GRACIANA CORRÊA ROMITTO

**Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal
e características ligadas ao desempenho reprodutivo
de touros de corte**

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 Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Prof. Dra. Valquiria Hyppólito Barnabe

São Paulo
2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1315
FMVZ

Romitto, Graciana Corrêa

Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte / Graciana Corrêa Romitto. – São Paulo : G. C. Romitto, 2003.
192 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquiria Hyppólito Barnabe.

1. Proteínas. 2. Plasma seminal. 3. Touros. 4. Eletroforese bidimensional. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: ROMITTO, Graciana Corrêa

Título: Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte

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 Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais,
Plínio e Maria Conceição,
pelo amor e apoio incondicionais,*

Dedico

*Ao meu noivo,
Júnior,
pelos nossos sonhos,*

Ofereço

*À Dra. Valquiria,
Orientadora e amiga,
Pelo incentivo durante todos estes anos,*

Uma homenagem

*Ao Marcelo Roncoletta,
Pela colaboração imensurável na realização deste trabalho,*

Um agradecimento especial

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha família e ao meu noivo, pela compreensão e força em todos os momentos;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/Jaboticabal;

À FAPESP, pelo apoio financeiro;

À Dra. Valquíria, por abrir as portas da pesquisa durante a minha formação profissional, e pela confiança e apoio durante todos estes anos;

Ao Dr. Renato, pelo carinho, consideração e exemplo;

À Fazenda Don Pierino, pela permissão do uso dos animais e pela hospitalidade;

Ao LARA/SP, especialmente ao Dr. Deák e Dra. Gonçalves, por permitirem a continuidade deste trabalho;

Ao Marcelo, pela grande amizade, por todas as infinitas vezes que respondeu às minhas dúvidas e me direcionou na condução deste trabalho, e pela inesgotável paciência;

Ao Marcílio, pela colaboração nas análises estatísticas e quantificação de lipoperoxidação, mas principalmente pela amizade e companheirismo com que posso contar a qualquer momento;

À Roberta, pela idéia inicial, auxílio no planejamento e início das atividades deste trabalho;

A todos os que participaram das viagens de coleta a campo: Dra. Valquíria, Marcílio, Roberta, Carmen, Ricardo, Thiesa, Deni, Lucas e Junior, pela colaboração e pelos momentos inesquecíveis;

Aos meus amigos Erika e Kleber, pelas muitas risadas;

A todos os pós-graduandos do VRA (USP) e do DMVPRA (UNESP) com quem convivi, dos quais não vou citar nomes pois a lista seria muito grande, obrigada pelo companheirismo e amizade;

Aos docentes e funcionários do VRA (USP) e do DMVPRA (UNESP), pelo apoio;

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

ROMITTO, G. C. **Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte.** [Two-dimensional seminal plasma proteins profile and traits linked to beef bulls' reproductive performance]. 2003. 192 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Estudou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros das raças Nelore (*Bos taurus primigerus indicus*) e Simental (*Bos taurus primigerus taurus*), criados a campo, em regime de acasalamento múltiplo e manejo extensivo, na região de Dourados/MS, a fim de analisar a relação entre estas proteínas e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros. Coletaram-se amostras de sêmen no período de inverno (Julho/2001) e verão (Fevereiro/2002), realizando-se inicialmente o exame andrológico nos animais, e em seguida a análise padrão do sêmen. O plasma seminal foi, então, submetido à dosagem de proteínas totais, à dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), para avaliação da ocorrência de lipoperoxidação, e à eletroforese bidimensional de proteínas. Para análise do perfil proteico de plasma seminal de cada raça, foram utilizados os seguintes parâmetros: comparação entre os períodos de inverno e verão; comparação de grupos de amostras separados de acordo com a quantificação de características ligadas ao desempenho reprodutivo (morfologia espermática, dosagem de proteína total e dosagem de TBARS); e comparação de grupos de amostras separados de acordo com classificações para avaliação da capacidade reprodutiva, previamente descritas na literatura (*Breeding Soundness Evaluations – BSEs*). Os touros da raça Simental demonstraram menor adaptação às condições ambientais tropicais, com valores mais altos de defeitos espermáticos maiores, proteína total e dosagem de TBARS no período de verão. Observou-se grande variabilidade no perfil proteico entre as raças Nelore e Simental e, dentro de cada raça, encontrou-se expressiva variação individual. O

perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore apresentou 155 spots, entre os quais 04 se destacaram como possíveis marcadores de características ligadas ao desempenho reprodutivo. Já na raça Simental foram identificados 248 spots, com destaque para 04 spots, que demonstraram maior potencial como marcadores de características de interesse para a reprodução. Os resultados mostram que o perfil de proteínas de plasma seminal está relacionado ao desempenho reprodutivo de touros, fazendo-se necessários maiores estudos sobre as proteínas que se destacaram como marcadores, a fim de identificar as funções que elas exercem no trato reprodutivo e nos eventos ligados à fertilização.

Palavras-chave: Proteínas. Plasma seminal. Touros. Eletroforese bidimensional.

ABSTRACT

ROMITTO, G. C. **Two-dimensional seminal plasma proteins profile and traits linked to beef bulls' reproductive performance.** [Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte]. 2003. 192 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Seminal plasma proteins profiles from Nelore (*Bos taurus primigerus indicus*) and Simmental (*Bos taurus primigerus taurus*) bulls, used for multiple-sire breeding under range conditions, at Dourados/MS region, were studied aiming to analyze the relation between these proteins and traits linked to bulls' reproductive performance. Semen samples were collected in the winter (July/2001) and summer (February/2002). Initially, an andrological examination was performed, followed by standard semen analysis. Seminal plasma was subjected to total protein quantification, thiobarbituric acid reactive substances quantification (TBARS, to evaluate lipid peroxidation), and two-dimensional protein electrophoresis. To analyze seminal plasma protein profile of each breed, the following parameters were used: comparison between winter and summer, comparison among groups of samples divided by quantification of traits linked to reproductive performance (sperm morphology, total protein quantification, TBARS quantification) and comparison among groups of samples divided by breeding soundness evaluations (BSEs), previously reported in literature. Simmental bulls showed lower adaptability to tropical environment conditions, with higher values of major sperm defects, total protein and TBARS in the summer. A great variability was observed in the protein profile between Nelore and Simmental breeds, and, for each breed it was found great individual variability too. Nelore seminal plasma protein profile presented 155 spots, 04 of which were considered potential markers for traits linked to reproductive performance. For Simmental breed, 248 spots were identified, with special interest for 04 spots, which showed higher potential as markers to reproductive characteristics. Results show that seminal plasma

protein profile is related to bulls' reproductive performance. Further studies about those proteins which are potential markers are needed, to determine their function at bulls' reproductive system and in the events related to fertilization.

Key words: Proteins. Seminal plasma. Bulls. Two-dimensional electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Gel bidimensional de proteína de plasma seminal, obtido a partir de amostra de sêmen de touro da raça Nelore, com destaque para os spots com maior potencial como marcadores de características ligadas ao desempenho reprodutivo.....	191
Figura 2 – Gel bidimensional de proteína de plasma seminal, obtido a partir de amostra de sêmen de touro da raça Simental, com destaque para os spots com maior potencial como marcadores de características ligadas ao desempenho reprodutivo.....	192

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 – Dados meteorológicos (temperaturas médias, máximas e mínimas) da região de Dourados/MS durante o período experimental – maio-jul 2001/dez 2001-fev 2002.....	58
Gráfico 2 – Umidade relativa do ar (%) e incidência pluviométrica (mm de chuva) da região de Dourados/MS durante o período experimental – maio-jul 2001/dez 2001-fev 2002.....	58
Gráfico 3 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 5 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	102
Gráfico 4 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 6 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	102
Gráfico 5 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 23 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	103
Gráfico 6 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 34 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	103
Gráfico 7 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 64 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	104
Gráfico 8 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 70 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	104
Gráfico 9 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 86 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	105

Gráfico 10 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 134 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	105
Gráfico 11 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 166 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	106
Gráfico 12 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 190 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos períodos de inverno e verão.....	106
Gráfico 13 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 224 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos períodos de inverno e verão.....	107
Gráfico 14 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 327 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos períodos de inverno e verão.....	107
Gráfico 15 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 172 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais.....	110
Gráfico 16 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 121 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais.....	110
Gráfico 17 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 128 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais.....	111
Gráfico 18 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 224 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais.....	111

Gráfico 19 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 287 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais.....	112
Gráfico 20 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 69 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de porcentagem de defeitos maiores.....	115
Gráfico 21 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 6 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de defeitos maiores	115
Gráfico 22 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 156 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de defeitos maiores.....	116
Gráfico 23 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 223 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de defeitos maiores.....	116
Gráfico 24 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 327 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de porcentagem de defeitos maiores.....	117
Gráfico 25 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 44 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.....	121
Gráfico 26 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 6 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.....	121
Gráfico 27 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 156 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.....	122

Gráfico 28 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 287 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.....	122
Gráfico 29 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 5 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	126
Gráfico 30 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 7 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	126
Gráfico 31 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 68 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	127
Gráfico 32 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 174 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	127
Gráfico 33 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 156 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	128
Gráfico 34 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 224 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	128
Gráfico 35 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 34 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	131
Gráfico 36 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 64 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	131

Gráfico 37 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 70 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	132
Gráfico 38 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 82 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	132
Gráfico 39 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 139 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	133
Gráfico 40 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 140 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	133
Gráfico 41 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 156 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	134
Gráfico 42 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 263 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.....	134
Gráfico 43 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 70 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.....	136
Gráfico 44 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 82 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.....	136

Gráfico 45 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 139 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.....	137
Gráfico 46 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 140 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.....	137
Gráfico 47 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 146 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.....	138
Gráfico 48 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 147 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Nelore , nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.....	138
Gráfico 49 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 119 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.....	140
Gráfico 50 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 162 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.....	140
Gráfico 51 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 163 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.....	141
Gráfico 52 –	Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 263 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.....	141

Gráfico 53 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 293 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.....	142
Gráfico 54 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do SPOT 294 , nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça Simental , nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.....	142

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Critérios para divisão de touros Nelore em reprodutores superiores, satisfatórios e insatisfatórios, de acordo com a BSE-2.....	73
Tabela 2 – Valores de média e desvio padrão de motilidade progressiva retilínea, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	76
Tabela 3 – Valores de média e desvio padrão de motilidade progressiva retilínea, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	77
Tabela 4 – Valores de média e desvio padrão de perímetro escrotal, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	77
Tabela 5 – Valores de média e desvio padrão de perímetro escrotal, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	78
Tabela 6 – Valores de média e desvio padrão de defeitos totais e defeitos maiores, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	78
Tabela 7 – Valores de média e desvio padrão de defeitos totais e defeitos maiores, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	79
Tabela 8 – Notas de corte para classificação das amostras em grupos de diferentes porcentagens de espermatozóides morfolologicamente normais (experimento “morfologia normal”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	80
Tabela 9 – Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais (experimento “morfologia normal”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	81
Tabela 10 – Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais	

	(experimento “morfologia normal”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	82
Tabela 11 –	Notas de corte para classificação das amostras em grupos de diferentes porcentagens de defeitos maiores (experimento “defeitos maiores”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	83
Tabela 12 –	Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a porcentagem de defeitos maiores (experimento “defeitos maiores”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	84
Tabela 13 –	Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a porcentagem de defeitos maiores (experimento “defeitos maiores”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	85
Tabela 14 –	Classificação dos touros da raça Nelore segundo a BSE-STF – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	86
Tabela 15 –	Classificação dos touros da raça Simental segundo BSE-STF – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	87
Tabela 16 –	Classificação dos touros da raça Nelore segundo a BSE-2 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	88
Tabela 17 –	Classificação dos touros da raça Simental segundo BSE-3 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	89
Tabela 18 –	Valores de média e desvio padrão da quantidade de proteína total (mg/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	90
Tabela 19 –	Valores de média e desvio padrão da quantidade de proteína total (mg/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	90
Tabela 20 –	Notas de corte para classificação das amostras em grupos de acordo com a quantidade de proteína total presente no plasma seminal (experimento “proteína total”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002....	91
Tabela 21 –	Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a quantidade de proteína total no plasma seminal, expressa em mg/mL (experimento “proteína total”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002....	92
Tabela 22 –	Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a quantidade de proteína total no plasma seminal, expressa em mg/mL (experimento “proteína total”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002....	93
Tabela 23 –	Valores de média e desvio padrão da quantidade de TBARS (ng/mL),	

	e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	94
Tabela 24 –	Valores de média e desvio padrão da quantidade de TBARS (ng/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	94
Tabela 25 –	Notas de corte para classificação das amostras em grupos de acordo com a quantidade de TBARS presente no plasma seminal (experimento “lipoperoxidação”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	95
Tabela 26 –	Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a quantidade de TBARS no plasma seminal, expressa em ng/mL (experimento “lipoperoxidação”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	96
Tabela 27 –	Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a quantidade de TBARS no plasma seminal, expressa em ng/mL (experimento “lipoperoxidação”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	97
Tabela 28 –	Ponto isoeletrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , nos grupos de inverno e verão – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	100
Tabela 29 –	Ponto isoeletrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Simental , nos grupos de inverno e verão – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	101
Tabela 30 –	Ponto isoeletrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os diferentes grupos de porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	109
Tabela 31 –	Ponto isoeletrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Simental , entre os diferentes grupos de porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais – Dourados/MS – Jul	

	2001/Fev 2002.....	109
Tabela 32 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os diferentes grupos de porcentagem de defeitos espermáticos maiores – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	114
Tabela 33 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Simental , entre os diferentes grupos de porcentagem de defeitos espermáticos maiores – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	114
Tabela 34 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os diferentes grupos de quantidade de proteína total – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	119
Tabela 35 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Simental , entre os diferentes grupos de quantidade de proteína total – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	120
Tabela 36 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os diferentes grupos de quantidade de TBARS – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	124
Tabela 37 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Simental , entre os diferentes grupos de quantidade de TBARS.....	125
Tabela 38 –	Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-STF – Dourados/MS – Jul 2001/Fev	

2002.....	130
Tabela 39 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Simental , entre os animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-STF– Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	130
Tabela 40 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-2 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	135
Tabela 41 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros Nelore , entre os animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-3 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002.....	139

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
%F	Frequência de detecção
ABP	<i>Androgen Binding Protein</i>
aSFP	<i>Acid Seminal Plasma Fluid Protein</i>
BSE	<i>Breeding Soundness Evaluation</i>
BSP-A1	<i>Bovine Seminal Plasma Protein A1</i>
BSP-A2	<i>Bovine Seminal Plasma Protein A2</i>
BSP-A3	<i>Bovine Seminal Plasma Protein A3</i>
BSPs	<i>Bovine Seminal Plasma Proteins</i>
CPAO	Centro de Pesquisa Agropecuária Oeste
DP	Desvio padrão
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBP	<i>Heparin Binding Proteins</i>
IPG strip	Fita de focalização isoeletrica
kDa	Kilo Daltons
L-PGDS	Prostaglandina D sintetase tipo lipocalina
mL	mililitro
mm	milímetros
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
nm	nanômetros
NO ₂	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila

OONO ⁻	Peroxinitrito
OPN	Osteopontina
p	Nível de significância estatística
PDC-109	BSP A1/A2
PGDS	Prostaglandina D sintetase
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
PO	Puro de origem
PT	Proteína total
r	Coefficiente de correlação
RBP	<i>Retinoic Binding Protein</i>
RBS-1	Ribonuclease BS-1
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
STF	<i>Society for Theriogenology</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP	Universidade de São Paulo
VIO	Volume sob intensidade óptica
VION	Volume sob intensidade óptica normalizado
WHO	<i>World Health Organization</i>
μL	Microlitros
μM	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1	ADAPTAÇÃO DE ANIMAIS ZEBUÍDOS E TAURINOS AO CLIMA TROPICAL.....	33
2.2	ESTRESSE TÉRMICO E FERTILIDADE EM TOUROS.....	35
2.3	SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE TOUROS.....	37
2.4	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	41
2.5	RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E FERTILIDADE.....	47
3	MATERIAL E MÉTODO.....	57
3.1	LOCAL.....	57
3.2	ANIMAIS.....	59
3.3	EXAME ANDROLÓGICO, COLETA E PROCESSAMENTO INICIAL DO SÊMEN.....	59
3.4	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA SEMINAL.....	61
3.5	DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	61
3.6	QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO NO PLASMA SEMINAL.....	61
3.7	TÉCNICA DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA (2D-PAGE).....	63
3.8	ANÁLISE DOS GÉIS.....	63
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
3.10	EXPERIMENTOS.....	67
4	RESULTADOS.....	76
4.1	EXAME ANDROLÓGICO E ANÁLISE SEMINAL PADRÃO.....	76
4.2	“BREEDING SOUNDNESS EVALUATION”.....	86
4.3	DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL.....	90
4.4	DOSAGEM DE TBARS.....	94
4.5	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.....	98
5	DISCUSSÃO.....	143
5.1	EXAME ANDROLÓGICO E ANÁLISE SEMINAL PADRÃO.....	143
5.2	DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL NO PLASMA SEMINAL.....	147
5.3	QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO NO PLASMA SEMINAL.....	148
5.4	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL	150

6	CONCLUSÕES.....	161
	REFERÊNCIAS.....	164
	ANEXOS.....	180

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, e a maioria deste rebanho é representada por gado de corte, com grande predominância da raça Nelore, visto sua ótima adaptabilidade ao clima tropical encontrado nas regiões produtoras brasileiras.

A crescente profissionalização e atualização técnica dos pecuaristas faz com que os mesmos busquem realizar o melhoramento genético de seus rebanhos, cuja ferramenta mais ágil é a utilização de touros de alto valor genético. Além disso, já é realidade a introdução do cruzamento industrial nos sistemas de produção de carne. O cruzamento industrial visa incorporar no rebanho zebuíno características como maior precocidade sexual, maior potencial de crescimento e melhor acabamento de carcaça. Como a maioria dos cruzamentos industriais brasileiros ainda utiliza a monta natural, esse sistema encontra a limitação da pouca adaptação dos touros europeus ao ambiente tropical. Estes sofrem queda na sua fertilidade a campo devido a alterações como a degeneração testicular, quando mantidos em ambientes de temperatura e umidade elevadas, o que resulta em perdas econômicas consideráveis para a pecuária brasileira.

