VINICIUS JOSE MOREIRA NOGUEIRA

**RELAÇÕES ENTRE A BIOQUÍMICA SÉRICA E DO PLASMA SEMINAL COM AS
ALTERAÇÕES ESPERMÁTICAS DE TOUROS NELORE COM DEGENERAÇÃO
TESTICULAR**

São Paulo

2018

VINICIUS JOSE MOREIRA NOGUEIRA

**Relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações
espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2018

Obs.: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3666
FMVZ

Nogueira, Vinicius José Moreira
Relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações
espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular / Vinicius José Moreira
Nogueira. – 2018.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Bovinos. 2. Sêmen. 3. Metabólitos. 4. Infertilidade. 5. Espermatozoide. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo das relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular", protocolada sob o CEUA nº 9276100616, sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini** e equipe: Vinícius José Moreira Nogueira ; Laura Nataly Garcia Oliveros ; Leonardo Batissaco; Vitor Hugo Güllger Gonzaga - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 05/01/2017.

We certify that the proposal "Study of the relationship between serum biochemistry and seminal plasma with sperm changes Nelore bulls with testicular degeneration", utilizing 24 Bovines (24 males), protocol number CEUA 9276100616, under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini** and team: Vinícius José Moreira Nogueira ; Laura Nataly Garcia Oliveros ; Leonardo Batissaco; Vitor Hugo Güllger Gonzaga - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 07/2016 a 07/2017

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

Idade: **30 a 34 meses**

N: **24**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **545 a 660 kg**

Resumo: A degeneração testicular é uma afecção de grande impacto na fertilidade de bovinos no Brasil que tem como causa principal o estresse térmico gerado por elevadas temperaturas. Por gerar lesão tecidual, segue-se uma cascata complexa de alterações fisiológicas e metabólicas, ocasionando uma reação inflamatória de fase aguda. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar o perfil metabólico e proteínas de fase aguda de touros Nelore com degeneração testicular de uma forma que se possa aumentar a gama de métodos diagnósticos deste distúrbio. Para tal, serão utilizados 24 touros Nelore divididos em 2 grupos: Grupo degenerado (DEG; n=12) e Grupo controle (CON; n=12). A degeneração será induzida por bolsas testiculares insuladoras durante um período de 72 horas. Serão realizadas análises clínicas, reprodutivas, colheita de sangue e sêmen uma vez por semana nos seguintes períodos: 3 semanas antes da colocação das bolsas (S-3; S-2; S-1); no dia da colocação (D0) e no dia da retirada (D+3); e 11 semanas após (S+1 a S+11), também serão realizadas 3 colheitas sanguíneas com intervalo de 24 horas após o momento da colocação e retirada da mesma. A colheita de sêmen será feita por eletroejaculador em tubos de 15 mL previamente aquecidos em banho-maria a 37°C; as colheitas de sangue serão feitas por punção da veia caudal pelo sistema Vacutainer®, e as amostras de plasma seminal serão obtidas por centrifugação de uma alíquota do ejaculado. Serão avaliadas as características clínicas como frequências respiratória e cardíaca, movimentos ruminais, temperatura retal, consistência e perímetro testicular. Além disso, serão feitas avaliações seminais convencionais, integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial. Na avaliação plasmática sérica e seminal, serão analisados: glicose, ácidos graxos não esterificados (NEFA), beta-hidroxibutirato (BHB), Creatina Quinase (CK), triglicérides, colesterol, proteína total, albumina, fibrinogênio, haptoglobina e ceruloplasmina. A análise dos dados obtidos será realizada utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System, (SAS 2004) por meio da análise de variância adicionando o fator medidas repetidas no tempo MIXED. O nível de significância considerado será de 5%.

Local do experimento: Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA/VRA) FMVZ- USP

São Paulo, 17 de janeiro de 2017

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NOGUEIRA, Vinícius José Moreira

Título: Relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 20/07/2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: aprovado

Profa. Dra. Bruna Marcele Martins de Oliveira

Instituição: FAJ

Julgamento: aprovado

Profa. Dra. Melina Marie Yasuoka

Instituição: FZEA-USP

Julgamento: aprovado

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, aos de sangue e aos de criação. Devo minha vida a eles, pois só consegui chegar até aqui porque eles sempre acreditaram e confiaram em mim!!!

E também dedico à minha prima, que durante meu mestrado se foi e ficamos sem sua presença física. Geh, você está comigo o tempo todo e não sai do meu pensamento. A sua partida só me fez entender ainda mais que devemos lutar e seguir em busca dos nossos sonhos e que apesar de tudo a vida deve ser vivida. Pois quando menos esperamos tudo acaba. Você é e será meu anjo para sempre!!

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigado pela minha vida, por me dar saúde e forças para, ao abrir os olhos todos os dias, saber que posso escrever mais um capítulo da minha vida.

Mãe, obrigado pela paciência, carinho, amor e total dedicação, sei que podem passar quantos anos for e a senhora sempre estará de braços abertos para me ajudar em qualquer coisa!!!

Pai, obrigado por entender minhas decisões e pelo amor que sempre me deu. O que mais quero é sempre te dar orgulho!

Ká, obrigado por ser meu segundo pai, que privilégio o meu de poder falar que tenho dois pais. Dê, obrigado pelas palavras de carinho, pelas orações, pela torcida, sei que posso ser considerado seu filho mais velho!

Lipe e Bela, obrigado por acreditarem em mim e por me darem orgulho. Estou pronto para ajudá-los em tudo!!

Vó, o grande amor da minha vida! Não sei o que seria de mim sem sua presença, seu carinho, suas preocupações e seus áudios. Te amo demais, obrigado por tudo!!

Professora Dra. Eneiva Carla, não tenho palavras para te agradecer. Desde que te conheci em 2012 senti uma segurança muito grande em poder trabalhar e aprender ao seu lado. Como sempre conversamos, Deus sabe o que é melhor para nossa vida, e em 2015 lá estava eu fazendo a prova do mestrado mais uma vez para ser seu orientado. Muito obrigado por acreditar em mim, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo carinho. Que Deus continue te abençoando sempre!

Agradeço ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ da Universidade de São Paulo, pela acolhida e pela oportunidade de realizar este Mestrado. Também agradeço à FZEA, onde fiz a Residência e que passei por grandes momentos da minha vida. E também por ter esse *campus* maravilhoso!!!

À todos os professores que só fizeram aumentar meus conhecimentos e paixão por essa profissão! Em especial aos professores do VRA de Pirassununga: Rubens, Ed, Kiky, Mário, Guilherme e André!!

Ao professor Dr. Eduardo Harry Birgel Junior e à Dra. Daniela Becker Birgel pelo auxílio do analisador bioquímico no Laboratório Multiusuário de Análises Clínica Veterinária e por todo apoio.

Aos funcionários do VRA pela dedicação e atenção. Clayton, Harumi, Alexandra, Marcio, Sr. João, Sr. Zé Maria, Rildo e Ricardo, vocês foram essenciais.

À todos os pós-graduandos do grupo LEPPaR: Nat, Léo, Maíra, Sâmara, Vitinho, Shirley, Flávia, Bruna, Fabian e Felipe e também aos estagiários: Kelcy, Laís, Débora, Isa, Creonte e Marcos. O trabalho se torna mais fácil e prazeroso quando feito em equipe e vocês foram demais!

À todos os outros colegas pós-graduandos do VRA, obrigado pela amizade e ensinamentos! Milena, Pat, Gabi Zoca e Rê, como sinto saudades de vocês!!

Obrigado às agências de fomento, CAPES pela bolsa cedida e pelo suporte da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2014/12757-1).

Aos meus dois grandes amigos Wekisley e Dilberto! Amigos que a PUC me deu e que tornaram minha vida mais fácil em Pirassununga. Dividir a casa com vocês foi muito bom, rimos muito, nos divertimos bastante e sinto falta dos rodízios de pizza! Podem contar comigo sempre!

Kelcy e família, jamais imaginei encontrar uma família que me acolhesse tão bem! Obrigado por tudo e parabéns por serem essas pessoas maravilhosas!

Nat, pode ter certeza que nossa amizade será eterna! Mariluce e Pri, obrigado pela amizade!

Agradeço a todos que fizeram parte da minha vida em Pirassununga!!!

E finalizando, agradeço à cidade de Pirassununga pela acolhida.

*“O veterinário que confia só no laboratório para seus diagnósticos,
carece de experiência e quem diz não precisar do laboratório
carece de conhecimentos”*

Wittwer e Böhmwald

RESUMO

NOGUEIRA, V.J.M. **Relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular.** [Relationships between serum and seminal plasma biochemistry with sperm alterations of Nelore bulls with testicular degeneration]. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

No presente trabalho estudou-se o perfil bioquímico do plasma seminal bem como o perfil metabólico de touros Nelore com degeneração testicular. O estudo está apresentado em dois artigos. No Artigo 1, o objetivo foi investigar alguns metabólitos do plasma seminal de touros da raça Nelore para caracterizar valores e avaliar sua relação com as características espermáticas. Foram realizadas 14 colheitas seminais, com intervalos semanais, de 11 touros (n=154). O sêmen foi avaliado para motilidade, vigor, concentração, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, morfologia e pH. O plasma seminal foi submetido às avaliações metabólicas de proteína total, albumina, gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Os dados foram analisados no programa do Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), sendo realizadas estatística descritiva e análise de correlação de Pearson, o nível de significância considerado foi de 5%. Os valores dos metabólitos encontrados no plasma seminal foram descritos e podem ser utilizados como referência para touros Nelore. Também se pode concluir que há relação entre o perfil metabólico do plasma seminal e as características espermáticas. No Artigo 2, o objetivo foi investigar a bioquímica séria e do plasma seminal de touros Nelore com degeneração testicular. Para isso, foram utilizados 22 touros, que foram distribuídos em dois grupos: Grupo Controle (CON; n=11) e Grupo Degeneração (DEG; n=11). Foram realizadas 14 colheitas de sêmen, e 21 colheitas de sangue com intervalos semanais. As avaliações seminais e do plasma seminal foram as mesmas realizadas no estudo do artigo 1 e o sangue foi avaliado quanto às concentrações de proteína total, albumina, fibrinogênio, GGT, AST, creatina-quinase (CK), glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol, triglicérides, beta-hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA). Os dados foram submetidos à Análise de Variância, sendo adicionado o fator medidas repetidas no tempo, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo PROC MIXED do SAS, com nível de significância de 5%. Pode-se afirmar que a degeneração testicular em touros Nelore causa elevação de pH do sêmen, bem como elevação da concentração de ALT e

diminuição nas concentrações de GGT e FA no plasma seminal. Em relação às proteínas de fase aguda, a degeneração testicular causa diminuição na concentração de albumina. Em adição, este insulto local não altera os metabólitos séricos em touros Nelore.

Palavras-chave: Bovinos. Sêmen. Metabólitos. Infertilidade. Espermatozoide.

