertilidade (Gaviraghi et al., 2010).

65 Diniz et al. (2004) descreveram técnicas de identificação de marcadores
66 moleculares para alta fertilidade, relatando a habilidade dos espermatozoides em
67 fecundar, conjuntamente com as características seminais e a reação acrossômica. Um

68 grande número de investigações correlacionam o peso molecular de algumas proteínas
69 do plasma seminal com a fertilidade em reprodutores.

70 Correlações significativas têm sido demonstradas entre a concentração sérica de
71 testosterona, a fertilidade e a motilidade espermática em touros; onde altas
72 concentrações de cortisol refletem na maior agressividade dos reprodutores, tornando-os
73 não interessantes para a atividade de reprodução (Santos et al., 2000). O objetivo do
74 presente estudo foi de avaliar o efeito das estações seca e chuvosa na qualidade do
75 sêmen, perfil proteico do plasma seminal e concentrações séricas de cortisol e
76 testosterona em touros Nelore jovens, criados extensivamente.

77

78 MATERIAL E MÉTODOS

79 *Animais e local do experimento*

80 Foram utilizados 10 touros jovens da raça Nelore com idade média de 24 meses,
81 criados extensivamente em pasto de *Brachiaria decumbens*, com sal mineral e água *ad*
82 *libidum* em propriedade do município de Presidente Prudente – SP.

83 O experimento foi realizado em duas etapas: etapa 1 - estação seca (meses de
84 agosto e setembro) e etapa 2 - estação chuvosa (outubro e novembro).

85 O município onde foi realizado o experimento apresenta latitude 21°29'50"S,
86 longitude 49°14'2"W e altitude de 475m. Em 2010, ano do experimento, a temperatura
87 média nos meses de agosto e setembro foram 22,8°C e 24,6°C, e nos meses de outubro e
88 novembro de 23,4°C e 24,5°C, respectivamente.

89 Na estação seca, a média do índice pluviométrico foi de 0 mm e 10,2 mm em
90 agosto e setembro, e na estação chuvosa foi de 28 mm e 30 mm em outubro e
91 novembro, respectivamente. A umidade relativa do ar nos meses de agosto e setembro
92 foram de 70,7% e 72,3% e nos meses de outubro e novembro foram de 80,2% e 80,6%,
93 respectivamente.

94

95 *Colheita e processamento das amostras*

96 Após a identificação, os touros foram submetidos ao exame do aparelho
97 reprodutor e do sêmen, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
98 (Manual..., 1998).

99 Foram realizadas 6 colheitas de sêmen por touro em cada estação, por meio de
 100 eletroejaculador automático (Autoejac®, Neovet, Brasil), totalizando 120 amostras, 60
 101 por estação, com intervalo de 14 dias entre as colheitas. Feitas as avaliações
 102 quantitativas e qualitativas do sêmen realizadas na propriedade e no Laboratório de
 103 Reprodução Animal da UNOESTE, as amostras foram centrifugadas a 1.500g/15min,
 104 para a separação do plasma seminal o qual foi armazenado em criotubos a -20°C para a
 105 posterior realização da eletroforese em SDS-PAGE (LAEMILI, 1970) no Laboratório
 106 de Biologia Molecular da UNOESTE com extração das proteínas (BRADFORD, 1976)
 107 e quantificação das mesmas em espectrofotômetro (PF-901 Chemistry Analyser
 108 Labsystems).

109 A extração das proteínas foi realizada com a utilização de tampão composto por:
 110 buffer A – TRIS HCl (6,0mL) pH 6,8 (4,0mL), glicerol (6,4mL), SDS 10% (6,4 mL),
 111 mercaptoetanol (1,6mL) e água destilada (13,6mL), colocando em tubo de ensaio
 112 200µL de amostra e 1000µL do tampão de extração para cada amostra, mantendo por 3
 113 minutos em ebulição. Logo após, as proteínas foram quantificadas em
 114 espectrofotômetro com solução contendo: Bradford (4,5mL); NaCl 0,15M (0,45mL) e
 115 amostra de proteína (0,05mL). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida
 116 (SDS-PAGE) em cuba vertical (Omniphor®) ligada à fonte elétrica (PWSYS EI®)
 117 (50V x 50mA por 30 minutos e 300V x 16mA por 12 horas). A revelação das bandas
 118 protéicas foi feita em solução a 2% de *Coomassie blue* R-25010, com posterior
 119 utilização de transluminador (Doc-IT-LS® 6.0 software) permitindo a captura,
 120 visualização e o processamento das imagens das bandas proteicas reveladas nos géis.

121 Foram realizadas 2 colheitas de sangue por venopunção jugular, junto da
 122 primeira e última colheita de sêmen de cada grupo, o sangue foi centrifugado a
 123 1500g/15 minutos e o soro armazenado em criotubos a -20°C, para posterior dosagem
 124 de cortisol e testosterona, pelo método de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se quites
 125 comerciais (DPC - Medlab®).