Tudo isso leva à necessidade de se desenvolver metodologias adequadas e confiáveis para a previsão do poder fertilizante do sêmen bovino, visto que a eficiência reprodutiva é a característica mais importante em qualquer sistema de produção de gado de corte, para que sejam obtidas produtividade e lucratividade satisfatórias neste tipo de atividade econômica.

A avaliação da capacidade reprodutiva dos touros é um dos critérios utilizados na seleção para eficiência reprodutiva. Esta avaliação é feita, geralmente, através do exame andrológico, que consiste em exame clínico geral, exame específico do sistema reprodutor e análise padrão do sêmen (volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática). Muitos dos critérios tradicionais para a avaliação de sêmen, porém, possuem limitações

devido à baixa correlação com fertilidade, e problemas de repetibilidade por um mesmo avaliador e entre avaliadores (JASKO, 1992). A seleção para fertilidade poderia ser beneficiada pelo desenvolvimento de novas tecnologias de avaliação da capacidade reprodutiva de touros (BARBOSA, 1997).

Existem muitas tentativas de relacionar características seminais, como motilidade e morfologia espermáticas (COULTER; KOZUB, 1989; HAMMERSTEDT, 1996), e uma série de proteínas de plasma seminal e outros fatores (BELLIN; HAWKINS; AX, 1994; KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993), com fertilidade de touros. Estes estudos geralmente têm sido realizados com animais *Bos taurus primigerus taurus*, especialmente com raças de leite, e a grande maioria utiliza dados de touros mantidos em centrais de inseminação artificial. Poucos trabalhos têm procurado testar a fertilidade de touros de corte utilizados em monta natural em rebanhos de manejo extensivo (FITZPATRICK et al., 2002).

Na busca de métodos mais fidedignos para a previsão da capacidade reprodutiva de touros, vários pesquisadores têm estudado o papel desempenhado pelas proteínas presentes no plasma seminal sobre a fertilidade, através da técnica de eletroforese bidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), com resultados bastante interessantes e promissores. A relação entre estas proteínas e outras características ligadas à eficiência reprodutiva, portanto, pode levar ao desenvolvimento de métodos que propiciem uma melhor predição da capacidade fertilizante de animais mantidos a campo, evitando a utilização de touros de baixa fertilidade e diminuindo, assim, os prejuízos decorrentes destes fatores para a atividade pecuária.

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos:

- obter um perfil das proteínas presentes no plasma seminal de touros Nelore e Simental, criados a campo, em regime de monta natural e manejo extensivo;
- comparar o perfil de proteínas de plasma seminal encontrado em diferentes épocas do ano (inverno e verão) para animais da raça Nelore e Simental;
- estudar a relação entre a ocorrência de peroxidação lipídica e o perfil de proteínas de plasma seminal para animais da raça Nelore e Simental;
- estudar possíveis relações entre o quadro espermático dos animais, caracterizado pela análise seminal padrão, e as proteínas encontradas no plasma seminal, a fim de encontrar proteínas que se comportem como marcadores moleculares de características de interesse na avaliação da capacidade reprodutiva de bovinos;
- estudar possíveis relações entre o potencial reprodutivo dos animais, obtido através de diferentes classificações de capacidade reprodutiva (“BSEs”), e as proteínas encontradas no plasma seminal, a fim de encontrar proteínas que se comportem como marcadores moleculares de características de interesse na avaliação da capacidade reprodutiva de bovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão abordados cinco assuntos relevantes para o tema do presente trabalho: a adaptação de animais taurinos e zebuínos ao clima tropical, a relação entre estresse térmico e fertilidade em touros, os sistemas de classificação do potencial reprodutivo de touros, a peroxidação lipídica e suas influências na fertilidade, e a relação entre proteínas do plasma seminal e fertilidade.

2.1 ADAPTAÇÃO DE ANIMAIS ZEBUÍNOS E TAURINOS AO CLIMA TROPICAL

Os animais de origem zebuína (*Bos taurus primigerus indicus*) se adaptam melhor às condições tropicais, sendo mais resistentes ao estresse térmico quando comparados aos de origem européia (*Bos taurus primigerus taurus*) nestas mesmas condições. Os zebuínos possuem menor conformação, maior relação superfície de pele/tamanho corporal, mais glândulas sudoríparas e menor termogênese, o que faz com que tenham maior facilidade em perder calor para o ambiente (BRITO et al., 2002; CHEMINEAU, 1994; TURNER, 1980).

Vários autores verificaram os efeitos do ambiente nas características produtivas e reprodutivas de animais de origem européia e zebuína, sendo estes últimos mais resistentes aos efeitos nocivos das altas temperaturas (CARTWRIGHT, 1955; FINCH, 1984; ROCHA et al., 1998).

Fields, Hentges e Cornelisse (1979) verificaram que touros das raças Hereford e Angus apresentaram um declínio mais acentuado na qualidade espermática (volume,

motilidade, concentração) nos meses mais quentes do ano, quando comparados a touros de origem indiana ou a touros de raças taurinas adaptadas ao calor (Brahman, Santa Gertrudis).

Kumi-Diaka, Nagaratnam e Rwuaan (1981) estudaram durante um ano touros zebuínos e taurinos mantidos em condições tropicais. Apenas nos taurinos foram encontradas variações sazonais significativas na concentração espermática, porcentagem de espermatozóides vivos e anormalidades espermáticas, sendo que os dois primeiros parâmetros tiveram valores mais baixos nos períodos quentes. Assim, estes autores sugeriram que o estresse térmico nos trópicos causou efeitos adversos significativos na espermatogênese somente em taurinos.

Parkinson (1987) verificou uma variação sazonal na qualidade espermática em touros da raça Holandesa (*Bos taurus primigerus taurus*), com queda de qualidade durante os meses mais quentes do ano. Em outro estudo, Ohashi et al. (1988) observaram que touros zebuínos (Nelore) e cruzados (Nelore x Chianina), criados na região amazônica (temperaturas em torno de $26 \pm 10^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de 85%), apresentaram menor índice de degeneração testicular quando comparados a touros europeus (Holandeses) criados nesta mesma região.

Chacón et al. (1999) classificaram 898 touros zebuínos, taurinos e cruzados zebuínos x taurinos, criados extensivamente na Costa Rica, como reprodutores satisfatórios ou insatisfatórios, baseando-se no perímetro escrotal, na motilidade e na morfologia espermática. A prevalência de touros classificados como insatisfatórios para a reprodução foi menor nos animais zebuínos do que nos dois outros grupos, concluindo-se que touros zebuínos são mais adaptados às condições tropicais.

Nichi (2003), estudando touros das raças Nelore e Simental criados extensivamente na região de Dourados/MS, encontrou alta porcentagem de defeitos espermáticos maiores na raça Simental. Além disso, observou que nos touros Nelore os valores de defeitos maiores encontrados durante o verão e o inverno não diferiram estatisticamente, enquanto que nos

touros da raça Simental houve aumento da porcentagem de defeitos maiores nos meses de verão. Estes resultados sugerem que há uma influência deletéria das altas temperaturas do verão apenas nos animais da raça Simental, podendo causar prejuízos na fertilidade destes touros quando comparados aos da raça Nelore.

2.2 ESTRESSE TÉRMICO E FERTILIDADE EM TOUROS

Embora a maioria dos rebanhos bovinos do mundo esteja localizada nos trópicos, a produção de leite e carne e o desempenho reprodutivo dos animais são geralmente menores em ambientes tropicais do que em ambientes temperados (BRITO et al., 2002).

É sabido que a temperatura testicular dos touros deve ser 2 a 6°C menor que a temperatura corpórea para a produção de espermatozóides férteis, e que aumentos na temperatura dos testículos diminuem a qualidade seminal, sendo a causa primária de infertilidade ou subfertilidade em muitos touros (KASTELIC; COOK; COULTER, 2000).

O efeito do aumento da temperatura ambiente na qualidade seminal tem sido exaustivamente estudado por diversos pesquisadores. Casady, Myers e Legates (1953) expuseram dois touros à temperatura de 37°C e 81% de umidade relativa, 12 horas por dia, durante 17 dias consecutivos. Após este período, encontraram 30 a 40% de espermatozóides morfolologicamente anormais (a maioria com caudas enroladas e decapitados), e grande diminuição do número total de espermatozóides, concentração e motilidade espermáticas. Em outro estudo, Skinner e Louw (1966) descreveram que temperaturas de 40°C com umidade relativa de 35 a 45%, durante apenas 12 horas, foram suficientes para reduzir a qualidade do sêmen de touros, sendo os animais taurinos mais susceptíveis que os zebuínos.

Wildeus e Entwistle (1983) avaliaram touros híbridos taurinos x zebuínos submetidos à insulação testicular durante 48 horas, demonstrando que pequenos aumentos de temperatura nos testículos, mesmo que em curtos períodos, são suficientes para causar degeneração dos espermatozóides, principalmente no que diz respeito a alterações na morfologia normal destas células.

Cook, Coulter e Kastelic (1994) demonstraram uma diminuição nos defeitos espermáticos associada à diminuição na temperatura superficial média dos testículos. Kastelic et al. (1996) submeteram touros à insulação na altura do cordão espermático, e obtiveram menores porcentagens de espermatozóides normais e maiores porcentagens de espermatozóides com defeitos de cabeça e gotas citoplasmáticas no grupo tratado, quando comparado com o grupo controle. Vogler et al. (1993) mostraram que a insulação dos testículos aumentou a temperatura dos mesmos em cerca de 3°C acima do normal, e resultou no aumento da proporção de espermatozóides anormais, sem afetar a produção espermática.

Soderquist et al. (1996) observaram que houve efeito sazonal na morfologia espermática, com a ocorrência de maior porcentagem de anormalidades de cabeça e defeitos totais nos meses de verão, em touros de leite (taurinos) mantidos em centrais de inseminação artificial da Suécia.

Outros estudos já demonstraram que alterações na termorregulação testicular, além de reduzir a fertilidade, resultam em um aumento na perda embrionária precoce (BELLVE, 1972; SETCHELL, 1988). Saacke et al. (1994) mostraram que a inseminação com sêmen obtido de touros submetidos à insulação escrotal resultou em uma maior proporção de embriões degenerados.

2.3 SISTEMAS DE CLASSIFICAÇÃO DO POTENCIAL REPRODUTIVO DE TOUROS

Os touros interferem significativamente na eficiência reprodutiva dos rebanhos, sejam eles usados para monta natural ou inseminação artificial. Assim, alterações na fertilidade dos touros resultam em grandes perdas econômicas, particularmente em sistemas extensivos de produção de gado de corte. Conseqüentemente, é essencial que os touros sejam examinados antes e durante sua utilização em programas de reprodução, para que se possa identificar e remover os indivíduos com fertilidade potencialmente baixa (BRUNER et al., 1995; CHACÓN et al., 1999; HOLROYD et al., 2002).

O sistema de produção extensiva utilizado no Brasil, com uso de monta natural e acasalamento múltiplo (formação de lotes de reprodução com vários touros cobrindo o mesmo grupo de vacas), dificulta a obtenção de dados reprodutivos do rebanho e impossibilita o estudo da fertilidade individual de cada touro através das taxas de concepção das fêmeas. Com isso, torna-se necessário buscar métodos alternativos de identificar reprodutores potencialmente satisfatórios e insatisfatórios, baseando-se em dados do exame andrológico e características seminais. Na literatura mundial existem poucas tentativas de testar a fertilidade de touros de corte utilizados em rebanhos com sistema de acasalamento múltiplo e manejo extensivo (COULTER; KOZUB, 1989; FITZPATRICK et al., 2002; HOLROYD et al., 1993; HOLROYD et al., 2002).

Embora alguns testes de qualidade do sêmen correlacionem-se com fertilidade (HAMMERSTEAD, 1996; SAACKKE et al., 1994), nenhum é satisfatório para a predição de touros com fertilidade superior (JOHNSON, 1997). Zhang et al. (1999) executaram uma bateria de testes, incluindo fertilização *in vitro*, para predizer a fertilidade de touros usados em programas de inseminação artificial. Os testes detectaram até 85% da variação na fertilidade

dos touros, porém eram demorados, dispendiosos, necessitavam de instalações laboratoriais sofisticadas e eram pouco práticos para utilização a campo.

Coulter e Kozub (1989) desenvolveram um modelo matemático para predizer a fertilidade de touros sob condições extensivas e acasalamento múltiplo. Este modelo levou em consideração, entre outras características, os valores de perímetro escrotal e morfologia espermática. Embora os autores não tenham conseguido predizer a fertilidade de touros com precisão, visto que o modelo desenvolvido respondeu por apenas 29% da variação total de fertilidade, o estudo demonstrou que a seleção de touros com maior circunferência escrotal, baixos níveis de defeitos espermáticos primários, e um baixo número de montas combinado com um número moderado de serviços durante testes de libido, deve aumentar a fertilidade dos touros de corte usados em condições extensivas.

Em um estudo no qual procuraram identificar características físicas e reprodutivas relacionadas com a produção de bezerros em rebanhos de corte com acasalamento múltiplo, Holroyd et al. (2002) concluíram que nenhuma característica pode ser utilizada isoladamente na predição de fertilidade, embora a morfologia espermática tenha sido importante em todos os modelos desenvolvidos. O resultado obtido por estes autores sugere que a análise seminal de reprodutores bovinos deve enfatizar a avaliação morfológica dos espermatozóides, em detrimento de outras características como a motilidade, por exemplo. Estes autores concluíram, ainda, que talvez não se possa identificar touros altamente férteis, mas um exame sistemático das características físicas e reprodutivas é capaz de detectar um grande número de touros que pouco contribuiriam para a produção de bezerros em sistemas de acasalamento múltiplo.

Fitzpatrick et al. (2002) realizaram avaliações detalhadas do sêmen de reprodutores Santa Gertrudis, Brahman e 5/8 Brahman. As características de motilidade dos espermatozóides não se correlacionaram com a fertilidade, enquanto a porcentagem de

espermatozóides morfológicamente normais foi consistentemente correlacionada com a produção de bezerros. Em geral, touros com menos de 50% de espermatozóides normais produziram menos bezerros, enquanto os touros de maior fertilidade possuíam mais de 70% de espermatozóides normais.

O desenvolvimento de um teste de fertilidade aplicável em condições de campo, que possa ser utilizado em touros de diferentes idades e raças para determinar a fertilidade em condições de monta natural, há muito tempo tem sido o objetivo de criadores e pesquisadores. Como ainda não existe tal teste, tem-se utilizado a avaliação da capacidade reprodutiva (*Breeding Soundness Evaluation – BSE*) para predizer a habilidade de um dado touro em fertilizar vacas, baseando-se em atributos físicos e na avaliação da integridade do espermatozóide (HIGDON et al., 2000).

Os primeiros critérios para a realização da BSE em touros foram publicados pela *Society for Theriogenology (STF)* em 1983 (BALL; OTT; MORTIMER, 1983). Em 1993, a STF publicou novas instruções para BSE, corrigindo algumas falhas do sistema anterior (CHENOWETH et al., 1993).

O sistema de avaliação proposto pela STF em 1993 (BSE-STF), e discutido posteriormente por Spitzer (2000), tem o objetivo de ser um método rápido, rígido e sistemático para identificar problemas que afetam a fertilidade do macho. Uma BSE consiste em três passos: inicialmente, exame físico generalizado e exame detalhado das porções internas e externas do sistema reprodutivo; depois, medida da circunferência escrotal; e finalmente, coleta e avaliação de uma amostra de sêmen. A BSE-STF estabelece limites mínimos aceitáveis para a circunferência escrotal, motilidade e morfologia espermáticas. Os touros que atingem ou ultrapassam os valores mínimos para estes parâmetros são considerados como reprodutores potencialmente satisfatórios, e os que não atingem, como

insatisfatórios. Existe ainda a possibilidade de classificar o touro em um grupo intermediário, nos casos em que se perceba a necessidade de uma reavaliação posterior para a classificação definitiva do animal.

Uma avaliação de BSE-STF feita por Higdon et al. (2000) em 2898 touros de corte jovens (10 a 20 meses de idade) indicou que 72% foram classificados como reprodutores potencialmente satisfatórios. Esta porcentagem variou de 65 a 79% de acordo com a propriedade onde os animais estavam alojados. Apesar desta variação, em média 28% dos touros jovens não atingiram o *status* de reprodutores satisfatórios, e provavelmente iriam causar prejuízos caso fossem utilizados para reprodução. Destes touros, 4% não passaram no exame físico, 9% estavam abaixo da circunferência escrotal mínima para a idade, 9% tiveram menos que 70% de espermatozóides morfolologicamente normais, 4% apresentaram motilidade progressiva menor que 30% e 4% tinham valores menores que os mínimos tanto para morfologia espermática quanto para motilidade.

Kennedy et al. (2002) avaliaram 3648 touros de 10 raças diferentes através da BSE-STF, obtendo 76% de touros classificados como reprodutores potencialmente satisfatórios. Raça e idade foram importantes fontes de variação nos resultados da classificação. Os touros classificados como insatisfatórios apresentaram mais freqüentemente problemas de morfologia espermática e/ou circunferência escrotal inadequadas.

Segundo Spitzer (2000), os trabalhos com o uso da BSE-STF para classificação de touros, mesmo com a enorme variação existente entre raças, idades e populações, mostram que é possível utilizar esta ferramenta para eliminar os touros de baixo desempenho reprodutivo, com aproximadamente 70 a 80% dos touros sendo classificados como reprodutores potencialmente satisfatórios.