ABSTRACT

NOGUEIRA, V.J.M. **Relationships between serum and seminal plasma biochemistry with sperm alterations of Nelore bulls with testicular degeneration.** [Relações entre a bioquímica sérica e do plasma seminal com as alterações espermáticas de touros Nelore com degeneração testicular]. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

In the present work the biochemical profile of the seminal plasma and the metabolic profile of Nelore bulls with testicular degeneration were studied. The study was presented in two articles. First in article 1, the objective was to investigate some seminal plasma metabolites of Nelore bulls to characterize values and evaluate their relation with sperm characteristics. Fourteen seed samples were taken, with weekly intervals, of 11 bulls ($n = 154$). Semen was evaluated for motility, vigor, concentration, plasmatic and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, morphology and pH. Seminal plasma was submitted to metabolic assessments of total protein, albumin, gamma glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP). Data were analyzed by the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), with descriptive statistics and Pearson's correlation analysis performed, the level of significance considered was 5%. The values of the seminal plasma metabolites found have been described and can be used as reference for Nelore bulls. It can also be concluded that there is a relation between the metabolic profile of seminal plasma and sperm characteristics. In Article 2, the objective was to investigate the seric biochemistry and seminal plasma of Nelore bulls with testicular degeneration. For this, 22 bulls were used, which were distributed in two groups: Control Group (CON; $n = 11$) and Degeneration Group (DEG; $n = 11$). There were 14 semen crops and 21 weekly blood sampling. Seminal and seminal plasma evaluations were the same as those performed in the study of article 1 and blood was evaluated for total protein, albumin, fibrinogen, GGT, AST, creatine-kinase (CK), glucose, high density lipoprotein (HDL), cholesterol, triglycerides, beta-hydroxybutyrate (BHB) and non-esterified fatty acids (NEFA). The data were submitted to Variance Analysis, adding the factor measures repeated in time, using the REPEATED command generated by PROC MIXED of the SAS, with significance level of 5%. It can be affirmed that testicular degeneration in Nelore bulls causes elevation of semen pH, as well as elevation of ALT concentration and decrease in GGT and AF concentrations in seminal plasma. In relation to

acute phase proteins, testicular degeneration causes a decrease in albumin concentration. In addition, this local insult does not alter serum metabolites in Nellore bulls.

Keywords: Bovine. Semen. Metabolites. Infertility. Spermatozoa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema experimental.....	48
Figura 2 - Média $\pm$ erro padrão semanais da motilidade espermática de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	53
Figura 3 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração espermática de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	53
Figura 4 Média $\pm$ erro padrão semanais da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) semanal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	54
Figura 5 Média $\pm$ erro padrão semanais da porcentagem de defeitos totais dos espermatozoides de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	55
Figura 6 Média $\pm$ erro padrão semanais do pH do sêmen de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	55
Figura 7 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de proteína total do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	56
Figura 8 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de albumina do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	57
Figura 9 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de gama-glutamil transferase (GGT) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	57

Figura 10 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de aspartato aminotransferase (AST) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	58
Figura 11 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de alanina aminotransferase (ALT) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	59
Figura 12 Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de fosfatase alcalina (FA) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	59
Figura 13 Média $\pm$ erro padrão da concentração de proteína total sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), no período de 168 horas peri-insulação, iniciando-se 96 horas antes da retirada da bolsa até 72 horas após a retirada da bolsa.....	60
Figura 14 Média $\pm$ erro padrão da concentração de albumina sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), no período de 168 horas peri-insulação, iniciando-se 96 horas antes da retirada da bolsa até 72 horas após a retirada da bolsa.....	61
Figura 15 Média $\pm$ erro padrão da concentração de fibrinogênio sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), no período de 168 horas peri-insulação, iniciando-se 96 horas antes da retirada da bolsa até 72 horas após a retirada da bolsa... ..	61
Figura 16 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de proteína total sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	62
Figura 17 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de albumina sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	63
Figura 18 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de fibrinogênio sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	63

Figura 19 Média $\pm$ erro padrão da concentração de gama-glutamil transferase (GGT) sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	64
Figura 20 Média $\pm$ erro padrão da concentração de aspartato aminotransferase (AST) sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	64
Figura 21 Média $\pm$ erro padrão da concentração de creatinina quinase (CK) sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	65
Figura 22 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de glicose plasmática de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	65
Figura 23 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	66
Figura 24 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de colesterol sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	66
Figura 25 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de triglicérides sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	66
Figura 26 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de beta-hidroxibutirato (BHB) sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	67
Figura 27 Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de ácidos graxos não esterificados (NEFA) séricos de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média $\pm$ erro padrão (EPM), valores mínimos e máximos para as características seminais e perfil metabólico do plasma seminal de touros da raça Nelore.....	38
Tabela 2 - Coeficiente de correlação entre metabólitos do plasma seminal e características seminais de touros da raça Nelore	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPC	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BHB	Beta-hidroxibutirato
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CK	Creatina-quinase
CON	Controle
DEG	Degeneração
dL	decilitro
FA	Fosfatase alcalina
g	Força gravitacional
g	Gramas
GGT	Gama-glutamil transferase
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
Kg	quilogramas
L	Litro
Mg	miligrama
mL	mililitro
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NRC	National Research Council
PFA	Proteínas de fase aguda
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIAIA	Membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial
Sptz	Espermatozoide
UI	Unidades internacionais
µL	Microlitro
µM	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. PLASMA SEMINAL	24
2.1.1. Função dos metabólitos no plasma seminal	25
2.1.1.1 Gama-glutamil transferase	25
2.1.1.2 Aspartato aminotransferase	25
2.1.1.3 Alanina aminotransferase	26
2.1.1.4 Fosfatase alcalina	26
2.1.1.5 Proteína total	26
2.1.1.6 Albumina	27
2.2. SANGUE	27
2.2.1. Função dos metabólitos sanguíneos	27
2.2.2. Proteínas de fase aguda	28
2.3. DEGENERAÇÃO TESTICULAR	29
3. ARTIGO 1: PERFIL METABÓLICO DO PLASMA SEMINAL E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TOUROS DA RAÇA NELORE	32
3.1. INTRODUÇÃO	33
3.2. OBJETIVOS	34
3.3. HIPÓTESES	34
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.3.1. Local e Período Experimental	34
3.3.2. Animais e Delineamento Experimental	35
3.3.3. Avaliações Seminais	35
3.3.3.1 Motilidade, vigor e concentração	35
3.3.3.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial	36
3.3.3.3 Morfologia espermática	36
3.3.3.4 pH do sêmen	36

3.3.3.5 Metabólitos do plasma seminal.....	37
3.3.4. Análises Estatísticas	37
3.4 RESULTADOS.....	38
3.5 DISCUSSÃO.....	40
3.6 CONCLUSÃO.....	42
4. ARTIGO 2: BIOQUÍMICA SÉRICA E DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS NELORE COM DEGENERAÇÃO TESTICULAR	44
4.1. INTRODUÇÃO	45
4.2. OBJETIVOS.....	46
4.3. HIPÓTESES.....	46
4.3. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.3.1. Local e período experimental	46
4.3.2. Animais	47
4.3.3. Delineamento experimental	47
4.3.4. Avaliações seminais	49
4.3.4.1 Motilidade e concentração.....	49
4.3.4.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.....	49
4.3.4.3 Morfologia espermática.....	50
4.3.4.4 pH do sêmen.....	50
4.3.4.5 Metabólitos do plasma seminal.....	50
4.3.5. Colheita e armazenamento do sangue	51
4.3.6. Avaliação dos metabólitos sanguíneos	51
4.3.7. Análises estatísticas	52
4.4. RESULTADOS	52
4.4.1. Sêmen	52
4.4.1.1 Motilidade e concentração.....	52
4.4.1.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.....	54
4.4.1.3 Morfologia espermática.....	54
4.4.1.4 pH do sêmen.....	55

4.4.2. Plasma Seminal	56
4.4.2.1 Proteína total e albumina.....	56
4.4.2.1 GGT.....	57
4.4.2.2 AST.....	58
4.4.2.3 ALT.....	58
4.4.2.4 Fosfatase alcalina.....	59
4.4.3. Proteínas de fase aguda	60
4.4.4. Metabólitos séricos	62
4.5. DISCUSSÃO	67
4.6. CONCLUSÃO	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A modernização e profissionalização da pecuária com fim de aumentar a produção em um menor espaço é de suma importância (SANTOS et al., 2018), pois a população mundial vem aumentando e com isso o aumento do consumo de proteína animal. O Brasil, país detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, cerca de 220 milhões de cabeças, vem perdendo espaço de terra, que poderia criar gado, para a produção de culturas (CNA, 2018).

No manejo reprodutivo adotado na pecuária bovina, o touro tem a distribuição do seu patrimônio genético privilegiada, pois um macho pode ser utilizado para muitas fêmeas, mas ao mesmo tempo a fertilidade deste macho tem grande impacto (COSTA; SILVA et al., 2015). O único método capaz de estimar o potencial reprodutivo do touro o exame andrológico, este é capaz de diagnosticar anormalidades nos órgãos genitais, problemas físicos e qualidade espermática (SILVA et al., 1993), mas sabe-se que quanto maior a associação de exames, mais acurado ficará o exame andrológico (ASSUMPÇÃO et al., 2013).

A degeneração testicular pode levar o animal à subfertilidade ou até mesmo à infertilidade, levando assim ao descarte do animal acometido. Devido às características edafoclimáticas do Brasil, é de fundamental importância o estudo da degeneração testicular, pois esta é considerada a alteração mais frequente entre os reprodutores no nosso país (GUIMARÃES, 2017).

Levando em consideração a importância dos aspectos apresentados, o presente trabalho visa no primeiro artigo, avaliar metabólitos do plasma seminal de touros Nelore, propondo valores que podem ser utilizados como referência para a espécie, e no segundo artigo, estudar os metabólitos sanguíneos e do plasma seminal de touros da raça Nelore com degeneração testicular, com a finalidade de uma melhor compreensão desta afecção para propor métodos diagnósticos auxiliares na identificação da degeneração testicular.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para que haja um melhor entendimento dos estudos que foram realizados, a seguir será apresentada uma breve revisão sobre os metabólitos estudados, tanto no plasma seminal quanto no sangue, e sobre a degeneração testicular. Estabelecendo assim a relação do estudo destes metabólitos com a referida afecção.

2.1. PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é um fluido constituído pelo conjunto de secreções advindas das glândulas sexuais acessórias, epidídimos e testículos, cuja função é servir de veículo para o espermatozoide ejaculado (ASSUMPÇÃO et al., 2005a) e que juntamente com os espermatozoides formam o sêmen (JUYENA; STELLETTA, 2012) contribuindo assim para o volume do ejaculado (REGO et al., 2015). O pH do plasma seminal varia conforme a espécie, sendo ligeiramente ácido nos ruminantes domésticos (JUYENA; STELLETTA, 2012), apresentando valor médio de 6,9 (WITE, 1995).

Sabe-se que com o avanço da biotecnologia reprodutiva pode-se, in vitro, fecundar um oócito com espermatozoide lavado e produzir embriões viáveis, sem o plasma seminal entrar em contato com o útero. No entanto, também se sabe que para congelar o sêmen bovino é realizada a diluição deste e isso acarreta em menores taxas de fertilidade. Dessa forma, é sugerido que o plasma seminal apresenta papel importante tanto na função espermática quanto na fertilização e desenvolvimento embrionário no trato reprodutivo feminino (JUYENA; STELLETTA, 2012).

A composição bioquímica desta complexa mistura compreende proteínas, açúcares redutores, aminoácidos (ASSUMPÇÃO et al., 2005a), enzimas, antioxidantes, íons, lipídeos, hormônios e citocinas (JUYENA; STELLETTA, 2012). Tais componentes bioquímicos são de suma importância para sobrevivência e função dos espermatozoides, uma vez que, embora não compreendido totalmente, influenciam na fertilidade (ASSUMPÇÃO et al., 2005b; GATTI et al., 2004; RODRIGUES et al., 1999). Porém, a concentração destes, vai sofrer influência de alguns fatores intrínsecos e extrínsecos, como por exemplo: idade do touro, intervalo e métodos de colheitas (SHIVAJI et al., 1990).

A determinação da concentração das enzimas presentes no plasma seminal é importante, pois estas participam tanto do metabolismo quanto da função dos

espermatozoides (DOGAN et al., 2009), além de determinar a função e integridade das membranas espermáticas (PESCH et al., 2006). Pesquisas tem demonstrado que algumas enzimas encontradas no plasma seminal podem servir como biomarcadores de doenças reprodutivas e atuam na remoção das espécies reativas de oxigênio (AQUINO-CORTEZ et al., 2016).

2.1.1. Função dos metabólitos no plasma seminal

2.1.1.1 Gama-Glutamil Transferase

A enzima gama-glutamil transferase (GGT) está presente no sangue, na urina e no plasma seminal. Apresenta-se em maior quantidade neste último devido à sua produção principalmente na próstata (DELANGHE et al, 1985).