126 Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o *software*
 127 SigmaEstat e BioEstat para ANOVA não paramétrica. As médias e o desvio padrão

128 foram calculados pelas seguintes equações: $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ e

129 $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ respectivamente. E na comparação das médias entre os grupos foi

130 utilizado o teste de Tukey a 5%, sendo: $\Delta 5\% = q \frac{s}{\sqrt{r}}$ (FERREIRA, 2000)

131 O projeto de pesquisa foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da
132 UNOESTE, sob o protocolo 908.

133

134

RESULTADOS E DISCUSSÃO

135 Para as características quantitativas e qualitativas do sêmen, houve diferença
136 ($p < 0,05$) para a motilidade espermática de $75,50 \pm 17,21\%$ na estação chuvosa em
137 relação à estação seca com $66,67 \pm 19,61\%$. A concentração espermática foi superior
138 ($p < 0,05$) na estação seca ($461,71 \pm 332,12 \times 10^6/\text{mL}$) em relação à chuvosa
139 ($267,25 \pm 127,82 \times 10^6/\text{mL}$). Houve diferença ($p < 0,05$) entre os defeitos espermáticos
140 menores na estação seca ($5,26 \pm 3,23\%$) em relação à chuvosa ($7,80 \pm 5,99\%$). Na época
141 da chuva houve maior porcentagem ($p < 0,05$) de defeitos totais ($13,24 \pm 8,25\%$) em
142 relação à estação seca ($9,64 \pm 4,58\%$), conforme ilustra a Tabela 1. A despeito das
143 diferenças observadas e acima descritas, o quadro espermático dos touros nas duas
144 estações estudadas, esteve dentro dos limites preconizados para fins de uso dos machos
145 bovinos para a monta natural, conforme normas do Manual para avaliação de sêmen
146 animal (1998), denotando equilíbrio da espermatogênese nas estações avaliadas.

147

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DO SÊMEN EM TOUROS DA RAÇA NELORE NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA.

Variáveis	Estação Seca	Estação Chuvosa	p valor
Volume (mL)	5,62±2,12	5,57±2,40	0,920
Motilidade (%)	75,50±17,21	66,67±19,61	0,010*
Vigor (1-5)	3,85±1,13	3,78±1,06	0,740
Turbilhonamento (1-5)	2,37±1,89	2,20±2,06	0,646
Concentração ($\times 10^6/\text{mL}$)	461,71±332,12	267,25±227,82	0,002*
Defeitos maiores (%)	4,39±2,91	5,51±3,59	0,063
Defeitos menores (%)	5,26±3,23	7,80±5,99	0,005*
Defeitos totais (%)	9,64±4,58	13,24±8,15	0,003*

148 *Diferença significativa a 5%.

149

150

151 O estudo do perfil proteico do plasma seminal dos reprodutores zebuínos e
 152 taurinos e a relação do mesmo com a fertilidade vêm sendo alvo de compilações na
 153 literatura, visando esclarecer o papel de dezenas de proteínas na produção de efeitos
 154 benéficos ou não para a fertilidade bovina (Chacur, 2012). Dentro dessa premissa, serão
 155 apresentadas algumas considerações sobre as bandas proteicas observadas no presente
 156 estudo.

157 Com relação à eletroforese, diferenças individuais entre os perfis em SDS-PAGE
 158 das proteínas do plasma seminal foram observadas nos géis, estando presentes cadeias
 159 polipeptídicas com pesos entre 20 a 134 kDa na estação seca (Tabela 2) e (Figura 1) e
 160 de 8 a 139 kDa na estação chuvosa (Tabela 2 e Figura 2).

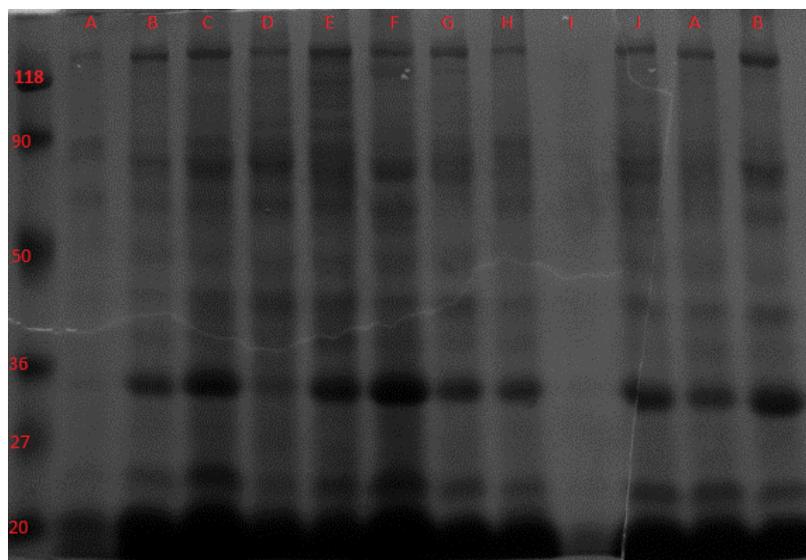
161

TABELA 2 - FREQUÊNCIA DE BANDAS PROTÉICAS E PESO MOLECULAR (kDa) DE PROTEÍNAS PRESENTES NO SÊMEN DE TOUROS NELORE NAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA.