Para tentar diminuir as variações nos resultados de BSE decorrentes de diferenças entre raças ou grupos genéticos, alguns autores propuseram classificações específicas para

animais distintos. Assim, Lobreiro e Maciel (1987) propuseram uma classificação específica para touros Nelore, através de um sistema de pontuação de três características: perímetro escrotal, motilidade e morfologia espermática. A pontuação final classifica os touros, de acordo com a aptidão fecundante, em superiores, satisfatórios ou insatisfatórios. Já Mies Filho et al. (1982) criaram um sistema, também baseado na pontuação das três características descritas acima, exclusivo para animais taurinos.

2.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Entre as hipóteses para explicar a diminuição da qualidade seminal em animais submetidos ao estresse térmico, encontra-se o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são conhecidas como radicais livres, e consistem em átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desapareados. Entre as EROs, as mais importantes são o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as EROs formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado através da dismutase enzimática ou não enzimática do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). A ERO mais reativa e prejudicial, porém, é o radical hidroxila, que pode ser formado através do H_2O_2 e do ânion superóxido, e também através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico produzindo o peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$), que então irá se decompor para NO_2 e $\text{OH}^\cdot$ (HALLIWELL, 1991).

As EROs podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais nas funções espermáticas, dependendo da natureza e concentração de EROs envolvidas, assim como do momento e local de exposição. Geração excessiva de EROs no sêmen, por neutrófilos ou por espermatozóides

anormais, pode causar infertilidade (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995). A célula espermática é altamente susceptível aos danos causados pelas EROs, devido à alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e às baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu já reduzido citoplasma (AITKEN; FISHEL, 1994; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995; SHARMA; AGARWAL, 1996). As EROs, devido à sua alta reatividade, produzem extensivos danos a proteínas, além de modificações do citoesqueleto e alterações de alguns mecanismos celulares (SHARMA; AGARWAL, 1996).

Em humanos, sabe-se que a produção de EROs por espermatozóides ocorre principalmente em células morfologicamente anormais e, dentre estas, especialmente as células que possuem resíduos de citoplasma, ou seja, gotas proximais e distais (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998). Acredita-se que a presença de citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas em gerar NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), que serve como fonte de elétrons para a produção de EROs (AITKEN; BARKER, 2002). Outros fatores ligados à produção de EROs por células espermáticas imaturas seriam um aumento na disponibilidade de enzimas ligadas à membrana, responsáveis pela produção de EROs, e possivelmente a falha na elaboração de inibidores intrínsecos da atividade redutora da membrana plasmática (VERNET et al., 2001).

Rhemrev et al. (2001) verificaram que a produção de EROs por espermatozóides imóveis, funcionalmente e/ou morfologicamente anormais ocorre provavelmente devido à inativação de seus sistemas antioxidantes. Sabe-se, ainda, que espermatozóides morfologicamente normais porém funcionalmente anormais também são fontes de EROs (ENGEL; SCHREINER; PETZOLDT, 1999).

A produção de EROs por espermatozóides é um processo fisiológico normal, importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica

e para a fusão espermatozóide / oócito (AITKEN; IRVINE; WU, 1991; DE LAMIRANDE; EILEY; GAGNON, 1993; DE LAMIRANDE et al., 1997; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU; RENARD; LE LANNOU, 1994; KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996; SENGOKU et al., 1998). Apesar destes efeitos fisiológicos, o desbalanço entre a produção e a eliminação de EROs nos espermatozoides causa danos a estas células. Define-se estresse oxidativo positivo como a situação em que há uma mudança no balanço de EROs levando a um efeito pró-oxidativo, que ocorre tanto pelo excesso de EROs como pela diminuição de antioxidantes (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995).

Resultados de vários estudos com humanos indicam que os níveis de EROs estão positivamente correlacionados com prejuízos para a concentração, motilidade e morfologia espermáticas, assim como com a diminuição na taxa de reação acrossômica, capacitação espermática e ligação com o oócito (AGARWAL; IKEMOTO; LOUGHLIN, 1994; AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; AITKEN et al., 1989; AITKEN; CLARKSON, 1988; IWASAKI; GAGNON, 1992; RAO et al., 1989). Os danos à membrana espermática e os conseqüentes prejuízos citados devem-se, provavelmente, à peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana espermática, ou seja, à peroxidação lipídica (ALVAREZ et al., 1987; AITKEN; CLARKSON, 1987a,b).

Estudos realizados por Ollero et al. (2001) e Gil-Guzman et al. (2001) demonstraram que os níveis de EROs no sêmen de humanos foram negativamente correlacionados ($r = -0,64$, $p = 0,01$; $r = -0,44$, $p < 0,0001$) com a porcentagem de morfologia espermática normal, segundo parâmetros da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999).

Iwasaki e Gagnon (1992) detectaram a formação de EROs em 40% dos pacientes tratados em uma clínica de infertilidade masculina. Mazzili et al. (1994) verificaram a presença do ânion superóxido em 87% de amostras seminais provenientes de homens normozoospermicos inférteis e em 55% das amostras de homens inférteis. Aitken, Irvine e

Wu (1991) observaram que a incidência de gestação espontânea mostrou-se negativamente correlacionada com a geração de EROs, em cerca de 50% dos pacientes oligozoospermicos que exibiram aumentos na produção de EROs. Pasqualotto et al. (2000) verificaram que pacientes inférteis possuíam níveis mais altos de EROs quando comparados a homens com fertilidade comprovada.

Muitos estudos têm sido realizados para desenvolver metodologias adequadas de mensuração do estresse oxidativo e seus efeitos na fertilidade masculina. A dosagem direta de EROs no sêmen exige técnicas muito sensíveis, visto que a concentração destes compostos no sêmen é relativamente baixa e sua meia-vida é muito curta (LUNEC, 1989). A dosagem de componentes oxidados, que se mantêm nos fluidos corporais, é uma técnica mais específica, sendo um destes componentes o malondialdeído, que pode ser usado como marcador do índice de peroxidação lipídica (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a,b; JANERO, 1990; SIDHU et al., 1998; SLATER, 1984). A ocorrência de peroxidação lipídica em espermatozoides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática que, posteriormente, se decompõem para formar o malondialdeído. A avaliação dos níveis de malondialdeído tem sido extensivamente utilizada, nas últimas quatro décadas, como marcador da peroxidação lipídica (JANERO, 1990; SLATER, 1984).

Entre os diferentes métodos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico é o mais utilizado. Nesta reação, o composto formado pela reação entre o malondialdeído e o ácido 2-tiobarbitúrico pode ser mensurado através de absorbância ou fluorescência. Estes produtos são então chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método possui algumas desvantagens, visto que a alta temperatura e o baixo pH durante a reação podem causar a formação de alguns produtos de peroxidação relacionados à técnica. Além disso, diferentes substâncias, outras que não o malondialdeído, podem reagir com o ácido tiobarbitúrico, resultando em produtos de similar absorbância (JANERO, 1990).

Contudo, a correlação entre valores esperados de peroxidação lipídica e a mensuração dos níveis de TBARS é alta.

Zabludovzky et al. (1999) verificaram que os níveis de TBARS em amostras de sêmen humano foram inversamente correlacionados ($r = -0,59$, $p < 0,01$) com as taxas de fertilização *in vitro*. Além disso, os níveis de TBARS foram significativamente maiores nas amostras que possuíam taxa de fertilização igual a zero, quando comparadas com as amostras com taxa de fertilização maior que zero. Neste mesmo experimento, foram verificadas correlações negativas entre os níveis de TBARS e volume espermático, número total de espermatozóides no ejaculado e morfologia espermática normal ($r = -0,48$, $p < 0,01$; $r = -0,42$, $p < 0,01$; $r = -0,35$, $p < 0,04$, respectivamente). Em outro estudo, Aitken, Harkiss e Buckingham (1993b) observaram correlação significativa ($r = -0,58$, $p < 0,0001$) entre os níveis de TBARS e a capacidade de fusão espermatozóide / oócito em humanos.

A ocorrência e os efeitos do estresse oxidativo em sêmen de touros ainda é uma área pouco estudada atualmente. Agarwal e Vanha-Perttula (1988) verificaram que quantidades substanciais da enzima antioxidante glutathione peroxidase foram encontradas nos testículos, fluidos do trato reprodutivo e espermatozóides epididimários, porém concentrações muito menores foram encontradas no ejaculado de touros. Beconi et al. (1991), trabalhando com touros da raça Holandesa, obtiveram menores níveis de TBARS e maiores taxas de espermatozóides com acrossomo íntegro em amostras incubadas com α -tocoferol, poderoso antioxidante não-enzimático, quando comparadas às amostras sem nenhuma proteção, indicando um maior índice de lipoperoxidação nestas últimas.

Beorlegui et al. (1977) verificaram que os níveis de superóxido dismutase, enzima metabolizante de EROs, foram maiores em touros holandeses com maior motilidade espermática. Também foram detectados, nestas amostras, níveis menores de TBARS através

da indução de peroxidação lipídica pela adição de sulfato de ferro e ácido ascórbico, potente sistema oxidante.

O'Flaherty, Beconi e Beorlegui (1997) verificaram o efeito das EROs na fisiologia espermática normal em bovinos, tratando amostras seminais bovinas com o sistema gerador xantina xantina-oxidase, para a produção de ânion superóxido, além de adicionar superóxido dismutase e várias concentrações de peróxido de hidrogênio. Verificou-se que a adição de xantina xantina-oxidase provocou uma indução significativa na capacitação espermática, sendo que a adição da superóxido dismutase inibiu este efeito. A adição de H_2O_2 em baixas concentrações ($<25\mu M$) provocou um maior índice de espermatozóides com acrossomos reagidos. Concentrações maiores que $25\mu M$ de H_2O_2 produziram efeitos deletérios na motilidade espermática. Os autores concluíram que o ânion superóxido seria importante no processo de capacitação e que o peróxido de hidrogênio participaria como indutor na reação acrossômica do espermatozóide bovino mas, quando em concentrações maiores, o H_2O_2 estaria envolvido no processo de lipoperoxidação, extremamente prejudicial ao espermatozóide bovino.

Nichi (2003) analisou amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental criados a campo, em região de clima tropical, nos períodos de verão e inverno. Observou que os touros da raça Simental (*Bos taurus primigerus taurus*) apresentaram maiores concentrações seminais de TBARS no verão, em relação aos valores apresentados pelos mesmos no inverno, e também em relação aos valores detectados na raça Nelore (*Bos taurus primigerus indicus*), tanto no verão como no inverno; indicando, assim, um maior índice de peroxidação lipídica nos animais taurinos quando comparados aos zebuínos.

2.5 RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E FERTILIDADE

Diversos autores procuraram marcadores para fertilidade ou infertilidade em machos de várias espécies, pelas técnicas de eletroforese uni ou bi-dimensional, tanto no plasma seminal, como fizeram Autiero, Sansone e Abrescia (1991), Ayyagari, Fazleabas e Dawood (1987), Brandon et al. (1999), Killian, Chapman e Rogowski (1993), Marchini et al. (1990), Morgentaler et al. (1990), Reddy, Stark e Zaneveld (1979) e Wolfe, Bradley e Riddell (1993), como na membrana dos espermatozóides, que foi estudada por Hall e Killian (1989), Noland, Olson e Barberg (1984), Ollero et al. (1998), Russel et al. (1983) e Xu, Rigney e Anderson (1994), entre outros. Frazer e Bucci (1996) comentam que, embora a aplicação da eletroforese de proteínas não deva se tornar um procedimento de rotina nos laboratórios de sêmen, as informações recentes em bovinos têm demonstrado os méritos desta linha de pesquisa (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993 e MANJUNATH et al., 1993b).

Roncoletta (1999) estudou o perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas de membrana de espermatozóides e plasma seminal de touros taurinos e zebuínos doadores de sêmen, comparando os resultados obtidos com o grau de congelabilidade destes touros. Observou uma quantidade de cerca de 20% a mais de proteínas totais no plasma seminal de zebuínos quando comparados aos taurinos, e encontrou diferenças na concentração, frequência e valores de densitometria de algumas bandas, entre os grupos de alta, média e baixa congelabilidade. Na continuação destes estudos, ao analisar o perfil eletroforético de membranas de espermatozóides em diferentes estágios de processamento (logo após a colheita, após a diluição e após a congelação), Roncoletta et al. (1999) encontraram valores significativamente diferentes na densitometria das amostras; demonstrando, assim, que há

uma alteração expressiva na composição proteica de membrana dos espermatozóides frente aos processos atualmente disponíveis de diluição e criopreservação.

A diferença entre a composição proteica da membrana de espermatozóides bovinos a fresco e criopreservados, encontrada por Ollero et al. (1998), constitui uma base molecular que juntamente com outros fatores, como oxidação, temperatura, capacitação e *status* acrossomal, resultam nas diferenças em fertilidade. Estes autores comentam que a identificação das proteínas de membrana espermática, envolvidas no processo de fertilização, pode ajudar no desenvolvimento de testes bioquímicos para acessar a fertilidade de touros doadores em operações comerciais de inseminação artificial, além de possibilitar a formulação de melhores protocolos para a criopreservação de sêmen.

Durante o trânsito epididimário, os espermatozóides adquirem proteínas selecionadas, secretadas por células epiteliais. Frenette, Lessard e Sullivan (2002) mostraram que existem algumas proteínas (entre elas a P25b, uma proteína com propriedades preditivas para fertilidade bovina) que são transferidas para a superfície espermática, através de partículas presentes no fluido da cauda do epidídimo. A análise por espectrometria de massa revelou que estas proteínas transferidas são intimamente relacionadas entre si. O padrão da distribuição das proteínas transferidas variou de uma célula espermática para outra, e a transferência parece ser variável de acordo com a temperatura, sendo mais eficiente a 32-37°C do que a 22°C. O pH ótimo para a transferência situa-se em torno de 6,0 a 6,5.

Hao et al. (2002), na tentativa de identificar novos antígenos de membrana espermática em humanos, analisaram géis bidimensionais de extratos de sêmen contendo proteínas hidrofóbicas. Quatro spots com pontos isoelétricos variando de 4,5 a 5,5 e pesos moleculares de 32 a 34 kDa foram seqüenciados por espectrometria de massa, mostrando conter seqüências peptídicas comuns. Além disso, estes spots são produtos de um mesmo gene (SAMP32), cuja expressão ocorre especificamente nos testículos. Anticorpos contra

SAMP32 recombinante inibiram tanto a ligação quanto a fusão de espermatozóides humanos a oócitos de hamster *zona-free*, o que reflete a participação destas proteínas nos processos de fertilização.

Marcadores bioquímicos de plasma seminal são também sugeridos por diversos autores para identificar animais superiores ou inferiores quanto ao seu potencial de fertilidade e diferenciar graus de congelabilidade do sêmen. Miller, Winer e Ax (1990) mencionaram que a presença do plasma seminal é indispensável para a capacitação espermática e posterior fecundação, devido à presença de algumas proteínas denominadas HBPs (“heparin binding proteins”), que são produzidas pelas glândulas acessórias masculinas, excretadas no líquido seminal e ligadas a proteínas de membrana dos espermatozóides.

Alguns autores já correlacionaram as proteínas presentes no plasma seminal com o grau de congelabilidade do sêmen de diversas espécies, como búfalos (DHAMI; KODAGALI, 1986), galos (BENTLEY; ANSAH; BUCKLAND, 1984) e bovinos (PANGAWKAR; SHARMA; SINGH, 1988). Moore e Hibbit (1976) e Moustafa e Meszauros (1981) postularam que as proteínas presentes no plasma seminal ligam-se às proteínas de membrana dos espermatozóides, provocando alterações bioquímicas; isso poderia aumentar a permeabilidade da membrana, promovendo injúria celular e choque térmico, durante a criopreservação. Garcia e Graham (1987) demonstraram que uma fração protéica de baixo peso molecular (< 12-14 kDa) não é benéfica para as células espermáticas durante a congelação, sugerindo a diálise para a retirada destas proteínas, para melhorar a congelabilidade do sêmen. Al-Somai et al. (1994a,b), por sua vez, comentaram que as proteínas em maior concentração no plasma seminal, com peso molecular entre 15 e 16 kDa, aniônicas, são maléficas à motilidade espermática, e que sua retirada por diálise pode melhorar este parâmetro; afirmaram, ainda, que o prejuízo à motilidade espermática depende da concentração destas proteínas no plasma seminal.

Henault e Killian (1996) verificaram que os espermatozóides, quando colocados em meio contendo plasma seminal proveniente de animais de alta fertilidade, têm maior habilidade para penetrar em oócitos em ensaios *in vitro*, quando comparados a meios contendo plasma seminal de animais de baixa fertilidade, sejam estes espermatozóides de animais de alta ou baixa fertilidade. Barrios et al. (2000) submeteram amostras de espermatozóides ovinos, separados do plasma seminal por *dextran/swim-up*, a choque térmico pelo frio. Posteriormente, incubaram estes espermatozóides com proteínas do plasma seminal, e demonstraram a reversão dos danos causados pelo choque térmico à membrana, indicando que as proteínas presentes no plasma seminal são adsorvidas à membrana espermática e modificam as características funcionais de espermatozóides danificados, reproduzindo as de uma célula intacta.

Killian, Chapman e Rogowski (1993) avaliaram a composição proteica do plasma seminal de 35 touros holandeses de fertilidade conhecida, através da eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida. Detectaram duas proteínas mais prevalentes em touros de alta fertilidade (55 kDa, pI 4,8 e 26 kDa, pI 6,4) e duas proteínas mais prevalentes em touros de baixa fertilidade (16 kDa, pI 4,1 e 6,7). Uma equação de regressão linear múltipla foi desenvolvida para a população de touros, baseada nas quantidades relativas das quatro proteínas do plasma seminal associadas à fertilidade. Os valores preditivos de fertilidade, calculados a partir desta equação, mostraram alta correlação (coeficiente de correlação de 0.89) com a fertilidade real dos touros. As duas proteínas relacionadas à alta fertilidade, presentes no plasma seminal, foram identificadas como osteopontina (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1997) e prostaglandina D sintetase tipo-lipocalina (GERENA et al., 1998).