A atividade da GGT participa de vários processos metabólicos durante a maturação espermática estando relacionada à função da membrana, qualidade do sêmen (CHIKHI et al., 1999; KING AND MACPHERSON, 1966; SELIGMAN et al., 2005) e proteção de espermatozoides contra o estresse oxidativo (PESCH et al., 2006), como a correlação encontrada por Pesch et al. (2006) entre GGT e motilidade progressiva.

2.1.1.2 Aspartato Aminotransferase

Sugeriu-se que, em equinos, a enzima aspartato aminotransferase (AST), por se localizar na peça intermediária da célula espermática, esteja relacionada com motilidade (COLENBRANDER et al., 1992; PESCH et al., 2006), uma vez que a liberação de AST, após uma lesão de membrana, pode causar bloqueio na produção de trifosfato de adenosina (ATP) levando à perda da motilidade espermática (COLENBRANDER et al., 1992).

Em ruminantes foi relatada uma correlação negativa desta enzima com a fertilidade e positiva com danos acrossomais pós-descongelamento (JUYENA AND STELLETTA, 2012)

2.1.1.3 Alanina Aminotransferase

A atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT), assim como de AST, no sêmen são bons indicadores da qualidade seminal, pois demonstram a estabilidade da membrana espermática (COORTELL, 1980), ou seja, se o espermatozoide apresentar alguma lesão de membrana, como a ALT normalmente se localiza no interior da célula espermática, a concentração desta enzima estará aumentada no plasma seminal (GUNDOGAN, 2006).

2.1.1.4 Fosfatase Alcalina

Esta enzima que apresenta ação desfosforilante pode ser encontrada em diversos tecidos corpóreos como, por exemplo, fígado, placenta, ossos, rim, pulmão e intestino (TURNER; MCDONNELL, 2003). No espermatozoide a fosfatase alcalina (FA), por meio da proteína quinase que é dependente de AMPc (3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico), apresenta a função de regular a fosforilação de proteínas, e a proteína quinase por sua vez é necessária para a motilidade espermática. Vale lembrar que nesta célula a fosfatase alcalina é encontrada em fragmentos da cabeça, peça intermediária e cauda (TANG; HOSKINS, 1975).

Assim como a GGT, a fosfatase alcalina, cuja origem é na glândula vesicular e em menor quantidade nos testículos e epidídimos (TURNER; MCDONNELL, 2003), também apresenta função no que diz respeito à qualidade seminal (CHIKHI et al., 1999; KING; MACPHERSON, 1966; SELIGMAN et al., 2005). A FA tem sido encontrada com baixa atividade em javalis azoospermicos (CLEMENTS et al., 2010), podendo ser, dessa forma, utilizada como marcador ejaculatório que diferencia azoospermia de oligospermia (SCHAER-SOMI et al., n.d.; TURNER; MCDONNELL, 2003). A diminuição da concentração de fosfatase alcalina no plasma seminal é sugestivo de obstrução bilateral do canal deferente ou epidídimo (GOBELLO et al., 2002).

2.1.1.5 Proteína total

As proteínas presentes no plasma seminal possuem a função de maturação final do espermatozoide (REGO et al., 2015), proteção, capacitação, fertilização (MOURA et al.,

2010; REGO et al., 2014), conservação da estabilidade de membrana plasmática e ligação espermatozoide-oócito. No trato reprodutivo feminino algumas proteínas podem ter a função de auxiliar na eliminação da grande maioria dos espermatozoides que não conseguiram fertilizar (JUYENA; STELLETTA, 2012).

Segundo Rego et al. (2015) a concentração e composição de proteínas no plasma seminal é influenciada pelo método de colheita seminal, ou seja, se esta é realizada por vagina artificial ou eletroejaculador. Além de fatores nutricionais, ambientais, sazonais e estresse (PÉREZ-PÉ et al., 2001).

2.1.1.6 Albumina

Em estudos avaliando a composição do plasma seminal nos diferentes locais de produção Moura et al. (2010) observaram que a concentração de albumina é abundante no fluído epididimário e segundo Moura et al. (2007) esta proteína é encontrada em pequenas quantidades na secreção das glândulas sexuais acessórias de *Bos taurus*.

No plasma seminal a albumina tem efeito protetor na membrana espermática e na motilidade, além de estar envolvida na capacitação do espermatozoide e na reação acrossomal (REGO et al., 2014).

2.2. SANGUE

2.2.1. Função dos metabólitos sanguíneos

O perfil metabólico, avaliado por meio de análises sanguíneas (WITTWER, 2000), é utilizado por muitos pesquisadores no estudo da produção e reprodução animal (OLIVEIRA et al., 2014). A avaliação dos metabólitos se torna interessante uma vez que muitas doenças metabólicas ou de produção são de difícil percepção, sendo que na maioria das vezes a queda no rendimento é o único sinal (WITTWER, 2000). Pela avaliação do perfil metabólico se tem noção de como está o estado nutricional do animal que segundo Ndlovu et al. (2007) é útil para predizer o quanto o gado está afetado por alguma doença, má nutrição ou fatores ambientais.

Essas doenças são causadas pelo desequilíbrio dos nutrientes presentes no organismo. E quando a entrada de nutrientes não é suficiente para suprir as necessidades

do animal, este lança mão do consumo de suas reservas corporais. Porém, se este desbalanço se torna mais grave, as reservas corporais acabam sendo esgotadas e uma doença se instala (WITTER, 2000). Esses desbalanços nutricionais vão implicar diretamente nas concentrações dos metabólitos sanguíneos (GONZÁLEZ, 2000a; CONTRERAS, 2000).

A avaliação do metabolismo sanguíneo pode ser realizada pelas análises do perfil energético, dosando glicose, beta-hidroxibutirato (BHB), colesterol, ácidos graxos não esterificados (NEFA) triglicérides, lipoproteína de alta densidade (HDL) (GONZÁLEZ, 2000a; WITTWER, 2000; NDLOVU et al., 2007); perfil proteico por meio da avaliação de proteínas totais e albumina (CONTRERAS, 2000) e perfil hepático, pela dosagem de AST, creatina-quinase (CK) (NDLOVU et al., 2007) e GGT (GONZÁLEZ, 2000b).

Alguns fatores como nutrição, estações do ano e doenças infecciosas podem influenciar nas concentrações sanguíneas de proteínas (CONTRERAS, 2000) e de outros metabólitos (GONZÁLEZ, 2000a).

2.2.2. Proteínas de fase aguda

Nas situações de injúria tecidual, o fígado produz uma série de produtos, dentre eles, as proteínas de fase aguda (PFA), que são consideradas indicadoras de resposta a processos inflamatórios de diferentes causas (GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994). Essas proteínas, mesmo não sendo adequadas para estabelecer um diagnóstico específico (PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004) têm sido consideradas como potenciais indicadores da presença de doenças em animais, sendo relacionadas à sanidade do rebanho (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Dessa forma, as PFA podem ser consideradas marcadores precoces de qualquer processo patológico (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Como o fígado é um órgão pouco acessível aos métodos semiológicos tradicionais, torna-se difícil o diagnóstico de alterações que possam refletir no metabolismo e produção de PFA; no entanto, é possível dosar marcadores bioquímicos, como proteínas totais, albumina e fibrinogênio, que fornecem informações sobre as condições do fígado de forma minimamente invasiva, por meio da colheita e análise de amostras sanguíneas (BOBE; YOUNG; BEITZ, 2004).

2.3. DEGENERAÇÃO TESTICULAR

A degeneração testicular é uma das causas de diminuição dos índices de nascimentos a campo ocasionado por baixas taxas de prenhez. Esta é uma alteração que possui grande relevância dentre os distúrbios da reprodução do macho, sendo relatada como o motivo mais frequente de infertilidade em touros e garanhões. Podendo acometer, além das mais diversas espécies animais, o homem (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Esta afecção possui fatores predisponentes multifatoriais (ALVES, 2014), que levam à perda da termorregulação testicular, causando o aumento da temperatura dos testículos. Dentre as causas deste distúrbio destacam-se processos febris sistêmicos, dermatite escrotal, edema, hidrocele, criptorquidismo, gordura escrotal e principalmente temperaturas ambientais elevadas e persistentes (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; HANSEN, 2009). A resposta a essas injúrias será em nível da qualidade espermática, resultando assim em diminuição da espermatogênese e motilidade, aumento de espermatozoides morfológicamente anormais (HANSEN, 2009), diminuição do tamanho dos testículos e até mesmo em azoospermia (ROCHA et al., 2015).

A patogenia da degeneração testicular ainda não está completamente elucidada. Entretanto, o aumento da temperatura testicular, gera um consequente aumento do metabolismo celular. Porém, a vascularização dos testículos não segue esse aumento, predispondo tais órgãos a um quadro de hipóxia celular (PAUL et al., 2009), o que gera desbalanço nas espécies reativas de oxigênio (ROS) (YUE et al., 2010) que, consequentemente, induz a maior fragmentação de DNA levando à apoptose das células dos túbulos seminíferos (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; PAUL et al., 2009).

Se a causa primária da degeneração testicular for retirada, a produção seminal pode voltar à normalidade (HANSEN, 2009), pois as células de Sertoli, de Leydig e espermatogônias são mais resistentes às ações degenerativas do epitélio testicular (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Os espermatócitos e as espermátides são as células mais sensíveis à ação deste processo degenerativo (SETCHELL, 1998), podendo também ocorrer danos nas espermatogônias B (HANSEN, 2009). Porém, em casos crônicos, o animal pode se tornar estéril, uma vez que sua espermatogênese pode ficar integralmente comprometida (BICUDO et al., 2007).

A avaliação seminal é de grande importância no diagnóstico da degeneração testicular, já que a principal alteração encontrada é o aumento dos espermatozoides morfológicamente anormais (PÉREZ-CRESPO et al., 2008; HANSEN, 2009). Apesar das

análises convencionais do sêmen (turbilhonamento, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermáticas) apresentarem informações importantes para este diagnóstico, o uso de avaliações mais detalhadas por programas computadorizados de análise de motilidade (CASA) e o emprego de sondas fluorescentes podem incrementar o diagnóstico por permitir a verificação da integridade e função celular (ARRUDA et al., 2011).

Entre os métodos auxiliares utilizados no diagnóstico da degeneração testicular estão a ultrassonografia em modo-B (MARTINO et al., 2014), em modo color Doppler (BATISSACO et al., 2013), e a termografia escrotal (CAPRARO et al., 2008; COULTER; SERENGER; BAILEY, 1988; NETO; RODELLO; BICUDO, 2011).

Um diagnóstico rápido e preciso da degeneração testicular é necessário, uma vez que, como já citado, se retirada a causa, o animal pode voltar a ter produção espermática com os mesmos parâmetros observados anteriormente ao início de tal distúrbio (ROCHA et al., 2015).

Com base nessas informações, fica evidente a necessidade de mais ferramentas para o diagnóstico da degeneração testicular, bem como maior entendimento dessa afecção, a fim de aumentar o desempenho reprodutivo de touros em regime de colheita de sêmen e/ou monta natural.