TOUROS	kDa	Estação	TOUROS	kDa	Estação
	(n=20)	Seca		(n=20)	Chuvosa
A,B,C,D,F,G,H,I	20	8/10 (80%)	J	8	1/10 (10%)
B,E	21	2/10 (20%)	A,B,C,F,G,J	13	6/10 (60%)
A,B,C,F,G,H,I,J	22	8/10 (80%)	G,H,J	15	3/10 (30%)
B,D,E,F	23	4/10 (40%)	B,D,F	16	3/10 (30%)
A,B,F,H,J	31	5/10 (50%)	A,B,C,D,E,F,G,I,J	18	9/10 (90%)
A,B,C,D,G,H,I,J	32	8/10 (80%)	G,H,I	20	3/10 (30%)
D,E,F,I	33	4/10 (40%)	A,C,D,E	22	4/10 (40%)
H,J	39	2/10 (20%)	J	28	1/10 (10%)
E,F,G,H,I,J	43	6/10 (60%)	A,C,D,E,G	32	5/10 (50%)
E,G,H,J	48	4/10 (40%)	A,F,H,J	34	4/10 (40%)
F,I	50	2/10 (20%)	B,D	35	2/10 (20%)
D,F,H	60	3/10 (30%)	C,G,I,J	36	4/10 (40%)
C,E,G,I	63	4/10 (40%)	C,D,G,H,J	38	5/10 (50%)
E,I	72	2/10 (20%)	C,E	42	2/10 (20%)
A,C,I	76	3/10 (30%)	A,D,J	44	3/10 (30%)
A,B,F,H	77	4/10 (40%)	B,D,F	48	3/10 (30%)
C,E,J	80	3/10 (30%)	E,J	50	2/10 (20%)
D,G,J	82	3/10 (30%)	C	61	1/10 (10%)
F	87	1/10 (10%)	A	63	1/10 (10%)
E	89	1/10 (10%)	I	73	1/10 (10%)
H	97	1/10 (10%)	C,D	75	2/10 (20%)
A	112	1/10 (10%)	A,E	80	2/10 (20%)
E	125	2/10 (20%)	B,E	84	2/10 (20%)
D,F,H	127	3/10 (30%)	A,B,F,I	88	4/10 (40%)
A,G	128	2/10 (20%)	J	90	1/10 (10%)
B,I	129	2/10 (20%)	B,C,D,E,F,G,H,I,J	127	9/10 (90%)
A,C,D,E,H,I,J	131	7/10 (70%)	A,I	129	2/10 (20%)

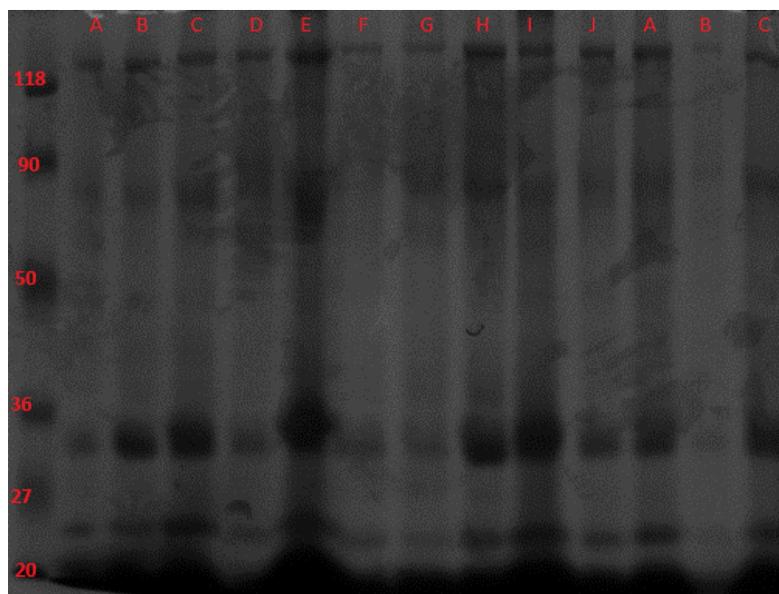
B,G	132	2/10 (20%)	A,C,D	131	3/10 (30%)
F	134	1/10 (10%)	B,F,J	133	3/10 (30%)
			J	139	1/10 (10%)

162



163

164 Figura 1 - Gel de eletroforese em SDS-PAGE com as bandas protéicas dos touros na
 165 estação seca. Identificação numérica em kDa do marcador molecular na primeira
 166 coluna da esquerda. Identificação das amostras de proteína com letras no alto da figura.
 167



168

169 Figura 2 - Gel de eletroforese em SDS-PAGE com as bandas protéicas dos touros na
 170 estação chuvosa. Identificação numérica em kDa do marcador molecular na primeira
 171 coluna da esquerda. Identificação das amostras de proteína com letras no alto da figura.
 172

173 A banda de 20 kDa foi identificada em 80% dos touros na estação seca e em
 174 30% na chuvosa. Essa banda protéica de 20 kDa do plasma seminal pode ser

175 responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermática, após a
176 mesma ser submetida ao choque térmico pelo frio, no qual se rompe a membrana
177 (Barrios et al., 2000). Na década de 80, Kemme et al. (1984) citaram a proteína de 20
178 kDa como *seminalplasmim*, promotora de alta fertilidade com ação antimicrobiana no
179 sêmen. Provavelmente, a estação seca influenciou na maior incidência dessa proteína no
180 plasma seminal, colaborando para a manutenção da qualidade espermática nesse
181 período do ano.