A osteopontina (OPN) é proeminente na matriz óssea e está envolvida na mineralização e reabsorção da matriz. É também encontrada na superfície de células epiteliais

do trato gastrointestinal, bexiga, pâncreas, pulmão, glândulas mamária, salivar e sudorípara, além dos fluidos biológicos urina e leite (BROWN et al., 1992; CRAIG; DENHART, 1991; SENGGER et al., 1989). No trato reprodutivo masculino já foi isolada na vesícula seminal e ampola do ducto deferente, bem como no fluido destes tecidos (RODRIGUEZ; JONATHAN; KILLIAN, 2000).

O papel funcional da OPN no trato genital masculino ainda é obscuro. Existem algumas hipóteses, das quais podemos citar a proteção do epitélio das glândulas seminais e ampola contra o ataque bacteriano, por competição em sítios de ligação da OPN (que são os mesmos que as bactérias utilizariam), segundo relatos de Cavalieri e Van Champ (1997), e ainda, que a OPN contém domínio de ligação GRGDS presente em células de adesão, via integrinas, envolvendo-se em processos de adesão celular e reação em cadeia (HYNES, 1987). A família das integrinas engloba receptores de adesão celular, cuja função é mediar diversas funções, incluindo comunicação celular (HYNES, 1987). São glicoproteínas transmembrânicas com domínios intracitoplasmáticos pequenos, ou seja, atuam como ligações entre o meio externo e interno das células. Nos túbulos seminíferos participam da interação entre células de Sertoli – germinativas e germinativas – germinativas, necessárias para a espermatogênese (RODRIGUEZ; JONATHAN; KILLIAN, 2000).

Com relação à prostaglandina D sintetase (PGDS), outra proteína citada por Killian, Chapman e Rogowski (1993) como marcadora de alta fertilidade em touros, Urade e Hayashi (2000) sugeriram sua localização em diferentes órgãos como coração e fluido cérebro-espinhal. Mencionaram também a distinção de dois tipos de PGDS: uma PGDS tipo-lipocalina (L-PGDS), encontrada no plasma seminal, e outra PGDS-glutationa independente (GSH-independente), encontrada no fluido cérebro-espinhal. Sugerem ainda que a PGDS possui dupla função atuando como enzima, na produção de PGD_2 a partir de PGH_2 (GSH-independente) e como proteína de ligação e transporte (L-PGDS) de moléculas hidrofóbicas,

como hormônio T3 e retinóides (derivados da vitamina A), que são moléculas necessárias para o desenvolvimento e maturação normais de tecidos, inclusive tecidos epiteliais (GERENA et al., 2000a).

O papel fisiológico da PGDS no trato genital masculino também não é claro. Entretanto, os dados já descritos na literatura, de que a L-PGDS encontrada no plasma seminal está associada à alta fertilidade (GERENA et al., 1998; KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993), e que a baixa concentração da L-PGDS no plasma seminal humano é sinal característico de indivíduos com oligospermia, sugerem que a L-PGDS pode atuar, de maneira importante, no desenvolvimento e maturação do espermatozóide. Por outro lado, trabalhos recentes de Fouchécourt et al. (2002) mostraram, através da quantificação de PGDS em sêmen bovino, com uso de antisoro específico, que as maiores concentrações desta proteína eram encontradas em touros de fertilidade normal ou alta, porém baixas concentrações foram encontradas em machos com todos os graus de fertilidade; sugerindo, assim, que a função da PGDS não é importante para a fertilidade ou pode ser assumida por outras proteínas quando sua concentração é baixa.

Na tentativa de esclarecer tais dúvidas, Gerena et al. (2000b) detectaram a expressão gênica da L-PGDS em células de Sertoli e espermátides alongadas, células intersticiais de Leydig, fibroblastos, macrófagos, entre outras. Sugeriram a participação da mesma na barreira hemato-testicular, atuando como carreador protéico de membrana, assim como a ABP (“Androgen Binding Protein”), a RBP (“Retinoic Binding Protein”) e a lactoglobulina, sendo que estas duas últimas proteínas também fazem parte da superfamília das Lipocalinas. Fouchécourt et al. (2002) citam que é provável que a PGDS funcione como um carreador lipofílico, pois demonstraram que a PGDS epididimária se liga ao ácido retinóico e à testosterona *in vitro*. Gerena et al. (2000b) também detectaram a L-PGDS em células epiteliais de diferentes regiões do epidídimo (principalmente cabeça do epidídimo)

participando, portanto, da regulação e integridade funcional do epidídimo. Sorrentino et al. (1998) sugeriram que a quantificação de PGDS pode ser utilizada como marcador da função epididimária. Como a L-PGDS se associa à membrana do espermatozóide, corrobora-se com a sua participação na maturação e interação do espermatozóide-óvulo (GERENA et al., 2000b). A L-PGDS ainda induz a uma desordem na bicamada de fosfolípidios através do transporte de ácido retinóico, conferindo alteração de permeabilidade de membrana para íons K^+ e I^- e glicose (GERENA et al., 2000b).

Já a função da PGDS como enzima conversora de PGH_2 em PGD_2 foi sugerida por Tokugawa et al. (1998), na participação e interferência no peristaltismo uterino, assim como PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$. Fouchécourt et al. (2002) sugerem que, no trato genital masculino, a PGDS não estaria envolvida com a biossíntese de PGD_2 , ou seja, não teria uma função enzimática.

As proteínas presentes em maior quantidade no plasma seminal de bovinos são chamadas de BSPs (“Bovine seminal plasma proteins”), e são produzidas pelas vesículas seminais (ESCH et al., 1983; MANJUNATH; SAIRAM, 1987). Entre as BSPs tem-se a BSP-A1 (15-16 kDa e pI 4,7-5,0), a BSP-A2 (15-16 kDa e pI 4,9-5,2) e a BSP-A3 (15 kDa e pI 4,8-5,2), sendo que as proteínas BSP-A1 e BSP-A2 juntas podem ser chamadas de PDC-109, pois segundo Seidah et al. (1987), elas possuem idêntica composição de aminoácidos, diferindo apenas pelo grau de glicosilação das moléculas. Estas proteínas vêm sendo intensamente estudadas por diversos pesquisadores, que já sugeriram algumas funções no metabolismo espermático, entre as quais a reorganização de membrana, através da interação com moléculas de colesterol e fosfolípidios na bicamada lipídica, alterando a permeabilidade e desencadeando a reação acrossomal e, por outro lado, uma ação decapacitante, evitando uma reação acrossomal precoce (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; DESNOYERS; THÉRIEN; MANJUNATH, 1994; LANE, 1999; MANJUNATH et al., 1994; MANJUNATH et al., 1993a,b; MANJUNATH; SAIRAM, 1987; THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH,

1998; THÉRIEN; SOUBEYRAND; MANJUNATH, 1997). Assim, tais funções podem, além de influenciar durante os processos de capacitação espermática e reação acrossomal, também interferir nos processos de criopreservação (RONCOLETTA et al., 1999, 2000; RONCOLETTA; MORANI; FRANCESCHINI, 2002), modificando o padrão de desempenho reprodutivo de um indivíduo. Manjunath et al. (2002) explicaram que as BSPs sofrem ligação com as lipoproteínas da gema do ovo, utilizadas no preparo de diluentes de sêmen. O seqüestro de BSPs pelas lipoproteínas não permite a ligação das proteínas seminais na membrana do espermatozóide, minimizando as modificações desta e protegendo as células espermáticas contra o choque térmico dos processos de criopreservação. Assim, havendo grandes quantidades de BSPs no plasma seminal, há uma maior chance de ligação destas proteínas à membrana espermática, diminuindo o número de sítios de ligação disponíveis para a gema do ovo e, conseqüentemente, o desempenho do espermatozóide criopreservado fica prejudicado, conforme descrito por Roncoletta (2003).

Condizente com tal hipótese, Nauc e Manjunath (2000) revelaram que as BSPs, encontradas no plasma seminal, estão associadas à membrana dos espermatozoides ejaculados, reforçando a hipótese de influenciarem a fertilidade quanto aos aspectos de capacitação espermática e congelabilidade do sêmen, e que diferentes concentrações das mesmas, encontradas nos animais estudados, podem influenciar tais eventos fisiológicos de maneiras distintas. Roncoletta (2003) encontrou uma tendência de maior concentração da proteína BSP-A3 no plasma seminal de touros de baixa fertilidade, e observou diferença estatística significativa desta proteína no perfil de proteínas de membrana espermática, com maiores concentrações também no grupo de baixa fertilidade, confirmando assim a influência negativa da BSP-A3 no metabolismo espermático. Roncoletta (2003) observou ainda que a concentração de proteína total entre os grupos de fertilidade estudados foi estatisticamente diferente, com maiores concentrações de proteína total para o grupo de pior fertilidade. Ao se

considerar que as BSPs representam cerca de 70% do montante geral de proteínas no plasma seminal, o autor sugere haver uma relação interessante entre concentração de proteína total e concentração das BSPs no plasma seminal, para touros de baixo desempenho reprodutivo; confirmando, assim, a possibilidade de utilização das BSPs como ferramentas para a predição da fertilidade a campo de touros.

Outra proteína ácida encontrada em grande quantidade no plasma seminal é a aSFP (*Acid Seminal Plasma Fluid Protein*), com 12,9 kDa e pI 4,8, que é secretada pelas vesículas seminais (EINSPANIER et al., 1991; WEMPE; EINSPANIER; SCHEIT, 1992), ampolas e epidídimo, mas não pelos testículos (WEMPE; EINSPANIER; SCHEIT, 1992). A aSFP se liga à membrana do espermatozóide ejaculado, impedindo a ligação do mesmo à zona pelúcida, atuando como fator decapacitante. Por outro lado, Schöneck et al. (1996) sugeriram que a aSFP tem potencial preservativo à integridade de membrana, agindo como um redutor de peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide e regulando a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a motilidade espermática. A hipótese de que esta proteína é benéfica para o desempenho reprodutivo é confirmada pelos dados obtidos por Roncoletta (2003), que demonstrou o potencial da aSFP como marcador bioquímico para predição de alto desempenho em fertilidade de touros.

Uma outra proteína de peso molecular semelhante, porém de caráter básico, que vem sendo estudada é a Ribonuclease BS-1 (RBS-1), com 13,6 kDa e pI 10,6, que foi classificada por Scheit (1986). Shivagi et al. (1989) demonstraram que esta proteína cobre o espermatozóide ejaculado, sendo os bovinos a única espécie a produzi-la (CALVETE et al., 1996). Há muito tempo a RBS-1 foi descrita como proteína presente no plasma seminal de bovinos (D'ALESSIO et al., 1972), mas sua função biológica ainda está sendo estudada. Já foram descritos efeitos de imunossupressão (D'ALESSIO et al., 1991) e citotoxicidade (BRACALE et al., 2002). As atividades fisiológicas da ribonuclease incluem modificações na

membrana, principalmente na organização dos fosfolipídeos, como citam Vescia e Tramontano (1981) e Mancheño et al. (1994), o que pode explicar a interferência desta enzima na congelabilidade do sêmen bovino. Roncoletta (1999) e Roncoletta, Morani e Franceschini (2002), em estudos de eletroforese unidimensional, sugeriram que a proteína de 14,4 kDa identificada como ribonuclease também poderia influenciar no metabolismo espermático, especialmente no que diz respeito à criopreservação dos espermatozoides; porém, em estudo posterior com técnica bidimensional (RONCOLETTA, 2003), a ribonuclease não atuou como marcador para os diferentes graus de congelabilidade do sêmen.

Roncoletta (2003) estudou o perfil proteico de plasma seminal e membrana de espermatozoides de touros, buscando uma possível relação com índices de prenhez (fertilidade) e congelabilidade do sêmen. O perfil bidimensional de proteínas de plasma seminal apresentou 225 spots, garantindo a predição da fertilidade de touros a partir de seis spots e a predição da congelabilidade do sêmen a partir de dois spots. O perfil bidimensional de proteínas de membrana espermática, para a raça Nelore, apresentou 391 spots, dos quais oito apresentaram diferença significativa entre os diferentes grupos de fertilidade. Dos spots já identificados por outros autores no perfil de proteínas de plasma seminal, os referentes às proteínas BSP-A1/A2, OPN e PGDS não demonstraram potencial para predizer a fertilidade ou congelabilidade do sêmen de touros. Já os identificados como BSP-A3 e aSFP em perfil bidimensional de proteínas de membrana demonstraram potencial como marcadores bioquímicos para predição de baixo e alto desempenho em fertilidade, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODO

As metodologias utilizadas para o desenvolvimento do presente trabalho encontram-se descritas a seguir, por ordem de execução.

3.1 LOCAL

As coletas de sêmen foram realizadas na Fazenda Don Pierino, em Dourados/MS, localizada a 22° latitude sul e 54° longitude oeste, a uma altitude de 458 metros em relação ao nível do mar. Esta região apresenta clima tropical quente e úmido, com temperaturas mínimas em torno de 10°C, máximas de 35°C e médias de 20 a 24°C. A precipitação pluviométrica média anual é de 1500-1600 mm, com menor incidência de chuvas no inverno e predomínio de chuvas no verão. O gráfico 1 mostra os valores de temperaturas médias, máximas e mínimas, durante os meses de coleta de amostras e os dois meses antecedentes. O gráfico 2 mostra a umidade relativa do ar e a precipitação pluviométrica nos mesmos períodos.

Gráfico 1 – Dados meteorológicos (temperaturas médias, máximas e mínimas) da região de Dourados/MS durante o período experimental – maio-jul 2001/dez 2001-fev 2002

Fonte: Estação Agroclimatológica da EMBRAPA Agropecuária Oeste (EMBRAPA-CPAO).

Gráfico 2 – Umidade relativa do ar (%) e incidência pluviométrica (mm de chuva) da região de Dourados/MS durante o período experimental – maio-jul 2001/dez 2001-fev 2002

Fonte: Estação Agroclimatológica da EMBRAPA Agropecuária Oeste (EMBRAPA-CPAO).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados touros PO adultos, taurinos (Simental) e zebuínos (Nelore), com idades variando de 3 a 4 anos, submetidos a duas coletas no período de um ano. A primeira coleta foi realizada no inverno (Julho/2001), com 32 touros Simental e 24 touros Nelore, e a segunda no verão (Fevereiro/2002), com 13 touros Simental e 15 touros Nelore. Os animais estavam em serviço, cobrindo fêmeas a campo, em regime de monta natural e acasalamento múltiplo, na região de Dourados, Mato Grosso do Sul. A alimentação consistiu de pasto de *Brachiaria sp.*

De todos os animais coletados, utilizaram-se amostras de 13 touros Nelore e 12 touros Simental para as análises de eletroforese bidimensional de proteínas de plasma seminal, sendo o restante descartado por problemas na coleta ou na amostra.

3.3 EXAME ANDROLÓGICO, COLETA E PROCESSAMENTO INICIAL DO SÊMEN

Os animais foram contidos em tronco apropriado, e realizou-se inicialmente a avaliação do perímetro escrotal e da temperatura retal, seguidos da palpação retal para verificação das glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes. O sêmen foi, então, coletado pelo método da eletroejaculação, após a lavagem externa e interna do prepúcio, sendo esta última feita com solução salina. Os animais foram avaliados quanto ao escore corporal, recebendo uma nota de 1 a 5, e também foram pesados. A análise seminal padrão foi realizada através da mensuração das seguintes características:

- Volume: leitura direta no tubo de coleta, graduado em mililitros;
- Turbilhonamento ou motilidade em massa: determinado através da avaliação de uma gota de sêmen sobre lâmina, observada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes, atribuindo-se uma nota de 0 a 5;
- Movimento progressivo retilíneo: determinado através da colocação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, para observação em microscópio óptico com aumento de 400 vezes, e expresso em porcentagem de espermatozóides móveis. Caso o ejaculado estivesse muito concentrado, realizava-se a diluição em uma solução de citrato de sódio a 2,9%, para facilitar a avaliação;
- Concentração espermática: mensurada pela contagem em Câmara de Neubauer dos espermatozóides de uma amostra diluída em solução de formol salino, na proporção de 1:200, e expressa em milhões por mililitros. Convém lembrar que os valores de concentração espermática são alterados pela técnica de coleta de sêmen utilizada (eletroejaculação), não representando, portanto, a fisiologia dos animais estudados;
- Morfologia espermática: as porcentagens de espermatozóides com alterações morfológicas (defeitos maiores e menores) foram determinadas em preparações úmidas, entre lâmina e lamínula, feitas com amostras diluídas em formol salino. As leituras foram realizadas em microscópio de interferência diferencial de fase, sendo contadas 200 células de cada amostra.

3.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA SEMINAL

Logo após a coleta do sêmen, uma alíquota de 1mL foi submetida à centrifugação a 5.000g durante 15 minutos, a 4°C, para a separação do plasma seminal, e este foi congelado em criotubos, imersos em nitrogênio líquido.

No laboratório, após a descongelação, as amostras de plasma seminal foram novamente centrifugadas, a 10.000g durante 30 minutos a 4°C, para a retirada de *debris* celulares, antes de serem submetidas à dosagem de proteínas totais.

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

Foram realizadas dosagens de proteínas totais nas amostras de plasma seminal, a fim de padronizar a quantidade de proteínas totais aplicadas no gel de eletroforese. Para tanto, utilizou-se a técnica de LOWRY (1951), descrita no anexo A.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO NO PLASMA SEMINAL

A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP.

As determinações basearam-se na metodologia descrita por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea (TBARS) que é quantificado através de espectrofotometria, em comprimento de onda de 532 nanômetros (nm). Esta reação ocorre em temperaturas entre 90 e 100°C, em pH ácido.

Alíquotas de 500µl de plasma seminal e 1000µl de solução de ácido tricloroacético¹ a 10% foram centrifugadas por 15 minutos, à temperatura de 15°C e 18.000g, para que ocorresse a precipitação de proteínas.