ARTIGO 1

3. ARTIGO 1: PERFIL METABÓLICO DO PLASMA SEMINAL E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DE TOUROS DA RAÇA NELORE

RESUMO

Vários fatores estão relacionados à fertilidade de touros, sendo o plasma seminal um fator importante, pois é formado por uma mistura complexa, incluindo enzimas e proteínas que interagem com os espermatozoides. Entretanto, o perfil metabólico do plasma seminal de touros Nelore não é conhecido. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar alguns metabólitos do plasma seminal de touros da raça Nelore para definir valores de referência e avaliar sua relação com as características espermáticas. Para isso, foram utilizados 11 touros da raça Nelore com idade média de $32 \pm 5,36$ meses. Foram realizadas 14 colheitas de sêmen de cada touro por eletroejaculação, com intervalos semanais. O sêmen foi avaliado para motilidade, vigor, concentração, integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, morfologia e pH. Após, foi centrifugado para obtenção do plasma seminal. Este foi submetido às avaliações metabólicas de proteína total, albumina, gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Foram realizadas estatística descritiva e análise de correlação de Pearson utilizando o programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004). O nível de significância considerado foi de 5%. Os valores médios dos metabólitos avaliados foram: proteína total $1,56 \pm 0,09$ g/dL, albumina $0,43 \pm 0,02$ g/dL, GGT $1774,37 \pm 116,01$ UI/L, AST $207,03 \pm 12,55$ UI/L, ALT $5,68 \pm 0,51$ UI/L e FA $2612,99 \pm 157,15$ UI/L. A concentração espermática apresentou correlação positiva com todos os metabólitos do plasma seminal: proteínas totais ($r=0,32$), albumina ($r=0,32$), GGT ($r=0,65$), AST ($r=0,42$), ALT ($r=0,23$) e FA ($r=0,55$). O vigor apresentou correlação positiva com proteína total ($r=0,26$), albumina ($r=0,23$), GGT ($r=0,36$), AST ($r=0,31$) e FA ($r=0,41$). Para a motilidade progressiva notou-se correlações positivas com GGT ($r=0,20$) e FA ($r=0,19$). Correlação negativa foi encontrada entre defeitos espermáticos e GGT ($r=-0,16$), entre o percentual de células PIAIA e AST ($r = -0,27$) e ALT ($r = -0,25$). O pH do sêmen apresentou correlações negativas com concentração ($r=-0,51$), motilidade ($r=-0,23$), vigor ($r=-0,45$), proteína total ($r=-0,72$), albumina ($r=-0,61$), GGT ($r=-0,53$), ALT ($r=-0,31$) e FA ($r=-0,62$). Os valores dos metabólitos encontrados no plasma seminal podem ser descritos e podem ser utilizados como referência para touros Nelore. Também se pode concluir que há relação entre o perfil metabólico do plasma seminal e as características espermáticas.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino. Sêmen. Metabolismo. Bioquímico. Enzimas.

3.1. INTRODUÇÃO

A fertilidade do touro depende de vários fatores que vão desde o comportamento reprodutivo do animal até as características espermáticas. Dentre as características espermáticas, a motilidade, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial (OLIVEIRA et al., 2014), bem como a morfologia espermática (ARRUDA et al., 2015) apresentam relação com a fertilidade. Além dessas características, a composição do plasma seminal (ASADPOUR et al., 2007; KILLIAN et al., 1993) também apresenta grande influência na fertilidade sendo de grande importância o estudo desses indicadores (SILVA et al., 2008).

O plasma seminal caracteriza-se por uma mistura complexa de secreções advindas das glândulas sexuais anexas, epidídimos e testículos (ASSUMPÇÃO et al., 2005a). Ele é composto por proteínas, enzimas, eletrólitos, lipídeos e outras moléculas que juntos apresentam um papel importante no metabolismo espermático (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2008), atuando principalmente como veículo para os espermatozoides ejaculados. Alguns estudos têm mostrado que além de ter funções de transporte e decapacitação, o plasma seminal possui grande importância na fertilidade do animal (GATTI et al., 2004), atuando tanto no metabolismo como na função espermática (DOGAN et al., 2009). Porém, da mesma forma que nenhuma característica da qualidade espermática pode, sozinha, predizer a fertilidade (SILVA et al., 2008), o mesmo vale para os componentes do plasma seminal (ASSUMPÇÃO et al., 2013), levando a acreditar que a fertilidade deve ser estimada somando uma série de fatores (ASSUMPÇÃO et al., 2005b).

O estudo das concentrações das enzimas e proteínas que constituem o plasma seminal se torna importante na avaliação espermática, uma vez que estes estão envolvidos no metabolismo e na função espermática (DOGAN et al., 2009). As proteínas presentes no plasma seminal apresentam função de proteção, capacitação, fertilização (MOURA et al., 2010; REGO et al., 2014) e maturação final do espermatozoide (REGO et al., 2015). Assim como a albumina que tem efeito protetor sobre a membrana plasmática e a motilidade (REGO et al., 2014). Dentre as enzimas tem-se a gama-glutamil transferase (GGT) que participa de processos metabólicos durante a maturação espermática (SELIGMAN et al., 2005), a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) que indicam a estabilidade da membrana espermática (CORTEEL, 1980) e a fosfatase alcalina (FA) que tem ação desfosforilante (TURNER e MCDONNELL, 2003).

Assim, é importante enfatizar que não há estudos que estabeleçam os parâmetros metabólicos do plasma seminal de touros Nelore. Além disso, o uso de plasma seminal como método de avaliação da qualidade do sêmen não tem sido utilizado (AURICH et al., 1996; RODRIGUES et al., 1999).

3.2. OBJETIVOS

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar o perfil metabólico do plasma seminal de touros Nelore, considerando proteínas totais, albumina, GGT, AST, ALT e FA, primeiro para definir valores de referências e, segundo, para verificar se esse perfil metabólico é relacionado às características seminais, incluindo concentração, motilidade, vigor, morfologia, integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e pH.

3.3. HIPÓTESES

Existe correlação entre os metabólitos do plasma seminal com as características espermáticas de touros Nelore.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Local e Período Experimental

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) e no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR), ambos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e no Laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos ambos da Universidade de São Paulo, *Campus* Fernando Costa, Pirassununga – SP, entre os meses de setembro e dezembro de 2016. Durante o estudo, a média diária de temperatura foi de $26,27 \pm 4,43^{\circ}\text{C}$ e a média da umidade relativa do ar foi de $65,30 \pm 18,19\%$. Este estudo foi aprovado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo número CEUA 9276100616.

3.4.2. Animais e Delineamento Experimental

O presente estudo foi realizado utilizando 11 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade média de $32 \pm 5,36$ meses. Estes animais foram mantidos em piquetes com pastagem de capim braquiária (*Brachiaria sp*) e alimentados com silagem de milho, concentrado comercial e suplemento mineral de acordo com o NRC (1996), além de água à vontade. As colheitas seminais foram realizadas por eletroejaculação (Autojac V2, Neovet, Uberaba, MG – Brasil), 14 ejaculados foram obtidos de cada touro, totalizando 154 ejaculados.

3.4.3. Avaliações Seminais

O sêmen foi mantido em tubo de 15 mL pré-aquecido a 37° C. No laboratório avaliou-se concentração, motilidade progressiva, vigor, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e pH. Todas as avaliações foram realizadas pelos mesmos avaliadores.

3.4.3.1 Motilidade, vigor e concentração

As avaliações da motilidade e do vigor foram realizadas sob temperatura de 37°C, colocando-se uma gota de 4µL de sêmen *in natura* entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon), com aumento de 100x. Para a concentração espermática, o sêmen foi diluído em 1:100 em formol salino tamponado a 4%, e as células espermáticas foram contadas em câmara de Neubauer em microscopia de contraste de fase (Eclipse E100, Nikon) sob aumento de 400x.

3.4.3.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial foram utilizados 150 μL de sêmen diluído em meio TALP (25×10^6 sperm/mL) adicionado das sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (H342, 0,5 mg/mL, Thermo Fisher Scientific), 3 μL de iodeto de propídeo (PI, 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), 50 μL de aglutinina obtida de *Pisum sativum* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich) e 2 μL de iodeto de 5,5',1,1'6,6'tetracloro' 3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocyanine (JC-1, 153 μM , Sigma-Aldrich) preparado como descrito por Celeghini et al. (2007) incubado durante 8 minutos à 37° C, no escuro.

Uma amostra de 8 μL foram analisadas por microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tokyo, Japan), usando o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm) com aumento de 1000x. Foram analisadas 200 células por amostra. As células foram classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda fluorescente de acordo com a classificação de Celeghini et al. (2007), sendo considerada a porcentagem de espermatozoides que apresentou simultaneamente membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA).

3.4.3.3 Morfologia espermática

Os espermatozoides foram fixados em formol salino tamponado a 4% pré-aquecido a 37° C. Então, foram avaliadas 200 células, pela técnica da câmara úmida, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC modelo 80i, Nikon, Tokyo, Japão) com aumento de 1000x. As células espermáticas foram classificadas de acordo com Blom (1973) em porcentagem de defeitos maiores, menores e totais.

3.4.3.4 pH do sêmen

Após as análises espermáticas avaliou-se o pH do sêmen utilizando um medidor de pH (pH 21, Hanna Instruments®), em temperatura ambiente.

3.4.3.5 Metabólitos do plasma seminal

Após todas as análises, o sêmen foi processado para a obtenção do plasma seminal livre de espermatozoides. Para isso, foram realizadas duas centrifugações. A primeira centrifugação foi realizada à 450g, por 15 minutos em temperatura ambiente (Centrífuga clínica Centerbio®, modelo 80-2B), o sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente em centrífuga refrigerada (Centrífuga Hettich® Rotina 380R, 3044g, por 20 minutos, 4°C). Após as duas centrifugações o sobrenadante foi armazenado a -80°C em triplicata. Para a escolha deste protocolo de centrifugação foram realizados testes prévios para se chegar a um protocolo que após as centrifugações o plasma seminal estivesse livre de espermatozoides.

No momento das análises, os tubos contendo o plasma seminal foram descongelados em temperatura ambiente durante 15 minutos e os componentes metabólicos do plasma seminal foram quantificados no Laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, *Campus* Fernando Costa, utilizando um analisador bioquímico automático (RX Daytona). Os metabólitos avaliados estão descritos a seguir com os respectivos kits utilizados: proteína total (TP4001, Randox®); albumina (AB3800, Randox®); gama-glutamil transferase (GGT) (GT3817, Randox®); aspartato aminotransferase (AST) (AS3804, Randox®); alanina aminotransferase (ALT) (AL3801, Randox®) e fosfatase alcalina (FA) (AP3802, Randox®).

3.4.4. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à estatística descritiva para o estabelecimento das médias, erro padrão da média, mínima e máxima. Foram realizadas análises de correlação de Pearson entre as características seminais e os metabólitos do plasma seminal, utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004). O nível de significância considerado foi de 5%.

3.5. RESULTADOS

Na tabela 1 estão demonstrados os dados das médias e erro padrão da média, bem como dos valores mínimos e máximos das características seminais (motilidade progressiva, vigor, concentração, células PAIA, defeitos totais e pH) e dos metabólitos do plasma seminal (proteína total, albumina, GGT, AST, ALT e FA).

Tabela 1: Média $\pm$ erro padrão (EPM), valores mínimos e máximos para as características seminais e perfil metabólico do plasma seminal de touros da raça Nelore.

Características	Média $\pm$ EPM	Mínimo	Máximo
Motilidade progressiva (%)	69,45 $\pm$ 0,74	22,0	80,0
Vigor (1-5)	3,12 $\pm$ 0,04	2,0	4,0
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	263,12 $\pm$ 14,92	7,5	990,0
PIAIA ¹ (%)	73,01 $\pm$ 1,05	33,0	94,5
Defeitos Totais (%)	7,42 $\pm$ 0,70	0,50	42,50
pH	6,89 $\pm$ 0,02	5,96	7,79
Proteína Total (g/dL)	1,56 $\pm$ 0,09	0,25	5,82
Albumina (g/dL)	0,43 $\pm$ 0,02	0,15	2,2
GGT ² (UI/L)	1.774,37 $\pm$ 116,01	15	7.730,0
AST ³ (UI/L)	207,03 $\pm$ 12,55	3	952,0
ALT ⁴ (UI/L)	5,68 $\pm$ 0,51	0	39,33
FA ⁵ (UI/L)	2.612,99 $\pm$ 157,15	80,0	9.400,0

¹PIAIA: Espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial; ²GGT: Gama glutamil-transferase; ³AST: Aspartato aminotransferase; ⁴ALT: Alanina aminotransferase; ⁵FA: Fosfatase alcalina.