182 As bandas proteicas com peso molecular de 20, 22, 32, 48, 50, 63, 86, 127, 129 e
183 131 kDa foram identificadas em ambas as estações, chuvosa e seca, sendo que a
184 proteína de 129 kDa esteve presente de forma similar entre as estações com 20% de
185 incidência.

186 Na estação seca, a proteína de 127 kDa esteve presente em 30% dos touros,
187 elevando-se na estação chuvosa para 90% de incidência.

188 São conhecidas várias funções das proteínas presentes no plasma seminal, tanto
189 as que colaboram com a qualidade do sêmen quanto as que são desfavoráveis para as
190 funções dos espermatozoides, agindo dessa forma a favor ou não da fertilidade.
191 Conforme publicado por Bergeron (2004), a proteína com 13 kDa participa da
192 capacitação espermática, colaborando de forma positiva com a fertilidade. Essa banda
193 proteica esteve presente em 60% dos touros somente na estação chuvosa.

194 No presente estudo, foi revelada uma banda proteica com 80 kDa,
195 provavelmente a lactoferrina, também encontrada comumente no plasma seminal de
196 garanhões (Inagaki, 2002). A lactoferrina atua como antioxidante, protegendo a
197 membrana plasmática dos espermatozoides contra agentes estressores como o clima
198 (Fouchecourt et al., 2002). Essa proteína esteve presente em 30% dos touros na estação
199 seca e em 20% na época chuvosa.

200 Para as concentrações séricas de testosterona e cortisol entre as estações
201 estudadas, não houve diferença significativa (Tabela 4). A secreção de andrógenos nos
202 animais, aparentemente não é afetada pela exposição dos testículos ao calor (Setchell,
203 2006), a exemplo do observado em búfalos nascidos e criados extensivamente, quando
204 mantidos sob estresse térmico induzido a 39°C, em câmara bioclimática, durante 54 dias
205 (Chacur, 2000; Chacur e Oba, 2005).

206

207 TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA E CORTISOL EM TOUROS JOVENS DA
 208 RAÇA NELORE

Variáveis	Estação seca (n=20)	Estação chuvosa (n=20)	P valor
Testosterona (ng/dL)	340,26±320,39	440,07±400,42	0,524
Cortisol (µg//dL)	2,83±1,16	3,61±1,53	0,077

209 *(p<0,05) – Diferença significativa a 5%

210

211 O cortisol apresentou valores médios de 2,83±1,16 µg/dL para a estação seca e
 212 3,61±1,53 µg/dL para a chuvosa. Valores médios de cortisol em bovinos de raça
 213 zebuína, citados na literatura, possuem variação entre os autores, sendo da ordem de:
 214 3,16 µg/dL a 3,68 µg/dL (Reis et al., 2006) e 3,29 µg/dL (Vasquez e Herreira, 2003). Os
 215 resultados do presente estudo são semelhantes aos de Chacur et al. (2012) descritos para
 216 touros da raça Nelore com médias de 1,68±0,28 µg/dL na estação seca e 3,10±0,31
 217 µg/dL na estação chuvosa.

218 Para o cortisol, o presente trabalho também apresentou médias similares às
 219 referidas por Chacur et al. (2010) para a raça Nelore na estação chuvosa com 3,19±0,2
 220 µg/dL no período de agosto a outubro (inverno-primavera), destacando que os animais
 221 com concentração elevada deste hormônio na corrente circulatória são considerados
 222 como estressados.

223 A compreensão do efeito das estações do ano sobre a reprodução dos touros
 224 zebu, criados extensivamente, deve ser explorada por novos trabalhos com o objetivo de
 225 fornecer estratégias para uma melhor utilização desses reprodutores em distintas épocas
 226 de acasalamento.

227 Conclui-se que na estação seca a qualidade do sêmen foi superior. A estação
 228 seca e chuvosa não influenciou de forma significativa a síntese de cortisol e
 229 testosterona. A composição proteica do plasma seminal e a incidência das bandas
 230 sofreram variação devido à influência das estações.

231

232 REFERÊNCIAS

233

234 BARRIOS, B. ; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGRO, M. et al. Seminal plasma proteins revert
 235 the cold-schock damage of ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, New York,
 236 v. 63, p. 1531-1537, 2000.