Alíquotas de 500µl do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500µl de ácido tiobarbitúrico² a 1%, dissolvido em hidróxido de sódio³ 0,05N, preparado instantes antes de ser utilizado. Os tubos contendo essa mistura foram incubados em banho fervente (100°C) por 10 minutos e resfriados em banho de gelo (0°C).

As TBARS das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro a partir de uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído. A peroxidação lipídica foi expressa em nanogramas de TBARS/mL de plasma seminal.

¹ Sigma T 9159

² Sigma T5500

³ Sigma S 8045

3.7 TÉCNICA DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA (2D-PAGE)

A técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida foi desenvolvida no Laboratório de Eletroforese do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal.

Para a determinação dos padrões eletroforéticos bidimensionais das proteínas do plasma seminal, foi empregada a técnica descrita por O'Farrell (1975), porém com algumas alterações (anexos B, C e D). Primeiramente foi realizada uma focalização isoeletrica das proteínas, para posterior separação por peso molecular em SDS-PAGE. Foram utilizados 50µg de proteína total das amostras de plasma seminal em cada gel. Para a focalização isoeletrica utilizou-se *IPG strip pH 4-7*⁴. A separação em SDS PAGE foi realizada em géis a 17% de concentração de acrilamida.

A coloração dos géis foi realizada com nitrato de prata, segundo Blum, Beier e Gross (1987), com devidas adequações proporcionais ao tamanho dos géis.

3.8 ANÁLISE DOS GÉIS

Após a coloração, os géis foram digitalizados em *scanner* de alta definição (ImageScanner⁴), calibrado previamente de acordo com as instruções do fabricante.

⁴ Amersham Biosciences

As imagens obtidas foram inicialmente processadas pelo software ImageMaster ELITE 2D⁵. Foram identificados todos os spots em cada um dos géis, delimitando-se a área ocupada por cada spot (mm²). A área é definida como uma medida do tamanho bidimensional do spot, em decorrência do formato geométrico do mesmo. Pela comparação da intensidade de coloração de cada spot com a calibração do *scanner*, e utilizando os dados de área previamente obtidos, procedeu-se à mensuração do volume dos spots (volume sob intensidade óptica – VIO). O VIO de um spot é, portanto, uma medida tridimensional, resultante da somatória das intensidades de todos os pixels presentes na área do spot, gerada pela leitura do *scanner* calibrado por intensidade de cor.

Os spots foram padronizados para peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) e, então, ajustados quanto ao volume normalizado (volume sob intensidade óptica normalizado – VION). O processo de normalização do VIO é realizado pelo programa para aumentar a acurácia de comparação entre os spots dos diferentes géis dentro do experimento.

Após a detecção e mensuração dos spots dos géis a serem utilizados, realizou-se uma análise inicial dos mesmos, avaliando-se separadamente os perfis proteicos da raça Nelore e da raça Simental, no software ImageMaster ELITE 2D⁵. Para cada raça escolheu-se um gel referência, que atua como um índice ou padrão do experimento, com o qual todos os outros géis serão comparados. Realizou-se, então, o pareamento dos spots entre o gel referência e todos os outros géis do experimento.

Os dados de VION foram então comparados e processados pelo software ImageMaster 2D DATABASE⁵. Foram criados diversos experimentos dentro deste programa, para cada uma das variáveis de interesse. A análise de cada experimento iniciou-se com a criação de um gel médio para cada grupo, que consiste em uma composição estatística a partir dos valores médios de VION de cada um dos spots dos diferentes géis daquele grupo. Como parâmetros

⁵ Amersham Biosciences

para a criação dos géis médios, foi estabelecido que cada spot poderia estar ausente em somente um gel dentre os vários do mesmo grupo, e não foram fixados valores máximos de desvio padrão dos dados de VION, para que todas as diferenças existentes entre os grupos pudessem ser evidenciadas.

Os diferentes géis médios, representando os diferentes grupos dentro do experimento, foram então comparados estatisticamente pelo programa, evidenciando os spots que apresentavam diferença estatística nos valores de VION entre os grupos.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

- Exame andrológico, análise seminal padrão, proteína total e lipoperoxidação

Os dados foram analisados pelo programa SAS System for Windows⁵.

Através do aplicativo *Guided Data Analysis*, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logaritmo na base 10 - Log10X; raiz quadrada - RQ X; quadrado - X²) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados os desvios padrões e as médias (média $\pm$ desvio padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis.

⁵ SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram raça (Nelore e Simental) e estação do ano (Inverno e Verão). As variáveis resposta avaliadas foram motilidade retilínea progressiva, perímetro escrotal, porcentagem de defeitos totais, porcentagem de defeitos maiores, concentração de proteína total e concentração de TBARS no plasma seminal.

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias estações do ano (Verão e Inverno), raças (Nelore e Simental) e a interação estações do ano X raças (Nelore/Inverno, Nelore/Verão, Simental/Inverno e Simental/Verão).

A variável concentração de proteína total obedeceu às premissas não sendo necessária qualquer transformação.

As variáveis resposta porcentagem de defeitos maiores, porcentagem de defeitos totais e concentração de TBARS não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10. Para as variáveis porcentagem de defeitos maiores e porcentagem de defeitos totais foi necessária a retirada de um animal (DP-03), que se comportou como outlier.

A variável resposta perímetro testicular (PT) também não obedeceu à normalidade dos resíduos sendo que a mesma foi obtida após a transformação $1/PT$.

A variável resposta motilidade retilínea progressiva não obedeceu às premissas, não sendo possível transformá-la. Esta variável foi então analisada através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Neste caso utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos, sendo os efeitos de raças, estações do ano e a interação raças X estações do ano, verificadas separadamente.

➤ Géis de eletroforese

A partir dos géis médios construídos pelo programa de análise de géis dentro de cada experimento, os valores de VION de cada spot foram comparados entre os grupos utilizando-se o teste T-Student (SWINSCOW; CAMPBELL, 1997). Esta análise foi utilizada para comparar diferenças entre as médias (VION de cada spot) para as duas populações (grupos), com significância de 95%. Nos experimentos com mais de dois grupos distintos, a análise foi feita utilizando-se dois grupos de cada vez, até analisar todas as combinações possíveis.

3.10 EXPERIMENTOS

Foram criados diversos experimentos no programa de análise de géis de eletroforese, para o estudo comparativo entre o perfil de proteínas de plasma seminal dos touros analisados, dentre os diferentes parâmetros de agrupamento utilizados nos experimentos descritos a seguir.

Inicialmente, comparou-se as diferenças entre os perfis proteicos encontrados nas duas estações do ano estudadas (inverno e verão), conforme descrito adiante, a fim de verificar se os diferentes graus de adaptação das raças Nelore e Simental refletem variações nas proteínas do plasma seminal destes animais.

Devido às condições de criação dos animais experimentais (sistema de acasalamento múltiplo em condições de manejo extensivo), assim escolhidas para retratar a realidade da grande maioria do rebanho brasileiro de gado de corte, foi impossível obter os dados de fertilidade real a campo dos touros. Assim, a fim de se comparar o perfil de proteínas de

plasma seminal de touros com variados graus de desempenho reprodutivo, buscando marcadores para diferenciar os melhores e/ou os piores reprodutores, optou-se por classificar os touros a partir da mensuração de características correlacionadas com fertilidade.

É sabido que nenhuma característica constante no exame andrológico ou na análise seminal padrão, e nem mesmo qualquer teste laboratorial disponível atualmente, pode ser tomado isoladamente como ferramenta para classificar touros de acordo com sua capacidade reprodutiva. Deste modo, considerou-se mais adequado trabalhar com vários parâmetros, buscando-se assim estimar a fertilidade dos animais. Os parâmetros escolhidos no presente trabalho foram: morfologia espermática (porcentagem de espermatozóides com morfologia normal e porcentagem de defeitos espermáticos maiores), dosagem de proteína total e quantificação da lipoperoxidação.

Além disso, utilizou-se também algumas classificações para avaliação reprodutiva, disponíveis na literatura, como metodologia para dividir os touros em grupos distintos, de acordo com a predição de seu desempenho reprodutivo, e verificar as diferenças no perfil proteico de plasma seminal entre estes grupos.

➤ “Inverno x verão”

Analisou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore e Simental, em amostras coletadas no período de verão e de inverno. Foram criados, portanto, dois géis médios (inverno e verão) para cada raça, para que os valores de VION médio, desvio padrão e frequência de cada spot fossem comparados, conforme descrito no item 5.9.2.

➤ “Morfologia espermática”

Analizou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore e Simental em amostras de sêmen com diferentes valores de morfologia espermática normal. Um dos touros da raça Nelore não foi utilizado neste experimento por ser enquadrado como *outlyer* (valores muito distantes da média) para morfologia normal. Foram criados quatro grupos de amostras para cada raça, de acordo com a porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais encontrada. O critério para a divisão dos grupos foi o seguinte:

- Grupo 1: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de morfologia espermática normal ficaram acima da média da raça mais um desvio padrão;
- Grupo 2: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de morfologia espermática normal ficaram entre a média da raça e a média mais um desvio padrão;
- Grupo 3: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de morfologia espermática normal ficaram entre a média da raça e a média menos um desvio padrão;
- Grupo 4: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de morfologia espermática normal ficaram abaixo da média da raça menos um desvio padrão.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os quatro grupos.

➤ “Defeitos maiores”

Analizou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore e Simental em amostras de sêmen com diferentes valores de defeitos espermáticos maiores. Um dos touros da raça Nelore não foi utilizado neste experimento por ser enquadrado como *outlyer* para

defeitos maiores. Foram criados quatro grupos de amostras para cada raça, de acordo com a porcentagem de defeitos espermáticos maiores encontrada. O critério para a divisão dos grupos foi o seguinte:

- Grupo 1: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de defeitos maiores ficaram acima da média da raça mais um desvio padrão;
- Grupo 2: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de defeitos maiores ficaram entre a média da raça e a média mais um desvio padrão;
- Grupo 3: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de defeitos maiores ficaram entre a média da raça e a média menos um desvio padrão;
- Grupo 4: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de defeitos maiores ficaram abaixo da média da raça menos um desvio padrão.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os quatro grupos.

➤ “Proteína total”

Analisou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore e Simental em amostras com diferentes valores de proteína total. Foram criados quatro grupos de amostras para cada raça, de acordo com a quantidade de proteína total encontrada no plasma seminal. O critério para a divisão dos grupos foi o seguinte:

- Grupo 1: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de proteína total ficaram acima da média da raça mais um desvio padrão;
- Grupo 2: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de proteína total ficaram entre a média da raça e a média mais um desvio padrão;

- Grupo 3: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de proteína total ficaram entre a média da raça e a média menos um desvio padrão;
- Grupo 4: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de proteína total ficaram abaixo da média da raça menos um desvio padrão.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os quatro grupos.

➤ “Lipoperoxidação”

Analisou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore e Simental em amostras de sêmen com diferentes graus de lipoperoxidação. Foram criados quatro grupos de amostras para cada raça, de acordo com a quantidade de TBARS encontrada no plasma seminal. O critério para a divisão dos grupos foi o seguinte:

- Grupo 1: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de TBARS ficaram acima da média da raça mais um desvio padrão;
- Grupo 2: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de TBARS ficaram entre a média da raça e a média mais um desvio padrão;
- Grupo 3: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de TBARS ficaram entre a média da raça e a média menos um desvio padrão;
- Grupo 4: géis de proteína de plasma seminal das amostras cujos valores de TBARS ficaram abaixo da média da raça menos um desvio padrão.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os quatro grupos.

➤ Classificação dos reprodutores segundo a “BSE-STF”

Analisou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore e Simental, em amostras de sêmen classificadas de acordo com as diretrizes da BSE proposta pela *Society for Theriogenology* (STF) (CHENOWETH et al., 1993) para avaliação do potencial reprodutivo. As amostras foram divididas em dois grupos – reprodutores potencialmente satisfatórios e reprodutores potencialmente insatisfatórios. Convém lembrar que esta classificação inclui originalmente um grupo de classificação intermediária, no qual deve-se classificar touros imaturos ou que devam ser reavaliados em outra ocasião; nenhum dos animais deste experimento, porém, foi classificado neste grupo. Um dos touros da raça Nelore não foi utilizado neste experimento por ser enquadrado como *outlyer* para morfologia normal.

Assim, para serem classificados como reprodutores potencialmente satisfatórios, os touros deveriam apresentar perímetro escrotal mínimo de 34cm, motilidade progressiva retilínea maior ou igual a 30% e pelo menos 70% de espermatozóides morfolologicamente normais. Aqueles que não se encaixaram em alguma destas exigências foram classificados como reprodutores potencialmente insatisfatórios.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios.

➤ Classificação dos reprodutores da raça Nelore (“BSE-2”)

Analisou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Nelore, em amostras de sêmen classificadas de acordo com as diretrizes propostas por Lobreiro e Maciel (1987) para a raça Nelore, que no presente trabalho serão denominadas “BSE-2”. Para este experimento

foram utilizados 12 touros, sendo um dos animais iniciais retirado por ser *outlyer* para morfologia normal. As amostras foram divididas em três grupos, segundo a aptidão fecundante dos animais – reprodutores superiores, satisfatórios e insatisfatórios. Esta classificação baseia-se no perímetro escrotal, motilidade e morfologia espermáticas (defeitos totais e defeitos maiores), e é realizada através da pontuação dos reprodutores em cada uma destas características, cuja soma representa a nota final que classifica o animal. O critério para a divisão dos grupos está descrito na tabela 1:

Tabela 1 – Critérios para divisão de touros Nelore em reprodutores superiores, satisfatórios e insatisfatórios, de acordo com a BSE-2

Perímetro Escrotal (cm)	Pontuação	Motilidade Espermática (%)	Pontuação	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Pontuação
> 34	40	80 – 100	20	< 10	< 25	40
30 – 34	24	60 – 79	12	11 – 19	26 – 39	24
< 30	10	40 – 59	10	20 – 29	40 – 59	10
		10 – 39	5	> 29	> 59	3
		1 – 9	0			

Fonte: Lobreiro e Maciel (1987).

Somando-se a pontuação nestes três parâmetros, os animais que atingiram 90 a 100 pontos foram classificados como superiores; os que obtiveram 60 a 89 pontos, como satisfatórios; e aqueles com pontuação abaixo de 60 entraram para o grupo de insatisfatórios.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios.

➤ Classificação dos reprodutores da raça Simental (“BSE-3”)

Analizou-se o perfil de proteínas de plasma seminal de touros Simental, em amostras de sêmen classificadas de acordo com as diretrizes propostas por Mies Filho et al. (1982) para animais taurinos, que no presente trabalho serão denominadas “BSE-3”. As amostras foram divididas em três grupos, de acordo com o potencial reprodutivo dos touros – reprodutores ótimos, satisfatórios e insatisfatórios. Este sistema de classificação utiliza os mesmos parâmetros do anterior, e também baseia-se na pontuação de cada parâmetro e posterior soma destas pontuações, para obter uma nota final que classifica o reprodutor.

Para o perímetro escrotal, os animais que apresentaram medidas acima da média geral mais um desvio padrão receberam 40 pontos; os que ficaram entre a média menos dois desvios padrões e a média menos um desvio padrão receberam 20 pontos; e os que apresentaram perímetro inferior à média menos dois desvios padrões não receberam nenhum ponto.

Com relação à morfologia espermática, os critérios foram os seguintes:

- defeitos maiores até 15% e defeitos totais até 30% = 40 pontos;
- defeitos maiores até 20% e defeitos totais até 40% = 20 pontos;
- defeitos maiores > 20% e defeitos totais > 40% = 0 ponto.

Já para a motilidade progressiva retilínea, amostras com 80 a 100% receberam 40 pontos; com 60 a 79%, 20 pontos; com 40 a 59%, 5 pontos; com e abaixo de 40%, nenhum ponto.

Somando-se as três pontuações anteriores, os animais com nota final de 90 a 100 pontos foram classificados como ótimos; de 45 a 89 pontos, como satisfatórios; e abaixo de 45 pontos, como insatisfatórios.

Para cada grupo foi criado um gel médio, analisando-se então o perfil de proteínas de plasma seminal através da comparação dos valores de VION médio, desvio padrão e frequência dos spots entre os animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios.

4 RESULTADOS

Encontra-se neste capítulo a descrição dos resultados obtidos pelo exame andrológico e análise seminal padrão, pelas BSEs, pelas quantificações de proteína total e lipoperoxidação, e finalmente pela eletroforese bidimensional de proteínas.

4.1 EXAME ANDROLÓGICO E ANÁLISE SEMINAL PADRÃO

➤ Motilidade retilínea progressiva

Os resultados referentes à motilidade retilínea progressiva estão descritos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Valores de média e desvio padrão de motilidade progressiva retilínea, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p	Inverno	Verão	p
Motilidade retilínea progressiva (%)	53,8 ± 19,8	53,5 ± 31,6	0,35	56,2 ± 17,7	62,1 ± 28,9	0,15

Tabela 3 – Valores de média e desvio padrão de motilidade progressiva retilínea, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p	Nelore	Simental	p
Motilidade retilínea progressiva (%)	53,8 ± 19,8	56,2 ± 17,7	0,62	53,5 ± 31,6	62,1 ± 28,9	0,31

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de motilidade encontrados nas amostras coletadas no inverno e no verão, tanto para a raça Nelore (p=0,35) quanto para a raça Simental (p=0,15). Comparando-se separadamente as raças dentro de cada estação, também não foi observada diferença estatística entre os valores encontrados para animais Nelore e Simental, tanto no inverno (p=0,62) quanto no verão (p=0,31).