As correlações encontradas entre as características seminais e os metabólitos do plasma seminal estão apresentadas na Tabela 2. Foi notado que a concentração espermática foi a característica que apresentou correlação positiva e significativa com todos os metabólitos do plasma seminal avaliados. Sendo encontradas correlações entre a concentração espermática e proteínas totais ($r = 0,32$), albumina ($r = 0,32$), GGT ($r = 0,65$), AST ($r = 0,42$), ALT ($r = 0,23$) e FA ($r = 0,55$). O vigor apresentou correlação positiva e significativa com proteína total ($r = 0,26$), albumina ($r = 0,23$), GGT ($r = 0,36$), AST ($r = 0,31$) e FA ($r = 0,41$). Já para a motilidade progressiva notou-se correlações positivas e significativas somente com GGT ($r = 0,20$) e FA ($r = 0,19$). Notou-se correlação negativa e significativa entre defeitos espermáticos e GGT ($r = -0,16$). Também foram encontradas correlações negativas entre o percentual de células PIAIA e AST ($r = -0,27$) e ALT ($r = -0,25$).

Tabela 2: Coeficiente de correlação entre metabólitos do plasma seminal e características seminais de touros da raça Nelore.

	Motilidade progressiva (%)	Vigor (1-5)	Defeitos Totais (%)	PIAIA ¹ (%)	pH	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	GGT ² (UI/L)	AST ³ (UI/L)	ALT ⁴ (UI/L)	FA ⁵ (UI/L)
Concentração (x10 ⁶ /mL)	0,24 ^b	0,38 ^c	-0,14	0,04	-0,53 ^c	0,32 ^c	0,32 ^c	0,65 ^c	0,42 ^c	0,23 ^b	0,55 ^c
Motilidade progressiva (%)	-	0,66 ^c	-0,47 ^c	0,45 ^c	-0,23 ^b	0,11	0,11	0,20 ^a	0,07	-0,02	0,19 ^a
Vigor (1-5)		-	-0,39 ^c	0,28 ^b	-0,45 ^c	0,26 ^b	0,23 ^b	0,36 ^c	0,31 ^c	0,11	0,41 ^c
Defeitos Totais (%)			-	-0,52 ^c	0,09	-0,10	-0,08	-0,16 ^a	0,005	0,04	-0,09
PIAIA (%)				-	-0,02	-0,03	0,008	0,09	-0,27 ^b	-0,25 ^b	0,01
pH					-	-0,72 ^c	-0,61 ^c	-0,53 ^c	0,57 ^c	-0,31 ^c	-0,62 ^c
Proteína Total (g/dL)						-	0,85 ^c	0,37 ^c	0,56 ^c	0,39 ^c	0,54 ^c
Albumina (g/dL)							-	0,22 ^b	0,44 ^c	0,38 ^c	0,44 ^c
GGT (UI/L)								-	0,45 ^c	0,14	0,66 ^c
AST (UI/L)									-	0,58 ^c	0,42 ^c
ALT (UI/L)										-	0,26 ^b

^ap<0,05; ^bp<0,01; ^cp<0,001

¹PIAIA: Espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial; ²GGT: Gama glutamil-transferase;

³AST: Aspartato aminotransferase; ⁴ALT: Alanina aminotransferase; ⁵FA: Fosfatase alcalina.

Quando foi considerado o pH do sêmen, foram notadas correlações significativas negativas entre pH e concentração ($r = -0,51$), motilidade progressiva ($r = -0,23$), vigor ($r = -0,45$), proteína total ($r = -0,72$), albumina ($r = -0,61$), GGT ($r = -0,53$), ALT ($r = -0,31$) e FA ($r = -0,62$). Embora, correlação positiva significativa foi observada entre pH e AST ($r = 0,57$).

3.6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o perfil metabólico do plasma seminal e a correlação destes metabólitos com as características seminais de touros da raça Nelore. Em relação às características seminais, os resultados apresentados estão dentro dos valores aceitos de qualidade seminal para a espécie em questão, indo de encontro aos valores observados por Assumpção et al. (2013) para animais da mesma raça e idade.

A concentração de proteínas totais no plasma seminal variou de 0,25 a 5,82 g/dL com média de 1,56 g/dL, valores estes que estão de acordo com o encontrado por Silva et al. (2008) em touros mestiços mas são menores se comparados ao encontrado por Assumpção et al. (2013) em touros Nelore. As proteínas são importantes para a sobrevivência e função dos espermatozoides (ASSUMPÇÃO et al., 2005b), atuando como protetoras destas células durante a ejaculação (GÜNDOGAN, 2006). Há estudos mostrando que existe diferença na expressão de proteínas entre touros de alta e baixa fertilidade (KILLIAN et al., 1993). A correlação positiva entre proteínas totais e concentração espermática e a ausência de correlação entre proteínas totais e motilidade coincide com os estudos de Assumpção et al. (2013). Porém, os mesmos autores encontraram correlação positiva entre proteínas totais e defeitos espermáticos e não encontraram correlação entre proteínas totais e vigor, discordando dos achados deste estudo.

Como parte da composição das proteínas totais, Gündogan (2006) sugere que a albumina esteja relacionada com a motilidade espermática. Porém, no presente estudo, não foi encontrada correlação entre as concentrações de albumina e motilidade, apesar de encontrar correlação positiva com o vigor. Os valores de albumina encontrados neste estudo foram menores que os encontrados no plasma seminal de carneiros avaliados por Gündogan (2006).

Não foram encontrados dados na literatura sobre concentrações de GGT no plasma seminal bovino. Pesch et al. (2006) e Dogan et al. (2009) ao avaliarem o plasma seminal de equinos encontraram maiores concentrações de GGT que as encontradas neste estudo em bovinos. Houve correlação positiva entre GGT e motilidade progressiva e vigor, também

encontrada por López Rodríguez et al. (2013) em bodes. Isso pode ser explicado pelo fato desta enzima ter um papel de proteção à célula espermática contra o estresse oxidativo (PESCH et al., 2006).

As enzimas AST e ALT indicam a atividade de transaminases que, no sêmen, são indicadoras da qualidade seminal, pois estimam a estabilidade da membrana (COLENBRANDER et al., 1992; CORTEEL, 1980), o que pode ser observado no presente estudo, pois tais enzimas apresentaram correlação negativa com a concentração e a porcentagem de células PIAIA. Este achado vai de encontro ao exposto por Gündogan (2006) ao dizer que a concentração de transaminases aumenta quando há um aumento de danos nas membranas espermáticas. A concentração de AST encontrada no plasma seminal dos animais deste estudo apresentou uma amplitude maior que a encontrada no plasma seminal de equinos por Pesch et al. (2006) e Dogan et al. (2009). Entretanto, corrobora os valores encontrados no plasma seminal de carneiros (GÜNDOGAN, 2006). O mesmo aconteceu para os valores de ALT.

A FA pode ser utilizada como um marcador ejaculatório, diferenciando falhas na ejaculação de oligospermia ou azoospermia (SINGER et al., 1980; TURNER e MCDONNELL, 2003). O sêmen dos animais do presente estudo apresentaram correlação positiva entre FA e concentração espermática, da mesma forma que o observado no sêmen de humanos por Singer et al. (1980), de equinos por Dogan et al. (2009) e Pesch et al. (2006) e de bodes por López Rodríguez et al. (2013). Os últimos autores também encontram correlação positiva entre FA e motilidade progressiva, como o encontrado neste estudo, o que pode ser explicado por sua função de fosforilação de proteínas, uma vez que essa ação acontece por meio da proteína quinase que é necessária para a motilidade espermática (TANG e HOSKINS, 1975).

No presente estudo o pH apresentou valores dentro da normalidade para bovinos (HOSSAIN et al., 2012) e também apresentou correlação negativa com a concentração espermática; porém, Dogan et al. (2009) não encontraram correlação entre pH e concentração espermática em equinos. Além disso, deve ser lembrado que o volume do plasma seminal na ejaculação equina é proporcionalmente muito maior do que na ejaculação bovina. De acordo com a correlação negativa entre pH e concentração espermática encontrada no presente estudo, pode-se inferir que o pH do sêmen talvez seja influenciado pela concentração espermática.

Os ejaculados dos animais desta pesquisa apresentaram correlação positiva entre todos os componentes metabólicos avaliados e concentração espermática, sugestivo de

uma origem comum existente entre eles, sendo produzidos primariamente nos epidídimos e testículos (PESCH et al., 2006).

3.7. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu propor valores para proteínas totais, albumina, GGT, AST, ALT e FA, metabólitos presentes no plasma seminal, para touros da raça Nelore. Constata-se que há relação entre estes metabólitos do plasma seminal e as características seminais, sendo mais evidenciado que o aumento da concentração espermática reflete em aumento dos metabólitos do plasma seminal e redução no pH do sêmen. O aumento do vigor também está associado ao aumento de alguns metabólitos do plasma seminal, assim como, o aumento no percentual de espermatozoides com lesão de membranas leva ao aumento nas enzimas AST e ALT. Além disso, a redução do pH do sêmen está associada à redução da motilidade progressiva e vigor, bem como das proteínas totais, albumina, GGT, ALT e FA do plasma seminal.

ARTIGO 2

4. ARTIGO 2: BIOQUÍMICA SÉRICA E DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS NELORE COM DEGENERAÇÃO TESTICULAR

RESUMO

A degeneração testicular é uma das mais frequentes causas de infertilidade em touros, esta alteração pode causar disfunções bioquímicas no animal acometido; no entanto, não há estudos sobre estas disfunções, assim o presente trabalho tem como objetivo avaliar os metabólitos do plasma seminal e séricos de touros Nelore com degeneração testicular. Para isso, foram utilizados 22 touros da raça Nelore com idade média de $35 \pm 5,88$ meses, que foram distribuídos em dois grupos: Grupo Controle (CON; n=11) e Grupo Degeneração (DEG; n=11), neste último grupo os animais foram induzidos à degeneração testicular por meio de insulação escrotal. Foram realizadas 14 colheitas de sêmen, e 21 colheitas de sangue com intervalos semanais. O sêmen foi colhido por eletroejaculador e avaliado quanto à concentração, motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e pH. Após, o sêmen foi centrifugado para obtenção do plasma seminal, sendo submetido às avaliações metabólicas de proteína total, albumina, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). O sangue foi avaliado quanto às concentrações de proteína total, albumina, fibrinogênio, GGT, AST, creatina quinase (CK), glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol, triglicérides, betahidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA). Os dados foram submetidos à Análise de Variância, sendo adicionado o fator medidas repetidas no tempo, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo PROC MIXED do *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004). O nível de significância considerado foi de 5%. De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que a degeneração testicular induzida em touros Nelore causa elevação de pH do sêmen, bem como elevação da concentração de ALT e diminuição nas concentrações de GGT e FA no plasma seminal. Em relação às proteínas de fase aguda, a degeneração testicular causa diminuição na concentração de albumina. Em adição, este insulto local não altera os metabólitos séricos em touros Nelore.

Palavras-chave: Bovinos. Sêmen. Metabólitos. Infertilidade. Espermatozoide.

4.1. INTRODUÇÃO

A degeneração testicular é uma alteração que possui grande relevância dentre os distúrbios da reprodução, sendo relatada como o motivo mais frequente de infertilidade em touros, além das mais diversas espécies animais (ALVARENGA; PAPA, 2009; CELEGHINI et al., 2017; GARCIA, 2017). Esta afecção apresenta predisposição multifatorial (ALVES, 2014) e acontece devido à perda da termorregulação testicular, que causa o aumento da temperatura dos testículos (HANSEN, 2009).

Nas situações de injúria tecidual, o fígado produz uma série de metabólitos, dentre eles, as proteínas de fase aguda (PFA), que são consideradas indicadoras de resposta a processos inflamatórios de diferentes causas (GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994). O metabolismo animal pode ser avaliado através das análises de metabólitos que estão presentes no sangue e que em situações adversas podem se apresentar alterados. Assim pode-se avaliar o perfil hepático por meio das enzimas gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e creatina-quinase (CK) que podem indicar lesão tecidual. Já o perfil energético pode ser avaliado pelas dosagens de glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol, triglicérides, beta-hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA) (KANEKO et al., 2008).