237

- 238 BARTH A.D., BOWMAN P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after
239 scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can Vet J* , v. 34, p. 93–102,
240 1994.
- 241
- 242 BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal
243 plasma of different species. In: International congresso n animal reproduction. *Anais...*
244 Porto Seguro: Ceres, v.1, p.226, 2004
- 245
- 246 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
247 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
248 *Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248- 54, 1976..
- 249
- 250 CHACUR, M.G.M; MIZUSAKI, K.T.; SANTOS F.H. *et al.* Influência da estação do
251 ano nas características do sêmen e na concentração de hormônios em touros Nelore e
252 Simental. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.3, p.540-546, 2012.
- 253
- 254 CHACUR, M.G.M.; AURÉLIO, P.T.F.; OBA, E. *et al.* Influência de um nutracêutico
255 no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos*
256 *taurus indicus*. *Semina Agrárias*, v.31, p.439-450, 2010.
- 257
- 258 CHACUR, M. G. M.; OBA, E. Heat stress in buffalo bulls *Bubalus bubalis*, evaluations
259 of reproduction physiological characteristics. *Veterinária Notícias*, Uberlândia, v. 11, n.
260 1 , p. 111-112, 2005.
- 261
- 262 CHACUR, M. G. M. Estresse térmico em touros bufalinos *Bubalus bubalis*, avaliações
263 das características fisiológicas da reprodução. 2000. Tese (Doutorado em Medicina
264 Veterinária). Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária –
265 Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2000.
- 266
- 267 DINIZ, E. G.; MOURÃO, L.L.; JACOMINI, J.O. Comparative analysis of proteins of
268 seminal plasma from Nelore Breed Bulls by means of electrophoresis in polyacrylamide
269 gel in denaturing conditions (SDS-PAGE). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON

- 270 ANIMAL REPRODUCTION, 15th, Porto Seguro. *Anais...* Belo Horizonte: Brazilian
271 College of Animal Reproduction, v.1, p.189, 2004.
272
- 273 FERREIRA, P. V. Estatística experimental aplicada à agronomia. Maceió: Edufal, 3ed.,
274 2000.
275
- 276 FOUCHECOURT, S.; MÉTAYER, S.; LOCATELLI, A.; et al. Mammalian lipocalin-
277 type prostaglandin D2 synthesis in the fluids of the male genital tract: Putative
278 Biochemical and physiological functions. *Biology of Reproduction*, New York, v. 66, n.
279 3, p. 458-467, 2002.
280
- 281 GALINA, C. S.; ARTHUR, G. H. Review of cattle reproduction in tropics. Part 6. The
282 male. *Animal Breeding Abstracts*, Sidney, v. 59, n. 1, p. 403-412, 1991.
283
- 284 GAVIRAGHI, A.; DERIU, F.; SOGGIU, A.; et al. *Vet Res Commu* , v.34 (Suppl 1),
285 p.33–36, 2010.
286
- 287 INAGAKI, M. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma.
288 *Journal of Veterinary Medicine Science*. London, v. 64, p. 75-77, 2002.
289
- 290 KEMME, M.; THEIL, R.; MADIRAJU, M. V. V. et al. Hoppe Seyler's *Z. Physiol.*
291 *Chem.* 365:1173-1181, 1984
292
- 293 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
294 bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.
295
- 296 Manual para exame andrológico do sêmen animal. COLÉGIO BRASILEIRO DE
297 REPRODUÇÃO ANIMAL.. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
298
- 299 REIS, L.S.; PARDO, P. E.; OBA, E.; KRONKA, S. N.; et al. Matricaria chamomilla
300 CH12 decreases handling stressing Nelore calves. *J. Vet. Sci.*, v.7, p.189-192, 2006
301

- 302 RONCOLETTA, M. et al. Sperm membrane and seminal plasma 2D protein profiles
303 and their relation with Bull's fertility. In: Minas Gerais, Brazil. In:INTERNATIONAL
304 CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Anais...* Belo
305 Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, v.1, p.187, 2004
306
- 307 SANTOS M.D., TORRES C.A.A., RUAS J.R.M., et al. Concentrações séricas de
308 testosterona em touros zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29: 738-744, 2000.
309
- 310 SETCHELL, B.P. The effects of heat on the testes of mammals. *Animal Reproduction*,
311 Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 81-91, 2006.
312
- 313 VALE FILHO, V. R. do. Subfertilidade em touros: Parâmetros para avaliação
314 andrológica e conceituação geral. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n.35,
315 p.81-87, 2001.
316
- 317 VASQUEZ, E. F. A. e HERRERA, A. del P.N. Concentração plasmática de cortisol,
318 uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura
319 de crômio durante a estação de monta. *Ciência Rural*, v.33, p.743-747, 2003.

**EFEITO DAS ESTAÇÕES SECA E CHUVOSA NA TERMOMETRIA ESCROTAL POR
INFRAVERMELHO E QUALIDADE DO SÊMEN E EM TOUROS NELORE, *BOS TAURUS*
*INDICUS***

**Effect of dry and rainy seasons upon scrotal infrared thermometry and semen
quality in Nelore bulls, *Bos Taurus indicus***