➤ Perímetro escrotal

Os resultados referentes à mensuração do perímetro escrotal estão descritos nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Valores de média e desvio padrão de perímetro escrotal, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p	Inverno	Verão	p
Perímetro escrotal (cm)	36,7 ± 1,4	35,0 ± 1,4	0,005	39,7 ± 3,7	41,2 ± 4,0	0,38

Tabela 5 – Valores de média e desvio padrão de perímetro escrotal, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p	Nelore	Simental	p
Perímetro scrotal (cm)	36,7 ± 1,4	39,7 ± 3,7	0,01	35,0 ± 1,4	41,2 ± 4,0	< 0,0001

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os valores de perímetro escrotal no inverno e no verão para os animais da raça Nelore ($p=0,005$), enquanto que para a raça Simental essa diferença não foi observada ($p=0,38$). Comparando-se separadamente as raças dentro de cada estação, observou-se diferença estatística significativa entre os valores encontrados para animais Nelore e Simental, tanto no inverno ($p=0,01$) quanto no verão ($p<0,0001$).

➤ Morfologia espermática

Os resultados referentes à morfologia espermática (defeitos totais e defeitos maiores) estão descritos nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Valores de média e desvio padrão de defeitos totais e defeitos maiores, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p	Inverno	Verão	p
Def. totais (%)	19,8 ± 5,6	29,9 ± 12,9	0,04	31,4 ± 17,0	29,5 ± 17,6	0,81
Def. maiores (%)	5,1 ± 1,6	7,9 ± 3,7	0,12	9,2 ± 6,0	18,8 ± 15,2	0,10

Tabela 7 – Valores de média e desvio padrão de defeitos totais e defeitos maiores, e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em amostras de sêmen de touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p	Nelore	Simental	p
Def. totais (%)	19,8 ± 5,6	31,4 ± 17,0	0,07	29,9 ± 12,9	29,5 ± 17,6	0,95
Def. maiores (%)	5,1 ± 1,6	9,2 ± 6,0	0,09	7,9 ± 3,7	18,8 ± 15,2	0,04

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os valores de defeitos totais ($p=0,04$), mas não entre os de defeitos maiores ($p=0,12$), encontrados nas amostras coletadas no inverno e no verão, para a raça Nelore. Para a raça Simental não houve diferença entre as estações do ano, tanto para defeitos totais quanto para defeitos maiores. Comparando-se separadamente as raças dentro de cada estação, observou-se que no inverno não houve diferença estatística entre Nelore e Simental para nenhuma das duas características estudadas (defeitos totais: $p=0,07$ e defeitos maiores: $p=0,09$), apesar dos touros Simental apresentarem sempre quantidades mais altas de defeitos totais e maiores que os touros Nelore. Já no período de verão observou-se significância estatística ($p=0,04$) entre os resultados de defeitos maiores de animais Nelore e Simental. Os defeitos totais não apresentaram diferença entre as raças no verão ($p=0,95$).

- Classificação para morfologia normal

Para a análise de proteínas de plasma seminal, dentro do experimento “morfologia normal”, as amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com os valores de

porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais, segundo metodologia descrita anteriormente.

As notas de corte para os grupos de morfologia normal estão descritas na tabela 8:

Tabela 8 – Notas de corte para classificação das amostras em grupos de diferentes porcentagens de espermatozóides morfologicamente normais (experimento “morfologia normal”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Nelore	> 85,9	85,9 – 74,6	74,5 – 63,2	< 63,2
Simental	> 88,5	88,5 – 66,0	65,9 – 43,4	< 43,4

De acordo com os parâmetros descritos acima, a classificação dos touros Nelore e Simental foi realizada conforme demonstrado nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 – Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais (experimento “morfologia normal”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	MORFOLOGIA NORMAL (%)	CLASSIFICAÇÃO
Nel 06	Inverno	90,0	Grupo 1
Nel 10	Verão	87,0	
Nel12	Inverno	84,0	Grupo 2
Nel 04	Inverno	83,5	
Nel 11	Verão	82,0	
Nel 09	Inverno	81,5	
Nel 10	Inverno	80,0	
Nel 02	Verão	80,0	
Nel 02	Inverno	79,5	
Nel 03	Verão	79,0	
Nel 13	Inverno	78,4	
Nel 08	Verão	78,0	
Nel 05	Inverno	73,0	Grupo 3
Nel 07	Inverno	71,2	
Nel 13	Verão	71,0	
Nel 12	Verão	69,0	
Nel 06	Verão	67,0	
Nel 04	Verão	57,0	Grupo 4
Nel 05	Verão	54,5	
Nel 07	Verão	46,0	

Tabela 10 – Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais (experimento “morfologia normal”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	MORFOLOGIA NORMAL (%)	CLASSIFICAÇÃO
Sim 02	Verão	92,0	Grupo 1
Sim 10	Inverno	91,0	
Sim 03	Inverno	86,5	Grupo 2
Sim 10	Verão	85,0	
Sim 09	Verão	83,0	
Sim 09	Inverno	81,0	
Sim 12	Verão	80,0	
Sim 11	Inverno	75,5	
Sim 08	Verão	74,0	
Sim 04	Inverno	73,0	
Sim 04	Verão	73,0	
Sim 08	Inverno	70,5	
Sim 12	Inverno	64,5	Grupo 3
Sim 01	Inverno	58,5	
Sim 03	Verão	57,0	
Sim 11	Verão	51,0	
Sim 05	Inverno	50,0	
Sim 06	Verão	39,0	Grupo 4
Sim 07	Inverno	35,5	
Sim 02	Inverno	0,0	

- Classificação para defeitos maiores

Para a análise de proteínas de plasma seminal, dentro do experimento “defeitos maiores”, as amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com os valores de porcentagem de defeitos espermáticos maiores, segundo metodologia descrita anteriormente.

As notas de corte para os grupos de defeitos maiores estão descritas na tabela 11:

Tabela 11 – Notas de corte para classificação das amostras em grupos de diferentes porcentagens de defeitos maiores (experimento “defeitos maiores”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Nelore	< 3,4	3,4 – 6,7	6,8 – 9,9	> 9,9
Simental	< 2,1	2,1 – 14,0	14,1 – 25,8	> 25,8

De acordo com os parâmetros descritos acima, a classificação dos touros Nelore e Simental foi realizada conforme demonstrado nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12 – Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a porcentagem de defeitos maiores (experimento “defeitos maiores”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	DEFEITOS MAIORES (%)	CLASSIFICAÇÃO
Nel 11	Verão	2,0	Grupo 1
Nel 06	Inverno	3,0	
Nel 07	Inverno	3,1	
Nel 05	Verão	3,5	Grupo 2
Nel 04	Inverno	4,0	
Nel 13	Inverno	4,6	
Nel 05	Inverno	5,0	
Nel 04	Verão	5,0	
Nel 02	Inverno	5,5	
Nel 09	Inverno	6,0	
Nel 13	Verão	6,0	
Nel 07	Verão	6,0	
Nel 12	Inverno	7,0	Grupo 3
Nel 10	Inverno	8,0	
Nel 10	Verão	8,0	
Nel 12	Verão	10,0	Grupo 4
Nel 08	Verão	10,0	
Nel 02	Verão	11,0	
Nel 03	Verão	12,0	
Nel 06	Verão	14,0	

Tabela 13 – Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a porcentagem de defeitos maiores (experimento “defeitos maiores”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	DEFEITOS MAIORES (%)	CLASSIFICAÇÃO
Sim 10	Inverno	3,0	Grupo 2
Sim 07	Inverno	4,0	
Sim 12	Inverno	4,0	
Sim 12	Verão	4,0	
Sim 09	Inverno	5,5	
Sim 02	Verão	6,0	
Sim 11	Inverno	6,5	
Sim 05	Inverno	7,0	
Sim 09	Verão	7,0	
Sim 08	Verão	9,0	
Sim 03	Inverno	10,5	
Sim 10	Verão	15,0	Grupo 3
Sim 08	Inverno	15,5	
Sim 04	Inverno	16,0	
Sim 03	Verão	17,0	
Sim 02	Inverno	17,5	
Sim 01	Inverno	20,5	
Sim 04	Verão	26,0	Grupo 4
Sim 11	Verão	41,0	
Sim 06	Verão	45,0	

Obs.: Para a raça Simental, nenhuma amostra foi classificada no grupo 1.

4.2 “BREEDING SOUNDNESS EVALUATION”

➤ BSE-STF

De acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 3.10).os resultados da classificação dos touros Nelore e Simental, segundo a BSE-STF, estão demonstrados nas tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14 – Classificação dos touros da raça Nelore segundo a BSE-STF – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	% SPTZ MORFOL. NORMAIS	PERÍMETRO TESTICULAR	MOTILI- DADE	CLASSIFI- CAÇÃO
Nel 12	Inverno	84,0	36,0	50	Satisfatórios
Nel 13	Inverno	78,4	37,0	60	
Nel 02	Inverno	79,5	35,5	45	
Nel 04	Inverno	83,5	36,5	75	
Nel 05	Inverno	73,0	37,5	50	
Nel 06	Inverno	90,0	38,5	50	
Nel 07	Inverno	71,3	35,5	45	
Nel 09	Inverno	81,5	37,0	80	
Nel 10	Inverno	80,0	38,0	65	
Nel 13	Verão	71,0	35,3	60	
Nel 08	Verão	78,0	37,0	55	
Nel 10	Verão	87,0	37,4	70	
Nel 12	Verão	69,0	33,1	70	Insatisfatórios
Nel 11	Verão	82,0	33,5	70	
Nel 02	Verão	80,0	33,7	90	
Nel 03	Verão	79,0	33,2	80	
Nel 04	Verão	57,0	35,0	70	
Nel 05	Verão	54,5	34,2	0,5	
Nel 06	Verão	67,0	36,9	60	
Nel 07	Verão	46,0	34,7	0	

Tabela 15 – Classificação dos touros da raça Simental segundo BSE-STF – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	% SPTZ MORFOL. NORMAIS	PERÍMETRO TESTICULAR	MOTILI- DADE	CLASSIFI- CAÇÃO
Sim 04	Inverno	73,0	41,0	70	Satisfatórios
Sim 08	Inverno	70,5	36,5	50	
Sim 09	Inverno	81,0	40,5	50	
Sim 10	Inverno	91,0	43,0	70	
Sim 11	Inverno	75,5	38,0	70	
Sim 02	Verão	92,0	41,4	70	
Sim 04	Verão	73,0	40,9	50	
Sim 09	Verão	83,0	42,1	95	
Sim 10	Verão	85,0	43,4	70	
Sim 12	Verão	80,0	49,6	70	
Sim 01	Inverno	58,5	38,0	60	Insatisfatórios
Sim 02	Inverno	0,0	40,5	10	
Sim 05	Inverno	50,0	33,5	60	
Sim 07	Inverno	35,5	40,5	40	
Sim 12	Inverno	64,5	48,0	70	
Sim 03	Verão	57,0	45,2	70	
Sim 06	Verão	39,0	42,1	70	
Sim 11	Verão	51,0	39,2	70	

➤ BSE-2

De acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 3.10), os resultados da classificação dos touros Nelore, segundo a BSE-2, estão demonstrados na tabela 16.

Tabela 16 – Classificação dos touros da raça Nelore segundo a BSE-2 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	EST.	DEF. MAIOR.	DEF. TOTAIS	NOTA DEF.	PERIM. ESC.	NOTA P.E.	MOTIL.	NOTA MOTIL.	NOTA FINAL	CLASSIFIC.
Nel 09	Inv.	6,0	18,5	40	37,0	40	80	20	100	Superior
Nel 13	Inv.	4,6	21,6	40	37,0	40	60	12	92	
Nel 04	Inv.	4,0	16,5	40	36,5	40	75	12	92	
Nel 10	Inv.	8,0	20,0	40	38,0	40	65	12	92	
Nel 10	Ver.	8,0	13,0	40	37,4	40	70	12	92	
Nel 12	Inv.	7,0	16,0	40	36,0	40	50	10	90	
Nel 02	Inv.	5,5	20,5	40	35,5	40	45	10	90	
Nel 06	Inv.	3,0	10,0	40	38,5	40	50	10	90	
Nel 08	Ver.	10,0	22,0	40	37,0	40	55	10	90	
Nel 13	Ver.	6,0	29,0	24	35,3	40	60	12	76	Satisfatório
Nel 11	Ver.	2,0	18,0	40	33,5	24	70	12	76	
Nel 06	Ver.	14,0	33,0	24	36,9	40	60	12	76	
Nel 05	Inv.	5,0	27,0	24	37,5	40	50	10	74	
Nel 07	Inv.	3,1	28,8	24	35,5	40	45	10	74	
Nel 02	Ver.	11,0	20,0	24	33,7	24	90	20	68	
Nel 03	Ver.	12,0	21,0	24	33,2	24	80	20	68	
Nel 04	Ver.	5,0	43,0	10	35,0	40	70	12	62	
Nel 12	Ver.	10,0	31,0	24	33,1	24	70	12	60	
Nel 05	Ver.	3,5	45,5	10	34,2	40	0,5	0	50	Insatisfatório
Nel 07	Ver.	6,0	54,0	10	34,7	40	0	0	50	

➤ BSE-3

De acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 3.10), os resultados da classificação dos touros Simental, segundo a BSE-3, estão demonstrados na tabela 17.

Tabela 17 – Classificação dos touros da raça Simental segundo BSE-3 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	EST.	DEF. MAIOR.	DEF. TOTAIS	NOTA DEF.	PERIM. ESC.	NOTA P.E.	MOTIL.	NOTA MOTIL.	NOTA FINAL	CLASSIF
Sim 09	Ver.	7,0	17,0	40	42,1	40	95	20	100	Ótimo
Sim 10	Inv.	3,0	9,0	40	43,0	40	70	10	90	
Sim 11	Inv.	6,5	24,5	40	38,0	40	70	10	90	
Sim 02	Ver.	6,0	8,0	40	41,4	40	70	10	90	
Sim 12	Ver.	4,0	20,0	40	49,6	40	70	10	90	
Sim 10	Ver.	15,0	15,0	40	43,4	40	70	10	90	
Sim 09	Inv.	5,5	19,0	40	40,5	40	50	5	85	Satisfatório
Sim 04	Inv.	16,0	27,0	20	41,0	40	70	10	70	
Sim 12	Inv.	4,0	35,5	20	48,0	40	70	10	70	
Sim 01	Inv.	20,5	41,5	0	38,0	40	60	10	50	
Sim 03	Ver.	17,0	43,0	0	45,2	40	70	10	50	
Sim 06	Ver.	45,0	61,0	0	42,1	40	70	10	50	
Sim 11	Ver.	41,0	49,0	0	39,2	40	70	10	50	
Sim 08	Inv.	15,5	29,5	20	36,5	20	50	5	45	
Sim 04	Ver.	26,0	27,0	0	40,9	40	50	5	45	
Sim 07	Inv.	4,0	64,5	0	40,5	40	40	5	45	
Sim 02	Inv.	17,5	100,0	0	40,5	40	10	0	40	Insatisfatório
Sim 05	Inv.	7,0	50,0	0	33,5	0	60	10	10	

4.3 DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

Os resultados referentes à dosagem de proteína total no plasma seminal de touros Nelore e Simental estão descritos nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18 – Valores de média e desvio padrão da quantidade de proteína total (mg/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p	Inverno	Verão	p
Proteína total (mg/mL)	29,7 ± 11,8	29,9 ± 17,9	0,97	29,5 ± 9,5	44,2 ± 19,5	0,02

Tabela 19 – Valores de média e desvio padrão da quantidade de proteína total (mg/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p	Nelore	Simental	p
Proteína total (mg/mL)	29,7 ± 11,8	29,5 ± 9,5	0,96	29,9 ± 17,9	44,2 ± 19,5	0,06

Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre a quantidade de proteína total no plasma seminal, nos períodos de inverno e no verão, para os animais da raça Nelore ($p=0,97$), enquanto que para a raça Simental essa diferença foi observada ($p=0,02$), com valores significativamente maiores de proteína total no verão. Comparando-se separadamente as raças dentro de cada estação, não observou-se diferença estatística

significante entre os valores encontrados para animais Nelore e Simental, tanto no inverno ($p=0,96$) quanto no verão ($p=0,06$), embora no verão haja uma tendência de maiores valores de proteína total para a raça Simental.

- Classificação para proteína total

Para a análise de proteínas de plasma seminal, dentro do experimento “proteína total”, as amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com os valores de quantidade de proteína total no plasma seminal, segundo metodologia descrita anteriormente.

As notas de corte para os grupos de proteína total estão descritas na tabela 20:

Tabela 20 – Notas de corte para classificação das amostras em grupos de acordo com a quantidade de proteína total presente no plasma seminal (experimento “proteína total”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Nelore	< 14,93	14,93 – 29,81	29,82 – 44,68	> 44,68
Simental	< 20,07	20,07 – 36,86	36,87 – 53,66	> 53,66

De acordo com os parâmetros descritos acima, a classificação dos touros Nelore e Simental foi realizada conforme demonstrado nas tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21 – Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a quantidade de proteína total no plasma seminal, expressa em mg/mL (experimento “proteína total”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	PROTEÍNA TOTAL (mg/mL)	CLASSIFICAÇÃO
Nel 10	Inverno	8,8010	Grupo 1
Nel 08	Verão	9,0997	
Nel 01	Verão	9,7563	
Nel 04	Verão	13,3681	
Nel 11	Verão	13,9778	
Nel 11	Inverno	14,0051	
Nel 12	Inverno	16,6837	Grupo 2
Nel 06	Verão	19,4189	
Nel 12	Verão	20,3101	
Nel 08	Inverno	21,5051	
Nel 09	Verão	26,8769	
Nel 05	Inverno	27,3980	
Nel 06	Inverno	27,5510	
Nel 13	Verão	28,8938	
Nel 13	Inverno	29,8470	Grupo 3
Nel 04	Inverno	35,2041	
Nel 07	Inverno	36,8113	
Nel 02	Verão	39,1661	
Nel 09	Inverno	39,1837	
Nel 07	Verão	39,4006	
Nel 01	Inverno	39,8725	
Nel 03	Inverno	41,0970	
Nel 02	Inverno	48,4439	Grupo 4
Nel 10	Verão	52,6280	
Nel 03	Verão	56,3335	
Nel 05	Verão	59,5231	

Tabela 22 – Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a quantidade de proteína total no plasma seminal, expressa em mg/mL (experimento “proteína total”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	PROTEÍNA TOTAL (mg/mL)	CLASSIFICAÇÃO
Sim 03	Verão	5,8632	Grupo 1
Sim 12	Inverno	8,0632	
Sim 07	Verão	13,2743	
Sim 01	Inverno	18,1204	
Sim 02	Inverno	22,9757	Grupo 2
Sim 08	Inverno	26,2703	
Sim 11	Inverno	26,5304	
Sim 05	Inverno	32,6861	
Sim 05	Verão	32,8808	
Sim 09	Inverno	33,9867	
Sim 10	Inverno	34,9404	
Sim 04	Inverno	35,2005	
Sim 03	Inverno	35,8941	
Sim 01	Verão	36,8208	
Sim 07	Inverno	38,4084	Grupo 3
Sim 06	Inverno	41,0094	
Sim 11	Verão	41,9804	
Sim 10	Verão	44,4195	
Sim 09	Verão	46,9993	
Sim 08	Verão	58,8195	Grupo 4
Sim 02	Verão	59,6169	
Sim 12	Verão	60,3674	
Sim 04	Verão	64,6358	
Sim 06	Verão	65,1048	

4.4 DOSAGEM DE TBARS

Os resultados referentes à dosagem de TBARS no plasma seminal de touros Nelore e Simental estão descritos nas tabelas 23 e 24.