Como o plasma sanguíneo pode conter informações sobre o perfil bioquímico acerca das alterações causadas por um processo inflamatório, também o plasma seminal pode ter informações importantes sobre o processo degenerativo testicular. Uma vez que este contém componentes bioquímicos atuantes na regulação da função espermática (PÉREZ-PÉ et al., 2001) como as enzimas GGT, AST, alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e proteínas com amplo panorama de ação, algumas das quais estão relacionadas com a fertilidade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

A avaliação seminal é de grande importância no diagnóstico da degeneração testicular, já que nesta afecção a principal alteração encontrada é o aumento dos espermatozoides morfologicamente anormais (HANSEN, 2009; PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADÁN, 2008). Um diagnóstico rápido e preciso da degeneração testicular é necessário, uma vez que, se retirada a causa, o animal pode voltar a ter produção espermática com os mesmos parâmetros observados anteriormente ao início de tal distúrbio (ROCHA et al., 2015).

4.2. OBJETIVOS

Com base nas informações apresentadas e na ausência de estudos que avaliam os metabólitos frente a um processo de degeneração testicular, o presente trabalho tem como objetivo avaliar se touros Nelore com degeneração testicular apresentam alterações em metabólitos do plasma seminal (proteína total, albumina, GGT, AST, ALT e FA), séricos (GGT, AST, CK, glicose, HDL, colesterol, triglicérides, BHB e NEFA) e nas proteínas de fase aguda (proteína total, albumina e fibrinogênio)

4.3. HIPÓTESES

Touros com degeneração testicular apresentam alterações nos metabólitos do plasma seminal, na proteínas de fase aguda por se tratar de uma injúria tecidual e mesmo sendo um insulto local, que estes animais apresentam alterações nos metabólitos sanguíneos.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Local e período experimental

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) e no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR), ambos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e no Laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos ambos da Universidade de São Paulo, *Campus* Fernando Costa, Pirassununga – SP, no período de setembro de 2016 a maio de 2017. Durante o estudo, a média diária de temperatura ambiente foi de $24,95 \pm 5,93^{\circ}\text{C}$ e a média da umidade relativa do ar foi de $69,60 \pm 20,19 \%$. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo número CEUA 9276100616.

4.4.2. Animais

Foram utilizados 22 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade média de $35 \pm 5,88$ meses e peso médio de $615 \pm 143,35$ kg. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais, em pastagem de capim brachiária (*Brachiaria sp*) e alimentados com silagem de milho, concentrado comercial e suplemento mineral de acordo com o NRC (1996), além de água à vontade.

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: Grupo controle (CON; n=11), no qual os touros não foram induzidos à degeneração testicular e Grupo degeneração (DEG; n=11), no qual os touros foram induzidos à degeneração testicular.

A degeneração testicular foi induzida por meio da insulação escrotal, realizada utilizando-se bolsas testiculares insuladoras, confeccionadas com três camadas de tecido: uma camada externa impermeável, uma camada média de material isolante e uma camada interna antiabrasiva, que ficou em contato direto com a superfície escrotal por 96 horas, segundo modelo proposto por Garcia (2004).

4.4.3. Delineamento experimental

O período experimental foi dividido em três fases (figura 1), nas quais foram realizadas as amostragens em todos os animais seguindo-se os mesmos procedimentos:

1. **Período Pré-insulação:** semanas -2 e -1 antes ao início da insulação testicular, neste período os touros permaneceram em regime de colheitas de sêmen e sangue semanais (duas colheitas, figura 1: células cinzas). Os dados deste período foram utilizados para a demonstração da homogeneidade dos grupos.
2. **Período Peri-insulação:** semana 0, durante um período de 96 horas os touros do grupo DEG permaneceram com as bolsas insuladoras, para indução da degeneração testicular. O momento da retirada da bolsa foi denominado tempo 0 e realizada uma colheita de sêmen. Para as avaliações de proteína de fase aguda, durante este período, foram colhidas amostras sanguíneas nos tempos: -96, -84, -72, -48, -24, 0, +24 e +72 horas (figura 1: células vermelhas)
3. **Período Pós-insulação:** semanas +1 a +11 após a remoção da bolsa insuladora, neste período os touros permaneceram em regime de colheita de sêmen e sangue semanais (doze colheitas, figura 1: células verdes), iniciando-se na semana 0, ou seja, imediatamente após a retirada das bolsas insuladoras.

Figura 1: Esquema experimental

Fonte: (NOGUEIRA, V. J. M, 2018)

Legenda: As colheitas de sêmen foram realizadas com intervalos semanais, iniciando-se duas semanas antes da insulação (período pré-insulação); imediatamente após a retirada da bolsa insuladora; e por 11 semanas após a insulação (período pós-insulação). As colheitas de sangue foram realizadas da seguinte forma: nos mesmos momentos que as colheitas de sêmen no período pré-insulação; durante o período peri insulação foram colhidas amostras sanguíneas nos tempos -92, 84, -72, -48, -24, 0, +24 e +72 horas; e no período pós-insulação foram realizadas colheitas nos mesmos momentos que as colheitas de sêmen.

4.4.4. Avaliações seminais

As colheitas seminais foram realizadas por eletroejaculação (Autojac V2, Neovet, Uberaba, MG – Brasil). O sêmen foi mantido em tubo de 15 mL pré-aquecido a 37° C. No laboratório avaliou-se concentração, motilidade progressiva, vigor, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e pH. Todas as avaliações foram realizadas pelos mesmos avaliadores.

4.4.4.1 Motilidade e concentração

As avaliações da motilidade foram realizadas sob temperatura de 37°C, colocando-se uma gota de 4µL de sêmen *in natura* entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica de contraste de fase (Eclipse E200, Nikon), com aumento de 100x. Para a concentração espermática, o sêmen foi diluído em 1:100 em formol salino tamponado a 4%, e as células espermáticas foram contadas em câmara de Neubauer em microscopia de contraste de fase (Eclipse E100, Nikon) sob aumento de 400x.

4.4.4.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial foram utilizados 150 µL de sêmen diluído em meio TALP (25×10^6 sperm/mL) adicionado das sondas fluorescentes: 2 µL de Hoescht 33342 (H342, 0,5 mg/mL, Thermo Fisher Scientific), 3 µL de iodeto de propídeo (PI, 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), 50 µL de aglutinina obtida de *Pisum sativum* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL, Sigma-Aldrich) e 2 µL de iodeto de 5,5',1,1'6,6'tetracloro' 3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocyanine (JC-1, 153 µM, Sigma-Aldrich) preparado como descrito por Celeghini et al. (2007) incubado durante 8 minutos à 37° C, no escuro.

Uma amostra de 8 µL foram analisadas por microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tokyo, Japan), usando o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm) com

aumento de 1000x. Foram analisadas 200 células por amostra. As células foram classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda fluorescente de acordo com a classificação de Celeghini et al. (2007), sendo considerada a porcentagem de espermatozoides que apresentou simultaneamente membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA).

4.4.4.3 Morfologia espermática

Os espermatozoides foram fixados em formol salino tamponado a 4% pré-aquecido a 37° C. Então, foram avaliadas 200 células, pela técnica da câmara úmida, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC modelo 80i, Nikon, Tokyo, Japão) com aumento de 1000x. As células espermáticas foram classificadas de acordo com Blom (1973) em porcentagem de defeitos maiores, menores e totais.

4.4.4.4 pH do sêmen

Após as análises espermáticas avaliou-se o pH do sêmen utilizando um medidor de pH (pH 21, Hanna Instruments®), em temperatura ambiente.

4.4.4.5 Metabólitos do plasma seminal

Após todas as análises, o sêmen foi processado para a obtenção do plasma seminal livre de espermatozoides. Para isso, foram realizadas duas centrifugações. A primeira centrifugação foi realizada à 450g, por 15 minutos em temperatura ambiente (Centrífuga clínica Centerbio®, modelo 80-2B), o sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente em centrífuga refrigerada (Centrífuga Hettich® Rotina 380R, 3044g, por 20 minutos, 4°C). Após as duas centrifugações o sobrenadante foi armazenado a -80°C em triplicata. Para a escolha deste protocolo de centrifugação foram realizados testes prévios para se chegar a um protocolo que após as centrifugações o plasma seminal estivesse livre de espermatozoides.

No momento das análises, os tubos contendo o plasma seminal foram descongelados em temperatura ambiente durante 15 minutos e os componentes metabólicos do plasma seminal foram quantificados no Laboratório Multiusuário de Análises

Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, *Campus* Fernando Costa, utilizando um analisador bioquímico automático (RX Daytona). Os metabólitos avaliados estão descritos a seguir com os respectivos kits utilizados: proteína total (TP4001, Randox®); albumina (AB3800, Randox®); gama-glutamil transferase (GGT) (GT3817, Randox®); aspartato aminotransferase (AST) (AS3804, Randox®); alanina aminotransferase (ALT) (AL3801, Randox®) e fosfatase alcalina (FA) (AP3802, Randox®).

4.4.5. Colheita e armazenamento do sangue

As amostras de sangue foram colhidas da veia coccígea utilizando o sistema de punção a vácuo. De cada animal foi colhido sangue para obtenção de soro e plasma utilizando-se tubos sem e com adição de anticoagulantes, respectivamente.

Os tubos para obtenção de soro foram centrifugados (Centrífuga Hettich® Rotina 380R, 2686g por 15 minutos a 4°C), sendo o soro e o plasma separados com o auxílio de pipetas em triplicatas em microtubos de 2,0 mL, devidamente identificados e armazenados à temperatura de -80°C.

4.4.6. Avaliação dos metabólitos sanguíneos

No momento das análises, os tubos contendo o soro sanguíneo foram descongelados em temperatura ambiente durante 15 minutos e os componentes metabólitos do soro foram quantificados no Laboratório Multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, *Campus* Fernando Costa, utilizando um analisador bioquímico automático (RX Daytona). Os metabólitos avaliados estão descritos a seguir com os respectivos kits utilizados: proteína total (TP4001, Randox®); albumina (AB3800, Randox®); GGT (GT3817, Randox®); AST (AS3804, Randox®); ALT (AL3801, Randox®); FA (AP3802, Randox®); creatina quinase (CK) (CK110; Randox®); glicose (GL3815; Randox®); triglicérides (TR3823; Randox®); colesterol (CH3810; Randox®); HDL (CH3811; Randox®); BHB (RB1007; Randox®); e NEFA (FA115; Randox®). A avaliação de fibrinogênio foi realizada por precipitação pelo calor, conforme descrito por Colville (2006).

4.4.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de *Shapiro-Wilk* (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica, quadrática ou inversa. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento for necessário, foram submetidos à Análise de Variância. À análise estatística foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diversos momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS). As análises por tempo foram realizadas quando as interações entre tempo e tratamentos foram significativas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de 5%.

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Sêmen

Os resultados das análises do sêmen estão apresentados nos períodos pré-insulação, referente à média das duas semanas que antecedem a insulação testicular (semanas -2 e -1) e pós-insulação, referente às médias semanais a partir do momento imediatamente após a remoção das bolsas insuladoras (semana 0) até 11 semanas após a insulação (semanas 1 a 11).

4.5.1.1 Motilidade e concentração

A degeneração testicular causou redução na motilidade espermática ao longo do tempo nos animais do grupo DEG ($p = 0,0004$) que se acentua da segunda à quarta semana pós-insulação, a qual não se observou nos animais do grupo CON. Além disso, houve interação tempo x tratamento nas semanas 2 ($p = 0,003$), 3 ($p = 0,0002$) e 4 ($p = 0,01$), ver figura 2.

Figura 2 – Média $\pm$ erro padrão semanais da motilidade espermática de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

A média da concentração espermática nos grupos de touros CON e DEG ao longo do tempo é demonstrada na figura 3.

Figura 3 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração espermática de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

O grupo DEG apresentou uma acentuada redução na concentração espermática ($p = 0,01$) com a insulação testicular, saindo de $410,64 \times 10^6$ sptz/mL antes da insulação e chegando a $108,35 \times 10^6$ sptz/mL na semana 3 pós-insulação.