Aline Aparecida da Silva¹, Felipe Ruediger de Rydigier¹, Luis Roberto Almeida Gabriel
Filho², Marcelo George Mungai Chacur¹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito das estações seca e chuvosa na termometria escrotal por infravermelho e na qualidade espermática de touros jovens da raça Nelore, criados extensivamente. Foram utilizados 10 touros da raça Nelore, nos meses de agosto à novembro, submetidos ao exame do aparelho reprodutor. Foi mensurada a circunferência escrotal (CE), comprimento, altura e largura dos testículos e tamanho de epidídimo. Todos os touros foram considerados aptos à reprodução após a primeira colheita e análise do sêmen. Foram realizadas seis colheitas de sêmen e a aferição da temperatura testicular por meio de termômetro de infravermelho em 5 pontos da superfície escrotal: colo do escroto, terços dorsal, médio e ventral dos testículos e cauda do epidídimo. Quanto às características quantitativas e qualitativas do sêmen, houve superioridade dos animais na estação seca, com aumento de motilidade e concentração espermática e diminuição de defeitos menores e totais ($p < 0,05$). E o gradiente de temperatura da superfície do escroto apresentou diferença ($p < 0,05$) entre as estações nos 5 pontos de aferição, sendo as temperaturas na estação seca superiores às temperaturas na estação chuvosa. A termometria por infravermelho é uma forma precisa de aferição da temperatura testicular e auxilia de forma direta no exame andrológico. Nos animais do experimento foi observado que no verão, mesmo com o aumento da temperatura da superfície do escroto o quadro espermático foi satisfatório e os animais foram classificados como aptos à reprodução.

Palavras chave: Touros zebu, estação do ano, sêmen, termorregulação escrotal.

Summary

The aim of this work was study the effect of dry and rainy seasons upon scrotal infrared thermometry and semen quality in Nelore bulls, raised extensively. Were used 10

Nellore bulls in the spring and summer, subject to the examination of the reproductive tract. We measured scrotal circumference (SC), length, height and width of the testes and epididymis size. All bulls were considered fit to play after the first harvest and semen analysis. Six measurements were performed semen and testicular temperature measurement using infrared thermometer at 5 points scrotal surface: cervix scrotum thirds dorsal, middle and ventral testes and cauda epididymis. Regarding the quantitative and qualitative characteristics of semen, there was superiority of animals in the spring, with increased motility and decreased sperm concentration and minor defects and total ($p < 0.05$). And the gradient of surface temperature of the scrotum significant difference ($p < 0.05$) between stations within 5 points of measurement, and summer temperatures exceed the temperatures of spring. The infrared thermometry is an accurate measurement of testicular temperature and directly assists the soundness examination. In animals in the experiment noted that in summer, even with the increased surface temperature of the scrotum Table sperm was satisfactory and the animals were classified as suitable for reproduction.

Keywords: Bulls zebu season, semen, scrotal thermoregulation.

Introdução

Parâmetros convencionais utilizados para a avaliação espermática têm se mostrado limitados quanto à capacidade de prever o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste é pouco eficaz, devido ao fato que cada espermatozóide apresenta múltiplos compartimentos com diferentes funções a serem avaliadas. Embora nenhuma técnica de avaliação tomada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen bovino (MAZIERO *et al.*, 2009).

Em geral, a resposta ao estresse térmico é semelhante entre *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, embora as características anátomo-funcionais do primeiro facilitem a termorregulação escrotal (BRITO *et al.*, 2004). De acordo com Kastelic *et al.* (2001), uma moderada elevação da temperatura testicular em touros submetidos à insulação escrotal reduz, de forma drástica, a produção espermática, a motilidade progressiva e a

quantidade de espermatozoides vivos por ejaculado, e aumenta a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais.

Os efeitos deletérios da insulação escrotal na qualidade do sêmen dependem da duração da insulação, por isso a importância da termorregulação. A temperatura escrotal em touros deve estar de 4-5° abaixo da temperatura corpórea (KASTELIC et al, 1996), e isto justifica o uso da termometria como ferramenta de auxílio em um exame andrológico, para determinar a temperatura exata na superfície da pele escrotal.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito das estações seca e chuvosa na termometria escrotal por infravermelho e na qualidade espermática de touros jovens da raça Nelore, criados extensivamente.

Material e Métodos

Foram utilizados 10 touros da raça Nelore com idade média de 24 meses, criados extensivamente em pasto de *Brachiaria decumbens*, com sal mineral e água *ad libidum* em propriedade rural no município de Presidente Prudente, SP. O experimento foi realizado nos meses de agosto e setembro (estação seca) e de outubro a novembro (estação chuvosa). O município onde foi realizado o experimento apresenta latitude 21°29'50"S, longitude 49°14'2"W e altitude de 475m. Em 2010, ano do experimento, a temperatura média nos meses de agosto e setembro foram 22,8°C e 24,6°C, e nos meses de outubro e novembro de 23,4°C e 24,5°C, respectivamente.

Na estação seca, a média do índice pluviométrico foi de 0 mm e 10,2 mm em agosto e setembro, e na chuvosa de 68 mm e 73 mm em outubro e novembro, respectivamente. E quanto à umidade relativa do ar nos meses de agosto e setembro foram de 70,7% e 72,3%, e nos meses de outubro e novembro foram de 80,2% e 80,6%, respectivamente.

Os touros utilizados no experimento foram examinados e submetidos ao exame andrológico, classificando-os aptos à reprodução, conforme normas do Manual para avaliação de sêmen animal (CBRA, 1998).