Tabela 23 – Valores de média e desvio padrão da quantidade de TBARS (ng/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das estações do ano em função das raças, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p	Inverno	Verão	p
TBARS (ng/mL)	137,5 ± 90,0	108,1 ± 48,8	0,51	102,9 ± 44,9	233,2 ± 121,9	0,007

Tabela 24 – Valores de média e desvio padrão da quantidade de TBARS (ng/mL), e níveis de significância (p) relativos ao efeito das raças em função das estações do ano, em touros das raças Nelore e Simental – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p	Nelore	Simental	p
TBARS (ng/mL)	137,5 ± 90,0	102,9 ± 44,9	0,35	108,1 ± 48,8	233,2 ± 121,9	0,005

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de malondialdeído no plasma seminal, nos períodos de inverno e verão, para os animais da raça Nelore ($p=0,51$), enquanto que para a raça Simental essa diferença foi altamente significativa ($p=0,007$), com maiores valores de malondialdeído no período de verão. Comparando-se separadamente as raças dentro de cada estação, não observou-se diferença estatística significativa entre os valores encontrados no inverno ($p=0,35$), porém no verão pôde-se

demonstrar diferença entre as raças estudadas ($p=0,005$), tendo a raça Simental quantidade significativamente maior de malondialdeído no plasma seminal quando comparada à raça Nelore.

- Classificação para lipoperoxidação

Para a análise de proteínas de plasma seminal, dentro do experimento “lipoperoxidação”, as amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com os valores de quantidade de TBARS no plasma seminal, segundo metodologia descrita anteriormente.

As notas de corte para os grupos de lipoperoxidação estão descritas na tabela 25:

Tabela 25 – Notas de corte para classificação das amostras em grupos de acordo com a quantidade de TBARS presente no plasma seminal (experimento “lipoperoxidação”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Nelore	< 53,73	53,73 – 125,93	125,94 – 198, 15	> 198,15
Simental	< 64,60	64,60 – 174,42	174,43 – 284,26	> 284, 26

De acordo com os parâmetros descritos acima, a classificação dos touros Nelore e Simental foi realizada conforme demonstrado nas tabelas 26 e 27, respectivamente.

Tabela 26 – Classificação dos touros da raça Nelore de acordo com a quantidade de TBARS no plasma seminal, expressa em ng/mL (experimento “lipoperoxidação”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	TBARS (ng/mL)	CLASSIFICAÇÃO
Nel 11	Inverno	44,5605	Grupo 1
Nel 13	Inverno	49,0627	
Nel 05	Inverno	49,0627	
Nel 04	Verão	49,0627	
Nel 08	Verão	49,0627	
Nel 09	Verão	58,8000	Grupo 2
Nel 12	Verão	61,9300	
Nel 08	Inverno	63,8900	
Nel 05	Verão	68,5700	
Nel 06	Verão	86,2600	
Nel 06	Inverno	96,7100	
Nel 02	Inverno	101,2000	
Nel 13	Verão	118,0000	
Nel 12	Inverno	122,0000	
Nel 03	Inverno	127,0000	Grupo 3
Nel 02	Verão	130,6000	
Nel 11	Verão	131,9000	
Nel 03	Verão	142,6000	
Nel 10	Verão	143,3000	
Nel 01	Inverno	154,9000	
Nel 07	Verão	170,3000	
Nel 04	Inverno	193,8000	
Nel 01	Verão	195,0000	
Nel 10	Inverno	198,4000	Grupo 4
Nel 07	Inverno	228,7000	
Nel 09	Inverno	358,4000	

Tabela 27 – Classificação dos touros da raça Simental de acordo com a quantidade de TBARS no plasma seminal, expressa em ng/mL (experimento “lipoperoxidação”) – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

TOURO	ESTAÇÃO	TBARS (ng/mL)	CLASSIFICAÇÃO
Sim 01	Inverno	22,0495	Grupo 1
Sim 12	Inverno	22,0495	
Sim 07	Verão	49,0627	
Sim 01	Verão	65,3500	Grupo 2
Sim 05	Inverno	70,1400	
Sim 02	Inverno	91,6800	
Sim 08	Inverno	91,7300	
Sim 03	Inverno	107,9000	
Sim 04	Inverno	125,6000	
Sim 11	Inverno	135,9000	
Sim 06	Inverno	137,3000	
Sim 09	Inverno	137,5000	
Sim 07	Inverno	142,8000	
Sim 10	Inverno	150,6000	
Sim 05	Verão	170,0000	
Sim 09	Verão	178,4000	Grupo 3
Sim 06	Verão	181,6000	
Sim 10	Verão	193,0000	
Sim 11	Verão	240,5000	
Sim 12	Verão	243,2000	
Sim 04	Verão	305,3000	Grupo 4
Sim 02	Verão	335,2000	
Sim 08	Verão	365,1000	
Sim 03	Verão	472,0000	

4.5 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

➤ **Análise inicial dos géis**

No perfil proteico de plasma seminal de touros Nelore identificou-se 155 spots no gel referência, conforme demonstra a figura 1 (anexo E). Ao realizar o pareamento dos spots entre este gel e os outros géis do experimento, observou-se um número bastante variável de spots coincidentes. Apenas 04 spots (23, 34, 48 e 190) foram identificados em todos os géis analisados. Já no perfil proteico de plasma seminal de touros Simental identificou-se 248 spots no gel referência (figura 2 – anexo E), e também para esta raça o pareamento dos spots entre o gel referência e os outros géis do experimento mostrou um número bastante variável de spots coincidentes. Apenas 06 spots (263, 270, 284, 327, 329, 330) do gel referência para a raça Simental foram identificados em todos os géis analisados

Estes géis referência foram utilizados em todas as outras análises realizadas pelo software ImageMaster DATABASE 2D.

➤ Experimento “Inverno x Verão”

Para a raça Nelore, identificaram-se 20 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras coletadas no verão e no inverno, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 28. Levando-se em consideração estes parâmetros, 10 spots (5, 6, 23, 34, 64, 70, 86, 134, 166 e 190) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis protéicos nas duas estações do ano estudadas, como demonstram os gráficos 03 a 12.

Para a raça Simental, identificaram-se 09 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras coletadas no verão e no inverno, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 29. Levando-se em consideração estes parâmetros, apenas 02 spots (224 e 327) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos nas duas estações do ano estudadas, como demonstram os gráficos 13 e 14.

Tabela 28 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, nos grupos de inverno e verão – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-ESTAÇÃO DO ANO								
Spot n°.	pI	PM	Inverno			Verão		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F
5	4,19	21,39	2586,5	1634,2	84,6	642,13	720,3	84,6
6	4,31	21,37	3637,0	2701,9	100,0	1070,1	1582,4	84,6
9	4,37	21,34	884,4	869,2	76,9	169,7	154,5	61,5
13	4,54	21,45	1846,3	1738,9	38,5	255,6	254,3	53,8
14	4,44	21,42	1432,0	1036,4	92,3	199,3	259,6	69,2
23	5,05	16,92	40942,2	24982,7	100,0	22748,7	12169,8	100,0
34	4,90	16,74	6915,4	3878,9	100,0	1792,4	2403,0	100,0
64	5,15	17,09	1977,3	1174,6	92,3	3584,4	2326,0	100,0
70	6,38	16,87	3576,8	3329,1	92,3	968,0	1898,9	84,6
81	6,81	16,83	5761,0	4775,0	84,6	858,2	811,7	69,2
83	6,94	16,74	885,2	806,1	46,1	13,1	17,7	61,5
84	6,95	17,43	1486,7	1404,1	38,5	201,6	207,7	84,6
85	6,94	17,29	451,3	450,1	15,4	28,29	42,84	53,8
86	6,89	20,19	13165,9	9779,3	69,2	1077,9	1634,8	100,0
126	6,36	63,97	45,8	109,8	69,2	240,6	234,1	46,1
134	6,20	72,93	83,3	66,9	69,2	3,7	8,3	30,8
166	5,19	21,76	10921,1	10752,4	84,6	18,7	57,4	46,1
169	5,00	21,45	1241,0	1202,6	84,6	4580,8	4499,0	53,8
186	4,49	17,07	240,7	236,7	30,8	10,3	28,9	46,1
190	4,98	17,02	17655,2	10131,2	100,0	10470,1	6731,1	100,0

Tabela 29 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Simental**, nos grupos de inverno e verão – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-ESTAÇÃO DO ANO								
Spot n°.	pI	PM	Inverno			Verão		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F
9	4,28	22,46	103,3	134,0	58,3	1606,1	1263,4	91,7
41	4,87	47,37	105,0	100,5	33,3	12,2	30,5	66,7
115	6,93	18,87	724,3	638,5	75,0	76,8	142,9	50,0
168	5,31	18,20	186,1	171,2	41,7	38,9	34,6	66,7
224	4,05	18,63	396,1	508,8	75,0	1877,9	1504,9	100,0
243	4,74	18,33	2322,5	2302,4	33,3	155,9	144,7	58,3
253	4,69	18,67	2719,5	2408,0	66,7	624,2	583,4	75,0
327	4,73	18,66	10827,5	9650,7	100,0	2380,2	1407,2	100,0
334	6,88	20,43	3019,5	2962,5	16,7	148,5	142,2	41,7

Gráfico 3 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 5**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 4 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 6**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 5 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 23**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 6 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 34**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 7 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 64**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 8 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 70**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 9 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 86**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 10 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 134**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 11 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 166**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 12 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 190**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 13 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 224**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos períodos de inverno e verão

Gráfico 14 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 327**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos períodos de inverno e verão

➤ Experimento “Morfologia Espermática”

Para a raça Nelore, identificaram-se 06 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 30. Levando-se em consideração estes parâmetros, apenas um spot (172) se destacou como possível marcador de diferenças entre os perfis protéicos de grupos com diferentes valores de espermatozóides morfologicamente normais, como demonstra o gráfico 15.

Para a raça Simental, identificaram-se 08 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 31. Levando-se em consideração estes parâmetros, 04 spots (121, 128, 224 e 287) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos de grupos com diferentes valores de espermatozóides morfologicamente normais, como demonstram os gráficos 16 a 19.

Tabela 30 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS – MORFOLOGIA ESPERMÁTICA														
Spot n.º	Grupo 1					Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
	PI	PM	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
64	5,15	17,09	5007,1	3276,2	100,0	1223,3	822,2	90,0	2078,9	1755,8	100,0	1565,6	955,5	100,0
83	6,94	16,74	0,0	-	50,0	18,3	20,5	50,0	1020,7	900,4	80,0	3,7	1,9	66,7
86	6,89	20,19	3558,6	4702,1	100,0	3548,6	3697,0	70,0	14305,8	10538,1	100,0	1042,2	1219,1	100,0
135	6,01	74,16	43,2	2,4	100,0	167,3	124,1	100,0	381,0	191,5	100,0	-	-	0,0
166	5,19	21,76	117,3	127,7	100,0	176,8	258,8	80,0	12036,0	12022,3	60,0	-	-	0,0
172	6,74	17,43	790,0	826,2	100,0	40,7	77,3	70,0	81,9	128,7	60,0	3,5	1,9	66,7

Tabela 31 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Simental**, entre os diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS – MORFOLOGIA ESPERMÁTICA														
Spot n.º	Grupo 1					Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
	PI	PM	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
121	6,92	21,98	4128,1	3116,2	100,0	552,0	477,7	60,0	839,8	224,7	40,0	-	-	0,0
128	6,86	21,86	76,1	28,4	100,0	1817,1	2591,6	70,0	1577,9	1038,9	60,0	10478,5	8245,6	100,0
156	6,29	18,46	4967,9	6710,6	100,0	21411,8	16227,0	100,0	3759,6	4273,2	100,0	2794,9	4701,4	100,0
163	4,99	18,20	4917,6	4768,1	100,0	7638,5	4299,2	100,0	1533,0	2601,9	60,0	4954,0	1769,0	100,0
224	4,05	18,63	951,9	302,4	100,0	605,0	705,2	90,0	1174,2	1531,7	80,0	5465,1	5169,6	66,7
230	4,55	18,30	73,5	-	50,0	1,07	2,28	50,0	0,0	-	20,0	1509,0	1514,5	66,7
287	4,90	18,59	6887,9	4381,1	100,0	14034,7	10547,1	90,0	5511,1	6603,7	80,0	50994,7	45000,4	100,0
309	6,91	18,49	461,3	512,8	100,0	199,4	387,1	60,0	21,1	-	20,0	4298,5	4164,8	66,7

Gráfico 15 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 172**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais

Gráfico 16 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 121**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais

Gráfico 17 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 128**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais

Gráfico 18 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 224**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais

Gráfico 19 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 287**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais

➤ Experimento “Defeitos Maiores”

Para a raça Nelore, identificaram-se 08 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 32. Levando-se em consideração estes parâmetros, apenas um spot (69) se destacou como possível marcador de diferenças entre os perfis proteicos de grupos com diferentes valores de defeitos maiores, como demonstra o gráfico 20.

Para a raça Simental, identificaram-se 11 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 33. Levando-se em consideração estes parâmetros, 04 spots (6, 156, 223 e 327) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos de grupos com diferentes valores de defeitos maiores, como demonstram os gráficos 21 a 24.

Tabela 32 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os diferentes grupos de porcentagem de defeitos espermáticos maiores – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS – DEFEITOS MAIORES														
Spot n°.	Grupo 1					Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
	pI	PM	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
3	4,16	21,47	1610,4	1090,5	100,0	5471,1	3754,9	88,9	1378,7	1148,4	66,7	1265,8	1239,9	100,0
5	4,19	21,39	1443,4	427,9	66,7	707,9	776,6	88,9	4081,0	4048,7	66,7	719,1	1126,2	80,0
44	4,80	17,12	1252,1	1017,4	100,0	4786,3	3516,6	88,9	484,8	704,5	100,0	1167,6	735,0	100,0
69	5,95	16,88	16476,1	9090,6	100,0	9258,2	5156,0	88,9	626,2	539,1	100,0	2902,6	2703,4	100,0
70	6,38	16,87	1071,4	1515,1	66,7	1043,8	1302,0	88,9	10354,7	5844,3	100,0	1209,6	1169,1	80,0
124	6,77	71,72	9,8	-	33,3	10,0	20,3	55,6	3,9	5,6	66,7	624,0	626,0	40,0
135	6,01	74,16	681,6	515,0	100,0	139,8	111,4	66,7	40,5	9,1	100,0	177,9	148,6	100,0
139	5,94	49,37	7,1	10,1	66,7	12,2	27,0	77,8	274,0	267,6	100,0	10,1	9,8	60,0

Tabela 33 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Simental**, entre os diferentes grupos de porcentagem de defeitos espermáticos maiores – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-DEFEITOS MAIORES											
Spot n°.	Grupo 2					Grupo 3			Grupo 4		
	pI	PM	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
6	4,22	22,54	5237,7	3540,2	90,9	2066,0	1394,9	83,3	19297,5	17100,8	100,0
8	4,32	22,46	280,3	283,5	63,6	2537,0	2392,1	66,7	575,4	552,1	66,7
9	4,28	22,46	254,0	215,8	81,8	1960,5	1814,0	50,0	1894,3	1506,2	66,7
112	6,71	18,92	48,1	47,2	81,8	3,2	6,4	66,7	199,2	160,1	100,0
156	6,29	18,46	4961,6	5310,3	100,0	4276,3	4105,3	100,0	15449,4	9801,1	100,0
160	5,99	18,29	83,4	119,6	72,7	865,2	854,4	50,0	99,8	98,5	100,0
223	4,11	58,63	1718,4	1412,7	81,8	1738,9	1442,6	66,7	13515,4	12933,1	100
239	4,58	18,66	59,9	51,7	54,5	0,0	-	16,7	970,4	956,0	66,7
292	5,33	18,62	120,2	172,4	54,5	96,4	-	16,7	965,6	909,2	66,7
325	4,39	22,35	181,1	149,2	72,7	17,3	-	16,7	1121,9	1091,2	66,7
327	4,73	18,66	4437,0	3350,9	100,0	1038,4	771,6	100,0	1360,0	830,0	100,0

Gráfico 20 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 69**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de porcentagem de defeitos maiores

Gráfico 21 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 6**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais

Gráfico 22 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 156**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais

Gráfico 23 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 223**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais

Gráfico 24 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 327**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais

➤ Experimento “Proteína Total”

Para a raça Nelore, identificaram-se 21 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 34. Levando-se em consideração estes parâmetros, apenas um spot (44) se destacou como possível marcador de diferenças entre os perfis proteicos de grupos com diferentes quantidades de proteína total no plasma seminal, como demonstra o gráfico 25.