4.5.1.2 Integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Os animais com degeneração testicular apresentaram queda na porcentagem de células PIAIA ao longo do tempo ($p = 0,0001$) o que não se observou nos animais do grupo controle (figura 4). Com esta queda os grupos foram diferentes nas semanas 2 ($p = 0,006$), 3 ($p = 0,001$), 4 ($p = 0,0001$), 5 ($p = 0,001$) e 6 ($p = 0,07$).

Figura 4 - Média $\pm$ erro padrão semanais da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) semanal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.1.3 Morfologia espermática

Ao longo do tempo a porcentagem de defeitos totais dos espermatozoides, tanto nos animais do grupo CON ($p = 0,04$) quanto nos animais do grupo DEG ($p < 0,0001$), sofreu variação (figura 5). Na primeira semana pós-insulação já se pode observar aumento nos defeitos totais no grupo DEG, com pico por volta da terceira semana pós-insulação, na qual o valor médio se encontra em 59,85%. Notável diferença quando comparado com os mesmos animais antes da insulação (13,90%) e com os animais do grupo CON na mesma semana (4,65%). A diferença entre os grupos se mantém em praticamente todas as semanas: semana 1 ($p = 0,0002$), 2 ($p < 0,0001$), 3 ($p < 0,0001$), 4 ($p < 0,0001$), 5 ($p < 0,0001$), 6 ($p = 0,002$), 7 ($p < 0,0001$), 8 ($p = 0,007$), 9 ($p = 0,02$) e 11 ($p = 0,02$).

Figura 5 - Média $\pm$ erro padrão semanais da porcentagem de defeitos totais dos espermatozoides de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.1.4 pH do sêmen

O pH do sêmen do grupo DEG sofreu alteração ao longo do tempo ($p = 0,0002$) e se apresentou aumentado ($p = 0,01$) em relação ao grupo CON apenas na semana 3 (figura 6).

Figura 6 – Média $\pm$ erro padrão semanais do pH do sêmen de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.2. Plasma Seminal

Os resultados das análises dos metabólitos do plasma seminal também estão apresentados nos períodos pré-insulação (média das semanas -2 e -1) e pós-insulação (médias semanais da semana 0 até 11).

4.5.2.1 Proteína total e albumina

As médias das concentrações de proteína total e de albumina do plasma seminal nos grupos de touros CON e DEG ao longo do tempo são demonstradas nas figuras 7 e 8.

Figura 7 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de proteína total do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

A concentração da proteína total do plasma seminal não sofreu alterações ao longo do tempo em nenhum dos dois grupos avaliados, assim como não houve diferença entre os grupos.

Figura 8 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de albumina do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

*

A concentração de albumina sofreu alteração ao longo do tempo em ambos os grupos CON ($p = 0,01$) e DEG ($p = 0,02$); porém, não diferiu entre os grupos.

4.5.2.2 GGT

A concentração da enzima GGT alterou-se ao longo do tempo em ambos os grupos ($p < 0,0001$), sendo que na semana 3 ($p = 0,07$) e na semana 8 ($p = 0,04$), os níveis de GGT do grupo DEG apresentaram queda quando comparados ao grupo CON (figura 9).

Figura 9 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de gama-glutamil transferase (GGT) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.2.3 AST

A figura 10 apresenta a concentração da enzima AST que se manteve constante ao longo do tempo.

Figura 10 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de aspartato aminotransferase (AST) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.2.4 ALT

Ao longo do tempo, os animais com degeneração testicular apresentaram inconstância na concentração da enzima ALT ($p = 0,0004$), podendo ser observado que nas semanas 2 ($p = 0,008$), 3 ($p = 0,03$) e 4 ($p = 0,03$) esta enzima se apresentou com a concentração elevada em relação ao grupo CON (figura 11).

Figura 11 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de alanina aminotransferase (ALT) do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.2.5 Fosfatase alcalina

Ao contrário do que aconteceu com o grupo CON, os animais do grupo DEG sofreram alterações ($p = 0,0003$) na concentração média de fosfatase alcalina, que na semana 3 apresentou queda se diferenciando estatisticamente entre os grupos ($p = 0,04$) (figura 12).

Figura 12 – Média $\pm$ erro padrão semanais da concentração de fosfatase alcalina do plasma seminal de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.5.3. Proteínas de fase aguda

Os resultados para proteínas de fase aguda estão demonstrados em 168 horas do período peri-insulação: -96, -84, -72, -48, -24, 0, +24 e +72 horas, sendo a hora -96 o momento da colocação da bolsa insuladora e a hora 0 o momento da retirada da bolsa.

As médias da concentração de proteína total, albumina e fibrinogênio nos grupos de touros CON e DEG ao longo do tempo, estão demonstradas nas figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

Figura 13 – Média $\pm$ erro padrão da concentração de proteína total sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), no período de 168 horas peri-insulação, iniciando-se 96 horas antes da retirada da bolsa até 72 horas após a retirada da bolsa.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

A concentração média de proteína total sofreu variação ao longo do tempo nos grupos estudados ($p < 0,0001$), porém não diferiu entre os grupos.

Figura 14 – Média $\pm$ erro padrão da concentração de albumina sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), no período de 168 horas peri-insulação, iniciando-se 96 horas antes da retirada da bolsa até 72 horas após a retirada da bolsa.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Assim como a proteína total, a concentração média de albumina apresentou variação ao longo do tempo nos grupos ($p < 0,0001$), porém esta última sofreu queda na concentração média nos animais com degeneração testicular, apenas no tempo 8 ($p = 0,04$).

Figura 15 – Média $\pm$ erro padrão da concentração de fibrinogênio sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), no período de 168 horas peri-insulação, iniciando-se 96 horas antes da retirada da bolsa até 72 horas após a retirada da bolsa.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Embora se observe variação na concentração de fibrinogênio, esta não foi suficiente para causar diferença entre os grupos.

4.5.4. Metabólitos séricos

Os resultados das análises da bioquímica sérica estão apresentados nos períodos pré-insulação, referente à média das duas semanas que antecedem a insulação testicular (semanas -2 e -1) e pós-insulação, referente às médias semanais a partir do momento de colocação das bolsas insuladoras (semana -1), momento imediatamente após a remoção das bolsas insuladoras (semana 0) até 11 semanas após a insulação (semanas 1 a 11).

As médias das concentrações de proteína total, albumina e fibrinogênio nos grupos de touros CON e DEG ao longo do tempo, estão demonstradas, respectivamente, nas figuras 16, 17 e 18.

Figura 16 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de proteína total sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

A concentração média de proteína total se alterou ao longo do tempo nos grupos e os animais com degeneração testicular apresentaram queda na concentração média de proteína total na semana 3 ($p = 0,03$) quando comparado ao grupo CON.

Figura 17 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de albumina sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 18 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de fibrinogênio sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

As concentrações médias de albumina e fibrinogênio sofreram alterações ao longo do tempo em ambos os grupos ($p < 0,0001$), porém nenhum destes metabólitos se diferiram entre os grupos.

Nas figuras 19, 20 e 21 são apresentadas as concentrações médias de GGT, AST e CK, respectivamente. Estas enzimas apresentaram alteração ao longo do tempo: GGT e AST (CON e DEG = $p < 0,0001$) e CK (CON: $p = 0,0002$; DEG: $p = 0,05$), porém não houve diferença entre os grupos para as três enzimas.

Figura 19 – Média $\pm$ erro padrão da concentração de gama-glutamil transferase (GGT) sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 20 – Média $\pm$ erro padrão da concentração de aspartato aminotransferase (AST) sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 21 – Média $\pm$ erro padrão da concentração de creatinina quinase (CK) sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

As concentrações médias de glicose plasmática, HDL, colesterol, triglicérides (CON e DEG = $p < 0,0001$), BHB (CON: $p < 0,0001$; DEG: $p = 0,0002$) e NEFA (CON: $p = 0,002$; DEG: $p < 0,0001$) sofreram alterações ao longo do tempo e estão demonstradas, respectivamente, nas figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27. Porém em nenhum destes metabólitos houve diferença entre os grupos estudados.

Figura 22 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de glicose plasmática de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 23 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) sérica de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 24 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de colesterol sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 25 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de triglicérides sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 26 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de beta-hidroxibutirato (BHB) sérico de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

Figura 27 – Média $\pm$ erro padrão semanais das concentrações de ácidos graxos não esterificados (NEFA) séricos de touros da raça Nelore induzidos à degeneração testicular (DEG) ou não (CON), desde o período pré-insulação até 11 semanas pós-insulação.

Fonte: (NOGUEIRA, V.J.M., 2018).

Legenda: *Retirada da bolsa insuladora.

4.6. DISCUSSÃO

No presente estudo realizou-se a indução da degeneração testicular em touros Nelore para avaliar como se comportam alguns metabólitos séricos e do plasma seminal ao longo do tempo comparando-os com touros da mesma raça sem degeneração testicular. Observando os resultados das avaliações seminais pode-se notar que a insulação escrotal foi efetiva para induzir a degeneração testicular, uma vez que estes dados corroboram os encontrados por Souza (2004) e Garcia (2004). Também foi observado que, conforme afirmou Garcia (2017), a morfologia espermática é a característica mais afetada com o processo de degeneração testicular.

O pH do sêmen se apresentou aumentado no grupo DEG na terceira semana após a retirada da bolsa insuladora e, neste mesmo tempo, a concentração espermática diminuiu nos animais com degeneração. Estes dados vão de encontro ao proposto por Nogueira et al. (dados não publicados - artigo 1), no qual se verificou correlação negativa ($r = -0,53$; $p < 0,001$) entre concentração espermática e pH do sêmen.

Os valores médios dos metabólitos do plasma seminal avaliados neste estudo estão dentro da normalidade para a espécie e raça estudada (NOGUEIRA et al., dados não publicados – artigo 1). A concentração média de proteína total do plasma seminal não diferiu entre os grupos no presente estudo, o mesmo foi encontrado por Wolfe et al. (1993) ao avaliarem, por eletroforese, o perfil proteico de touros com degeneração testicular.

As enzimas AST e ALT podem ser utilizadas para estimar a qualidade seminal, pois indicam a atividade de transaminases. Estas enzimas são encontradas dentro das células espermáticas em espermatozoides íntegros e também no plasma seminal (CORTEEL, 1980; COLENBRANDER et al., 1992). Gundogan (2006) diz que a concentração de transaminases se eleva no plasma seminal quando há aumento de danos nas membranas espermáticas e no presente estudo se observa aumento na concentração de ALT dos animais do grupo DEG nos mesmos tempos em que, nestes animais, houve diminuição na concentração de células PLIAA, porém a concentração de AST não diferiu entre os grupos.

No plasma seminal, a GGT tem a função de proteção da célula espermática contra o estresse oxidativo (PESCH et al., 2006). Esta enzima apresenta correlação positiva ($r = +0,20$; $p < 0,05$) com a motilidade espermática em touros (Nogueira et al., dados não publicados – artigo 1) e bodes (LÓPEZ-RODRIGUEZ et al., 2013). O que também se observou no presente estudo, onde foi encontrada diminuição na concentração média de GGT dos animais do grupo DEG no mesmo tempo que estes animais apresentaram queda na motilidade espermática. Porém, na nona semana após a retirada das bolsas insuladoras houve queda na concentração de GGT nos animais com degeneração sem alteração na motilidade espermática.

Os animais com degeneração testicular do presente estudo apresentaram queda na fosfatase alcalina que acompanhou a queda na concentração espermática. Alguns autores afirmaram que a FA apresenta correlação positiva com a concentração espermática em diferentes espécies animais (SINGER et al., 1980; DOGAN et al., 2009; PESCH et al., 2006; LÓPEZ-RODRIGUEZ et al., 2013) e também com a motilidade espermática (LÓPEZ-RODRIGUEZ et al., 2013).