A termometria por infravermelho foi realizada antes das colheitas de sêmen, com os testículos limpos e secos e com o auxílio do termômetro de infravermelho (RT-50, Incoterm®) em 5 pontos da superfície escrotal, dos lados direito (D) e esquerdo (E): colo do escroto (TD1 e TE1), terços dorsal (TD2 e TE2), médio (TD3 e TE3), e

ventral (TD4 e TE4) dos testículos e cauda do epidídimo (TD5 e TE5); após foi aferida a temperatura retal (TR). O gradiente de temperatura da superfície do escroto foi feito pelas diferenças de temperatura dos seguintes pontos: TD1-TD3 e TD1-TD5 no testículo direito e TE1-TE3 e TE1-TE5 para o testículo esquerdo.

Foram realizadas 6 colheitas de sêmen em cada estação, por meio de eletroejaculador automático (Neovet, Autoejac®), constituindo 120 amostras, 60 amostras na estação seca e 60 na chuvosa, com intervalo de 14 dias entre colheitas.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software SigmaEst e o BioEstat para ANOVA não paramétrica. A média e o desvio padrão foram

calculados pelas seguintes equações: $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ e $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ respectivamente. E

na comparação das médias entre os grupos foi utilizado o teste Tukey a 5% (FERREIRA, 2000).

O projeto de pesquisa foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNOESTE em 2010.

Resultados e Discussão

Para as características quantitativas e qualitativas do sêmen, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a motilidade espermática de $75,50 \pm 17,21\%$ na estação seca em relação à chuvosa com $66,67 \pm 19,61\%$. A concentração espermática foi superior ($p < 0,05$) na época seca ($461,71 \pm 332,12 \times 10^6/\text{mL}$) em relação à chuvosa ($267,25 \pm 127,82 \times 10^6/\text{mL}$). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os defeitos espermáticos menores na estação seca ($5,26 \pm 3,23\%$) em relação à chuvosa ($7,80 \pm 5,99\%$). Na época chuvosa, houve maior porcentagem ($p < 0,05$) de defeitos totais ($13,24 \pm 8,25\%$) em relação à estação seca ($9,64 \pm 4,58\%$), valores estes demonstrados na Tabela 1. Apesar das diferenças significativas observadas, o quadro espermático dos touros nas duas estações estudadas, esteve dentro dos limites preconizados para fins de uso dos touros para a monta natural, conforme normas do Manual para avaliação de sêmen animal (CBRA, 1998).

Vale destacar que, na estação seca, as características quantitativas e qualitativas do sêmen, conforme acima descritas, foram superiores. Avaliando o efeito da estação

sobre o sêmen, Oliveira et al. (2006) descreveram maior motilidade espermática com 62,6% em Nelores na estação chuvosa, em relação à seca com 57,91%. Por outro lado, efeito semelhante da estação foi relatado, similarmente ao presente estudo, onde Anchieta et al. (2005) observaram efeito negativo da estação chuvosa, a mais quente, sobre a motilidade espermática, tanto em touros zebus, quanto nos europeus mantidos em central de inseminação artificial, no Sudeste brasileiro.

No presente trabalho, em relação à porcentagem dos defeitos maiores e totais dos espermatozoides ($4,39 \pm 2,91\%$ e $9,64 \pm 4,58\%$) para a estação seca e de ($5,51 \pm 3,59\%$ e $13,24 \pm 8,15\%$) para a estação chuvosa, observa-se que os animais processam espermatogênese de forma equilibrada em ambas as estações. Dias et al. (2007) utilizando touros da raça Nelore da mesma faixa etária, descrevem valores entre $9,3 \pm 3,7\%$ e $18,1 \pm 6,4\%$.

A temperatura da superfície do escroto, mensurada com o termômetro de infravermelho apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as estações seca e chuvosa (Tabela 2). Foi observado na estação chuvosa que as temperaturas nos 5 pontos de aferições nos lados direito e esquerdo da superfície do escroto foram superiores ($p < 0,05$) em relação à estação seca. Esses resultados relativos às diferenças das temperaturas, são similares aos relatos de estudos com o objetivo de checar o efeito da temperatura ambiente sobre a termorregulação testicular em taurinos (Kastelic et al., 1996a, 1996b e 1997) observando que a temperatura ambiente exerce grande influência na temperatura da superfície do escroto.

As médias para a temperatura da superfície do escroto em diferentes temperaturas ambiente foram relatadas por Barros *et al.* (2009), onde nas porções dorsal e medial dos testículos houve elevação da mesma quando do aumento da temperatura ambiente. Vale destacar que a despeito da diferença entre os bovinos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, ambos sofrem influência da temperatura ambiente relacionada com a produção de espermatozoides.

No presente estudo, estimou-se o gradiente de temperatura na superfície do escroto calculado pela diferença entre TD1-TD5 de $3,66 \pm 1,61^{\circ}\text{C}$ na estação seca e $3,44 \pm 1,19^{\circ}\text{C}$ na estação chuvosa, e TE1-TE5 de $4,09 \pm 1,53^{\circ}\text{C}$ na estação seca e $3,25 \pm 1,31^{\circ}\text{C}$ na estação chuvosa, não demonstrando diferença ($p > 0,05$) para o testículo direito.

Segundo Sealfon e Zorgniotti (1991), para a manutenção da temperatura fisiológica adequada, o escroto e os testículos devem dissipar calor para o ambiente, processo este, dependente do gradiente de temperatura entre: escroto, testículos e meio ambiente. Quanto maior for a diferença de temperatura ou de gradiente, maior será a quantidade de calor transferida ou absorvida pelos sistemas.

Este aumento de temperatura da superfície do escroto influencia diretamente a temperatura testicular, e nos meses mais quentes do ano, os bovinos apresentam redução na performance reprodutiva quando os mecanismos de termorregulação sistêmica e testicular não são capazes de controlar este aumento de temperatura, surge o quadro de hipertermia causada pelo estresse térmico, com consequente redução da libido, qualidade de sêmen e fertilidade (ENTWISTLE, 1992; BARTH, 1993).

Para a temperatura retal, não houve diferença ($p>0,05$) entre as estações, apresentando valores médios de $38,39\pm 0,61^{\circ}\text{C}$ na estação seca e $38,65\pm 0,61^{\circ}\text{C}$ na chuvosa.

Conclusão

Foi observado um quadro espermático superior durante a estação seca. Conclui-se que a termometria escrotal por infravermelho é de fácil e rápida realização, sendo recomendado o emprego da mesma, agregando informações ao exame andrológico e colaborando na escolha dos touros para a reprodução.

Referências Bibliográficas

ANCHIETA, M.C.; VALE FILHO, V.R.; COLOSIMO, E. et al. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, p.196-204, 2005.

BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n. 4, p. 1-11, 1993.

BRITO, L.F.C., SILVA, A.E.D.F., BARBOSA, R.T., KASTELIC, J.P.. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: relationship with

scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, 61:511–28, 2004.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. *et al.* Caracterização andrológica de touros Nelore criados extensivamente em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Vet. Not.**, v.13, p.39-46, 2007.

ENTWISTLE, K. Effects of heat stress on reproductive functions in bull. In: **Proceedings of a workshop on bull fertility**, Queensland Department of Primary Industry, Brisbane, p. 57-63, 1992.

FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. Maceió: Edufal, 3ed., 2000.

KASTELIC, L.; COOK, R. B.; PERSON, R. A.; COULTER, G. H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research, Ottawa**, n. 65, p. 111-115, 2001

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Insulation the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.45, p. 935, 1996a.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; WALLINS, G.L.; ENTZ, T. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 153-59, 1996b.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-61, 1997.

MAZIERO, R. R. D.; ANDRÉ MACIEL CRESPILO, A. M.; DELL'AQUA1, C. P. F.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. Congresso **Brasileiro de Reprodução Animal**, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2009.

OLIVEIRA, K.M.; DUARTE, A.M.; NASCIMENTO, M.R.B.M. *et al.* Influência das estações seca e chuvosa sobre as características seminais de touros das raças Nelore, Gir e Holandês criados a pasto. **Vet. Not.**, v.12, p.145-151, 2006.

SEALFON, A.L.; ZORGNIOTTI, A.W. A theoretical model for testis thermoregulation. In: ZORGNIOTTI, A.W. **Temperature and environmental effects on the testis**. New York: Plenum Press, p. 123-135, 1991

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DO SÊMEN EM TOUROS DA RAÇA NELORE, NA ESTAÇÃO SECA E CHUVOSA.

Variáveis	Estação Seca	Estação Chuvosa	p. valor
Volume (mL)	5,62±2,12	5,57±2,40	0,920
Motilidade (%)	75,50±17,21	66,67±19,61	0,010*
Vigor (1-5)	3,85±1,13	3,78±1,06	0,740
Turbilhonamento (1-5)	2,37±1,89	2,20±2,06	0,646
Concentração (x10 ⁶ /mL)	461,71±332,12	267,25±327,82	0,002*
Defeitos maiores (%)	4,39±2,91	5,51±3,59	0,063
Defeitos menores (%)	5,26±3,23	7,80±5,99	0,005*
Defeitos totais (%)	9,64±4,58	13,24±8,15	0,003*

*(p<0,05) – Diferença significativa a 5%.

TABELA 2: MÉDIAS DE TEMPERATURA DA SUPERFÍCIE DO ESCROTO EM TOUROS NELORE POR MEIO DO EMPREGO DE TERMÔMETRO DE INFRAVERMELHO.

	Estação seca	Estação chuvosa	P valor
TD1	33,49±0,934	34,24±1,32	0,007*
TD2	32,35±1,14	33,55±1,28	<0,001*
TD3	31,90±1,13	32,71±0,93	0,005*
TD4	31,25±1,36	32,27±1,11	0,003*
TD5	29,82±1,69	30,79±1,23	0,021*
TD1-TD3	1,59±0,87	1,52±1,10	0,773
TD1-TD5	3,66±1,61	3,44±1,19	0,575
TE1	33,35±0,99	34,26±0,94	<0,001*
TE2	32,42±1,17	33,59±0,83	<0,001*
TE3	31,90±1,05	32,45±0,89	0,030*
TE4	31,05±1,35	32,12±1,12	0,004*
TE5	29,70±1,70	30,65±1,20	0,017*
TE1-TE3	1,68±1,09	1,44±0,86	0,362
TE1-TE5	4,09±1,53	3,25±1,31	0,031*
Temperatura retal	38,39±0,61	38,65±0,61	0,100

*(p<0,05) – Diferença significativa a 5%.