Como a degeneração testicular dos animais deste estudo aconteceu por um aumento de temperatura local e os animais foram divididos de forma homogênea entre os grupos,

nota-se que esta afecção não foi capaz de causar alterações sistêmicas e, como as variações encontradas nos tempos avaliados aconteceram em ambos os grupos, estas podem ser explicadas por alterações climáticas, alimentares e de manejo dos animais.

4.7. CONCLUSÃO

A degeneração testicular causada por um insulto local (aumento de temperatura por insulação testicular, neste caso) leva a alterações espermáticas como diminuição da motilidade espermática e das células PIAIA, bem como aumento dos defeitos espermáticos. Além disso, causa aumento do pH do sêmen. A bioquímica do plasma seminal revela queda nas concentrações de GGT e FA e aumento na concentração ALT. Porém, não leva a alterações sistêmicas capazes de alterar os metabólitos séricos avaliados neste estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo foi possível propor valores para proteínas totais, albumina, GGT, AST, ALT e FA do plasma seminal de touros Nelore, além de constatar a existência de relação entre estes metabólitos do plasma seminal e as características espermáticas avaliadas, que foram motilidade, vigor, concentração, células PIAIA, morfologia espermática e pH do sêmen. Ao estudar touros Nelore com degeneração testicular foi possível verificar que esta afecção altera as concentrações de GGT, ALT e FA do plasma seminal, porém não causa alterações sistêmicas no que diz respeito aos metabólitos séricos avaliados.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em ganhos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Suplemento**, n.6, p.204-209, 2009.
- ALVES, M. B. R. Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade. 2014. **Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.
- AQUINO-CORTEZ, A. I., SILVA, L. D. M., ARAÚJO, A. A., MENEZES, E. S. B., MOURA, A. A. A. Proteins of the canine seminal plasma Proteínas do plasma seminal canino. **Ciência Rural**, 4646, p.901–908, 2016.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145–151, 2011.
- ARRUDA, R.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, p.47–60, 2015.
- ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; REZAIL, S. A.; ANSARI, M. H. K. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.308–313, 2007.
- ASSUMPÇÃO, T. I.; FONTES, W.; SOUSA, M. V; RICART, C. A. O. Proteome analysis of Nelore bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. **Protein and Peptide Letters**, v.12, p.813–817, 2005a.
- ASSUMPÇÃO, T.I., TORRES JÚNIOR, R.A.A., SOUSA, M. V, RICART, C. A. O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.55–61,2005b.
- ASSUMPÇÃO, T. I.; YONEYAMA, K. A. G.; PALLAORO, R.; KITAGAWA, C.; ALBERTON, C. Perfil de proteínas e açúcares do plasma seminal e sua relação com os parâmetros andrológicos de touros da raça nelore. **Bioscience Journal**, v.29, p.940–945, 2013.
- AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v.46, p.791–797, 1996.
- BATISSACO, L.; CELEGHINI, E. C. C.; PINAFFI, F. L. V.; OLIVEIRA, B. M. M.; ANDRADE, A. F. C.; SERRANO-RECALDE, E. C.; FERNANDES, C. B. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, p. 384-395, 2013.

BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Palestra Patologias do Sistema Reprodutor de Touros. **Biológico**, v.69, n.2, p.43-48, 2007.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v.25, p.339-383, 1973.

BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3105-3124, 2004.

CAPRARO, G. A.; COUGHLIN, B. F.; MADER, T. J.; SMITHLINE, H. A.. Testicular cooling associated with testicular torsion and its detection by infrared thermography: an experimental study in sheep. **The journal of urology**, v. 180, n. 6, p. 2688-2693, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479–488., 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M.; BATISSACO, L.; PINTO, S. C. C.; GONZAGA, V. H. G.; NOGUEIRA, V. J. M.; GARCIA-OLIVEROS, L. N.; ALMEIDA, F. S. Degeneração testicular: visão científica. **Documentos Embrapa**, v. 146, p. 30-36, 2017.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, No. 2, pp. 85-99, 2005.

CHIKHI, N., HOLIC, N., GUELLAEN, G., LAPERCHÉ, Y., Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122, p.367–380, 1999.

CLEMENTS, K. M.; SHIPLEY, C. F.; COLEMAN, D. A.; EHRHART, E. J.; HASCHEK, W. M.; CLARK S. G. Azoospermia in an 8-month-old boar due to bilateral obstruction at the testis/epididymis interface. **Canadian Veterinary Journal**, v.51, p.1130–1134, 2010

CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Bovinocultura de Corte: Balanço 2017. 2016. Disponível em: <www.cnabrazil.org.br>. Acesso em: 07 jun. 2018.

COLENBRANDER, B., FAZELI, A.R., VAN BUITEN, A., PARLEVLIET, J., GADELLA, B.M.,. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.88, p.49–58,1992.

CONTRERAS, P. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

CORTEEL, J. M.. Effects of Seminal Plasma on the Survival and Fertility of Spermatozoa Kept In vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v.20, p.1111–1123, 1980.

COSTA E SILVA, E. V.; COSTA FILHO, L. C. C.; SOUZA, C. C.; OLIVEIRA, C. C.; QUEIROZ, V. L. D.; ZÚCCARI, C. E. S. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.22-31, 2015.

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

DELANGHE, J.; COMHAIRE, F.; BUYZERE, M.; VERMEULEN, L. Altered glycosylation of γ -glutamyltranspeptidase (GGT) in seminal fluid from men with accessory gland infection. **International Journal Andrology**, v.8, p.186-192, 1985.

DOGAN, I.; POLAT, U.; NUR, Z. Correlations between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of Arabian horses. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.10, p.119–124, 2009.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touro Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 258f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004.

GARCIA, A. R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41 n.1, p. 33–39, 2017.

GATTI, J.-L., CASTELLA, S., DACHEUX, F., ECROYD, H., MÉTAYER, S., THIMON, V., DACHEUX, J.-L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p. 321–339, 2004.

GOBELLO, C., CASTEX, G., CORRADA, Y. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. **Theriogenology**, v.57, p.1285–1291, 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000a.

GONZÁLEZ, F. H. D; Uso do perfil metabólico no diagnóstico de doenças metabólico-nutricionais. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000b.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, p.1009–1018. 1994.

GÜNDOĞAN, M.. Some Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents in Relation to Season in Akkaraman and Awassi Rams. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, v.30, p.95–100, 2006.

- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 364, n. 1534, p. 3341–3350, 27 nov. 2009.
- HOSSAIN, M. E.; KHATUN, M. M.; ISLAM, M. M.; MIAZI, O. F. Semen characteristics of breeding bulls at the Central Cattle Breeding and Dairy Farm of Bangladesh. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v.41, p.1–5, 2012.
- JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.33, p.536–551, 2012.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 7 ed. San Diego: Academic Press, 2018. 916p.
- KILLIAN, G.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202–1207, 1993.
- KING, G.J., MACPHERSON, J.W. Alkaline* and Acid** Phosphatase Activity, pH and Osmotic Pressure of Boar Semen. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.30, p.304–307, 1966.
- LÓPEZ RODRÍGUEZ, A.; RIJSSELAERE, T.; BEEK, J.; VYT, P., VAN SOOM, A.; MAES, D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.59, p.5–12, 2013.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.403–408, 2008.
- MARTINO, P. M.; GALOSI, A. B.; BITELLI, M.; CONSONNI, P.; FIORINI, F.; GRANATA, A.; GUNELLI, R.; LINGUORI, G.; PALAZZO, S.; PAVAN, N.; SCATTONI, V.; VIRGILI, G. Practical recommendations for performing ultrasound scanning in the urological and andrological fields. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, p.56-78, 2014.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.169–188. , 2007.
- MOURA, A. A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v.73, p.2006–2020, 2010.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**. v. 168, p. 28–40, 2004.
- NASCIMENTO, E.F; SANTOS, R.L. Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan S.A.**, p. 96, 2003.
- NDLOVU, T.; CHIMONYO, M.; OKOH A. I.; MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; RAATS, J. G. Assessing the nutritional status of beef cattle: current practices and future prospects. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.24, p. 2727-2734, 2007.

NETO, C.R.; RODELLO, L.; BICUDO, S.D. Termografia escrotal em ovinos pré-púbers submetidos a estresse térmico. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 1271, 2011.

OLIVEIRA, B. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v.82, p.767–772, 2014.

PAUL, C.; MURRAY, A. A.; SPEARS, N.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 913–919, 2009.

PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability , sperm DNA integrity , and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 40–47, 2008.

PÉREZ-PÉ, R.; BARRIOS, B.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.760, p.113–121, 2001.

PESCH, S., BERGMANN, M., BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v.66, p.307–313, 2006.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163–187, 2004.

REGO, J.P.A., CRISP, J.M., MOURA, A.A., NOUWENS, A.S., LI, Y., VENUS, B., CORBET, N.J., CORBET, D.H., BURNS, B.M., BOE-HANSEN, G.B., MCGOWAN, M.R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v.148, p.1–17, 2014.

REGO, J.P.A., MOURA, A.A., NOUWENS, A.S., MCGOWAN, M.R., BOE-HANSEN, G.B. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. **Animal Reproduction Science**, v.160, p.126–137, 2015.

REYES-MORENO, C., BOILARD, M., SULLIVAN, R., SIRARD, M.-A. Characterization and Identification of Epididymal Factors That Protect Ejaculated Bovine Sperm During In Vitro Storage. **Biology of Reproduction**, v.66, p.159–166, 2002.

ROCHA, D. R. et al. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1291–1305, 2015.

RODRIGUES, B. DE Á., DONÁ, A.V., RODRIGUES, J.L. Influência da secreção prostática autóloga sobre a viabilidade de espermatozóides caninos no pós-descongelamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, p.316–323, 1999.

SANTOS, G.; TORTORELLA, R. D.; FAUSTO, D. Rentabilidade da monta natural e inseminação artificial em tempo fixo na pecuária de corte. **Revista iPecege**, v.4, n.1, p.28-32, 2018.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. et al. Seminal plasma proteins: What role do they play? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. SUPPL. 1, p. 11–22, 2011.

SCHAER-SOMI, S., FROLICH, T., SCHWENDENWEIN, I. Measurement of Alkaline Phosphatase in Canine Seminal Plasma – An Update. ., n.d.

SELIGMAN, J., NEWTON, G.L., FAHEY, R.C., SHALGI, R., KOSOWER, N.S. Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: Role of γ -glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. **Journal of Andrology**, v.26, p.629–637, 2005.

SETCHELL, B. P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 179–194, nov. 1998.

SHIVAJI, S.; SCHEIT, K. H.; BHARGAVA, P. M. **Proteins of seminal plasma**. New York: John Wiley, 1990. 526p

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam. **Embrapa – CNPGC**. Campo Grande, 1993.

SILVA, E. V.; SOARES, P.; SANTOS JUNIOR, M. J.; OLIVEIRA, F.; JACOMINI, J.O. Perfil Sds-Page Do Plasma Seminal E Avaliação Morfofisiológica Dos Espermatozoides De Ejaculados De Touros Mestiços, 2008.

SINGER, R.; BARNET, M.; ALLALOUF, D.; SCHWARTZMAN, S.; SAGIV, M.; LANDAU, B.; SEGENREICH, E.; SERVADIO, C. Some Properties of Acid and Alkaline Phosphatase in Seminal Fluid and Isolated Sperm. **Archives of Andrology**, v.5, p.195–199, 1980.

SOUZA, L. W. O. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF-1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular**. 2004. 184f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Proteínas. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 303-341.

TANG, F.Y., HOSKINS, D.D. Phosphoprotein phosphatase of bovine epididymal spermatozoa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.62, p.328–335, 1975.

TURNER, R.M.O., MCDONNELL, S.M. Alkaline phosphatase in stallion semen: Characterization and clinical applications. **Theriogenology**, v.60, p.1–10, 2003.

WITE, I. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. P.212-228.

WITTWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

WOLFE, D. F.; BRADLEY, J. T.; RIDDELL, M. G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm protins in ejaculates from normospermic bulls and bull thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083–1091, 1993.

YUE, D.; YAN, L.; LUO, H.; XU, Z.; JIN, X. Effect of vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 217-222, 2010.