Para a raça Simental, identificaram-se 13 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 35. Levando-se em consideração estes parâmetros, 03 spots (6, 156 e 287) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos de grupos com diferentes quantidades de proteína total no plasma seminal, como demonstram os gráficos 26 a 28.

Tabela 34 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os diferentes grupos de quantidade de proteína total – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS – PROTEÍNA TOTAL														
Spot n.º	pI	PM	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
3	4,16	21,47	899,4	674,0	100,0	3618,8	2808,4	75,0	4581,2	2552,9	100,0	1532,8	1540,7	100,0
5	4,19	21,39	769,5	1262,1	83,3	985,4	980,9	75,0	2794,1	1675,2	87,5	334,4	279,9	100,0
6	4,31	21,37	748,1	670,4	83,3	3480,7	2234,5	100,0	2271,3	2859,1	100,0	938,8	854,1	75,0
10	4,41	21,37	12,0	17,7	66,7	248,2	336,9	87,5	5111,4	4709,8	75,0	349,2	251,9	75,0
12	4,51	21,45	3,8	3,5	33,3	31,0	61,6	62,5	1356,3	1230,3	62,5	95,0	131,7	75,0
14	4,44	21,42	39,5	30,7	50,0	701,7	574,8	87,5	2649,0	1964,9	100,0	571,3	655,7	75,0
44	4,80	17,12	655,1	741,0	100,0	2679,4	3256,2	100,0	3289,9	2750,9	87,5	3445,4	2025,1	100,0
56	5,27	16,81	120,2	127,6	66,7	411,8	194,3	37,5	1626,7	691,4	37,5	713,1	421,0	100,0
65	5,56	16,79	59,1	61,6	66,7	33,8	47,5	25,0	158,6	194,5	75,0	2058,3	2072,0	50,0
69	5,95	16,88	5460,2	4168,8	83,3	3411,4	3773,1	100,0	14334,9	9903,4	87,5	3045,6	1904,4	100,0
81	6,81	16,83	205,1	395,7	83,3	1130,1	1197,3	75,0	5909,9	5979,7	75,0	1402,2	2076,9	75,0
82	6,95	17,09	1040,3	922,1	50,0	1060,6	982,0	87,5	4556,9	3700,7	87,5	1044,8	708,1	100,0
86	6,89	20,19	223,9	286,1	66,7	6099,5	4040,1	100,0	4768,4	4820,8	75,0	2650,9	3687,0	100,0
87	6,89	18,71	310,3	558,1	83,3	396,0	429,1	75,0	17978,3	17688,4	62,5	4249,3	3987,0	75,0
93	6,45	22,53	887,6	831,2	66,7	1,7	3,7	62,5	1225,7	1151,6	62,5	0,0	-	25,0
95	6,53	79,71	43,4	81,1	66,7	156,0	160,5	37,5	45,8	33,9	75,0	512,2	491,2	75,0
130	6,40	52,92	2,4	3,4	33,3	149,8	297,3	50,0	26,3	22,51	62,5	453,7	386,8	50,0
137	5,96	74,47	21,6	27,7	50,0	53,1	39,4	87,5	93,4	118,1	62,5	444,1	405,2	50,0
138	5,93	74,47	27,1	30,9	66,7	53,7	40,5	87,5	93,9	102,9	62,5	473,3	475,3	50,0
168	5,23	21,29	7,6	10,7	33,3	31,1	59,8	62,5	2550,5	1947,7	87,5	173,1	240,1	75,0
190	4,98	17,02	8481,7	4988,4	100,0	7987,8	4193,1	100,0	21689,5	13099,2	100,0	4532,7	2221,2	100,0

Tabela 35 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Simental**, entre os diferentes grupos de quantidade de proteína total – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS – PROTEÍNA TOTAL														
Spot n°.	pI	PM	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
5	4,14	22,68	741,7	574,1	50,0	295,3	523,5	70,0	3071,9	2665,6	80,0	598,5	652,4	80,0
6	4,22	22,54	2421,8	307,1	50,0	2314,0	1909,0	100,0	2271,0	1351,2	100,0	6826,3	5701,5	100,0
8	4,32	22,46	366,8	383,8	50,0	42,8	69,0	50,0	1030,3	881,4	100,0	340,8	427,3	80,0
9	4,28	22,46	1339,3	1255,1	50,0	61,9	52,3	70,0	1184,3	734,6	100,0	442,0	614,8	80,0
112	6,71	18,92	1,6	2,3	50,0	12,6	28,8	60,0	148,1	134,9	80,0	66,6	104,0	100,0
156	6,29	18,46	2414,7	4466,7	100,0	3967,7	5182,5	90,0	5902,2	5424,9	100,0	16953,9	11446,7	100,0
174	4,61	18,18	0,0	0,0	50,0	1538,1	2836,2	60,0	2573,9	1918,1	100,0	454,9	615,7	100,0
224	4,05	18,63	4426,9	4284,9	75,0	212,8	355,0	80,0	1636,4	1100,4	100,0	2900,3	1826,4	100,0
284	4,78	18,48	5363,0	1688,5	100,0	8177,0	5806,4	100,0	32213,6	28013,6	100,0	3635,5	5069,1	100,0
287	4,90	18,59	1898,4	1819,6	75,0	8846,7	3901,1	100,0	22372,6	14459,4	100,0	19514,4	15327,1	80,0
293	5,38	18,51	10312,7	9107,0	75,0	3362,6	2188,9	90,0	8106,0	5857,6	100,0	4676,4	3379,9	80,0
302	5,24	18,41	1181,0	-	25,0	1095,9	1059,9	80,0	3835,7	2532,4	80,0	1644,4	1548,1	60,0
312	6,93	18,38	-	-	0,0	56,8	58,6	60,0	121,9	90,5	60,0	1637,8	1643,5	40,0

Gráfico 25 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 44**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.

Gráfico 26 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 6**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.

Gráfico 27 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 156**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.

Gráfico 28 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 287**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de quantidade de proteína total.

➤ Experimento “Lipoperoxidação”

Para a raça Nelore, identificaram-se 22 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 36. Levando-se em consideração estes parâmetros, 04 spots (5, 7, 68 e 174) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos de amostras seminais com graus variáveis de peroxidação lipídica, como demonstram os gráficos 29 a 32.

Para a raça Simental, identificaram-se 18 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos diferentes grupos, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 37. Levando-se em consideração estes parâmetros, 02 spots (156 e 224) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos de amostras seminais com graus variáveis de peroxidação lipídica, como demonstram os gráficos 33 e 34.

Tabela 36 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os diferentes grupos de quantidade de TBARS – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS – TBARS														
Spot n°.	pI	PM	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
3	4,16	21,47	766,8	876,5	80,0	2126,9	1301,2	88,9	6489,7	5249,5	100,0	1685,9	999,7	100,0
5	4,19	21,39	508,3	479,4	80,0	794,9	907,0	88,9	4076,7	3571,1	77,8	5105,2	3769,1	100,0
6	4,31	21,37	698,7	775,6	100,0	2410,8	1687,3	100,0	10576,8	10083,4	77,8	1303,1	869,9	100,0
7	4,27	21,39	7574,4	7422,8	80,0	498,9	738,4	66,7	369,2	551,0	66,7	853,5	568,7	100,0
10	4,41	21,37	1168,5	2034,5	80,0	204,5	302,7	88,9	766,3	640,4	66,7	173,6	191,1	66,7
34	4,90	16,74	10058,3	7811,6	100,0	2652,9	2027,2	100,0	18466,1	16117,1	100,0	7677,9	5428,0	100,0
43	4,83	16,92	309,8	430,1	40,0	617,2	575,0	66,7	5947,2	5550,2	77,8	58,7	-	33,3
44	4,80	17,12	1018,5	786,4	100,0	12954,6	11343,3	100,0	5015,8	3919,5	88,9	3226,1	4432,7	100,0
64	5,15	17,09	767,7	607,7	100,0	4191,1	2650,5	100,0	4660,1	3231,1	100,0	2382,0	445,1	66,7
68	5,75	16,89	135,9	-	20,0	229,9	283,9	55,6	1189,5	1560,7	44,4	8322,1	7692,5	66,7
69	5,95	16,88	17637,0	13075,4	100,0	3230,2	3534,1	100,0	8401,5	5487,5	88,9	5755,8	8085,3	66,7
82	6,95	17,09	3718,8	3283,7	60,0	919,2	888,8	88,9	3508,7	2851,0	88,9	316,9	252,8	66,7
83	6,94	16,74	814,3	816,5	40,0	7,6	6,8	55,6	205,9	399,2	55,6	535,6	705,7	66,7
86	6,89	20,19	11300,2	9828,6	80,0	4136,1	3379,6	100,0	2587,2	2506,4	88,9	12446,2	-	33,3
90	6,82	20,27	590,4	522,1	60,0	83,4	109,7	77,8	3905,6	3782,7	77,8	142,3	150,9	100,0
93	6,45	22,53	362,2	-	20,0	4,3	4,6	55,6	333,1	792,5	66,7	1270,3	950,7	100,0
138	5,93	74,47	16,7	18,8	60,0	72,1	135,6	77,8	12,6	8,2	55,6	230,1	123,8	100,0
166	5,19	21,76	2701,9	4871,4	80,0	27,1	61,4	55,6	93,7	112,1	66,7	965,8	369,1	66,7
168	5,23	21,29	505,2	809,8	60,0	97,4	150,8	66,7	291,0	396,3	66,7	4411,1	3504,4	66,7
174	6,65	16,94	10999,5	10412,2	80,0	1221,2	1281,2	77,8	929,3	2117,3	66,7	212,7	-	33,3
177	4,75	17,13	373,1	233,0	40,0	241,2	347,1	77,8	2780,9	2639,1	55,6	608,3	-	33,3
190	4,98	17,02	7076,0	3414,4	100,0	7951,3	4019,9	100,0	21373,8	15832,3	100,0	6997,5	2528,9	100,0

Tabela 37 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Simental**, entre os diferentes grupos de quantidade de TBARS.

GRUPOS – TBARS														
Spot n°.	pI	PM	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
6	4,22	22,54	2639,0	-	33,3	3344,5	1560,7	100,0	7223,2	5250,8	100,0	4407,8	5843,6	100,0
8	4,32	22,46	95,4	-	33,3	103,4	107,8	58,3	1696,6	1228,9	100,0	294,2	319,1	75,0
9	4,28	22,46	325,7	-	33,3	88,5	127,5	75,0	1455,4	811,4	100,0	489,4	518,2	75,0
102	6,16	18,84	0,0	-	33,3	191,8	391,4	58,3	1796,6	1292,9	100,0	332,4	513,9	100,0
115	6,93	18,87	162,6	-	33,3	122,7	178,6	75,0	598,5	584,2	80,0	2,7	-	25,0
118	6,94	19,00	-	-	0,0	96,5	94,9	58,3	1392,9	1153,4	80	1,8	2,5	50
156	6,29	18,46	185,2	320,8	100,0	4377,4	5665,4	91,7	12457,1	9097,3	100,0	18797,0	11211,0	100,0
159	5,94	18,45	3217,6	1728,3	100,0	11044,0	7626,0	100,0	27148,0	21609,0	100,0	3455,7	4174,3	100,0
162	5,22	18,18	30,8	-	33,3	1164,5	1317,4	83,3	3612,2	2152,6	100,0	358,2	330,4	100,0
163	4,99	18,20	2013,6	-	33,3	6234,1	4036,4	100,0	13529,5	8520,1	100,0	2123,4	1582,7	100,0
224	4,05	18,63	282,5	367,7	66,7	411,8	508,5	83,3	1507,4	1534,9	100,0	2691,5	1826,2	100,0
242	4,80	18,28	0,0	-	33,3	161,4	267,2	66,7	1198,6	1090,5	80,0	56,8	37,6	75,0
263	4,88	18,35	2858,7	2610,9	100,0	4596,8	2658,4	100,0	15012,4	11935,7	100,0	4632,1	3679,1	100,0
287	4,90	18,59	2200,3	2162,7	66,7	9605,7	4270,3	100,0	23806,4	14879,1	100,0	4565,2	4851,4	75,0
292	5,33	18,62	27,8	-	33,3	53,4	60,6	33,3	587,5	375,3	100,0	422,4	-	25,0
293	5,38	15,51	2580,9	3649,9	66,7	4287,8	2903,0	91,3	17717,5	12861,6	100,0	3661,6	3123,8	75,0
294	5,53	18,41	1,2	-	33,3	764,1	938,9	75,0	2598,5	2112,1	80,0	102,0	133,8	50,0
298	5,65	18,52	0,0	-	33,3	25,3	53,1	41,7	633,5	565,0	100,0	0,0	-	25,0

Gráfico 29 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 5**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.

Gráfico 30 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 7**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.

Gráfico 31 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 68**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.

Gráfico 32 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 174**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.

Gráfico 33 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 156**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.

Gráfico 34 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 224**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos diferentes grupos de quantidade de TBARS.

➤ Experimento “BSE-STF”

Para a raça Nelore, identificaram-se 15 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 38. Levando-se em consideração estes parâmetros, 06 spots (34, 64, 70, 82, 139 e 140) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos dos dois grupos, como demonstram os gráficos 35 a 40.

Para a raça Simental, identificaram-se 05 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 39. Levando-se em consideração estes parâmetros, 02 spots (156 e 263) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos dos dois grupos, como demonstram os gráficos 41 e 42.

Tabela 38 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-STF – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-BSE-STF								
Spot n°.	pI	PM	Satisfatórios			Insatisfatórios		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F
5	4,19	21,39	2203,3	1584,9	83,3	441,3	820,6	75,0
34	4,90	16,74	8538,8	5549,7	100,0	2206,4	2898,1	100,0
43	4,83	16,92	203,5	183,1	50,0	828,9	590,6	75,0
64	5,15	17,09	1479,3	1043,3	91,7	6650,0	5275,7	100,0
70	6,38	16,87	6349,7	4998,8	83,3	1131,0	1095,61	87,5
82	6,95	17,09	1118,9	1041,3	83,3	3126,4	2384,1	87,5
84	6,95	17,43	1461,9	1412,6	33,3	137,6	218,1	100,0
86	6,89	20,19	5751,3	4744,4	75,0	1257,8	1867,8	100,0
100	6,74	77,69	124,8	135,5	75,0	644,0	625,7	25,0
135	6,01	74,16	175,1	151,3	100,0	516,0	425,8	62,5
136	6,04	74,16	144,1	135,7	100,0	370,6	303,6	62,5
139	5,94	49,37	228,3	216,5	75,0	4,1	7,2	75,0
140	5,99	49,19	251,8	238,5	66,7	3,8	9,2	62,5
154	4,90	51,19	44,9	49,9	58,3	903,0	903,8	25,0
177	4,75	17,13	191,6	208,2	58,3	1056,0	832,4	62,5

Tabela 39 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Simental**, entre os animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-STF– Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-BSE-STF								
Spot n°.	pI	PM	Satisfatórios			Insatisfatórios		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F
6	4,22	22,54	6777,3	5064,5	100,0	1595,7	1706,2	75,0
156	6,29	18,46	12664,6	8770,8	100,0	3050,6	4071,1	100,0
157	6,77	18,46	1974,7	1759,0	90,0	6201,5	5411,5	75,0
253	4,69	18,67	1841,8	1312,8	70,0	268,5	410,7	62,5
263	4,88	18,35	11605,2	7320,1	100,0	3416,7	2012,1	100,0

Gráfico 35 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 34**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 36 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 64**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 37 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 70**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 38 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 82**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 39 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 139**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 40 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 140**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 41 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 156**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

Gráfico 42 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 263**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-STF.

➤ Experimento “BSE-2”

Identificaram-se 16 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 40. Levando-se em consideração estes parâmetros, 06 spots (70, 82, 139, 140, 146 e 147) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos dos três grupos, como demonstram os gráficos 43 a 48.

Tabela 40 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-2 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-BSE2											
Spot n°.	pI	PM	Superior			Satisfatório			Insatisfatório		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
10	4,41	21,37	4957,0	4655,1	77,8	165,9	186,4	55,6	192,0	64,7	100,0
68	5,75	16,89	2873,9	2681,8	44,4	35,9	47,4	55,6	10,9	-	50,0
70	6,38	16,87	4889,1	3832,0	77,8	445,1	724,7	88,9	37,7	8,8	100,0
82	6,95	17,09	895,8	918,3	88,9	3782,0	3078,2	77,8	3060,5	2055,1	100,0
87	6,89	18,71	3157,5	6199,2	66,7	325,4	285,3	88,9	4839,5	5026,5	100,0
96	6,59	79,03	59,0	51,2	77,8	428,9	377,1	55,6	-	-	0,0
98	6,67	78,36	29,4	35,5	77,8	663,5	579,8	66,7	0,7	-	50,0
100	6,74	77,69	90,9	111,4	77,8	443,3	400,5	44,4	-	-	0,0
126	6,36	63,97	453,7	447,5	55,6	30,1	29,3	66,7	-	-	0,0
138	5,93	74,47	331,5	292,3	66,7	32,4	48,4	88,9	-	-	0,0
139	5,94	49,37	121,5	110,3	77,8	4,8	7,0	66,7	1,3	1,8	100,0
140	5,99	49,19	349,1	328,2	66,7	3,7	8,6	66,7	0,0	-	50,0
146	5,74	47,98	202,1	186,5	66,7	18,5	30,3	77,8	0,0	-	50,0
147	5,70	47,47	203,2	191,5	66,7	19,7	38,1	77,8	11,8	15,0	100,0
168	5,23	21,29	3837,0	3552,0	55,6	286,1	834,6	66,7	447,3	-	50,0
173	6,67	20,49	114,3	107,8	22,2	20,9	25,2	88,9	8,6	-	50,0

Gráfico 43 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 70**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.

Gráfico 44 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 82**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.

Gráfico 45 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 139**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.

Gráfico 46 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 140**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.

Gráfico 47 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 146**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.

Gráfico 48 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 147**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Nelore**, nos animais classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-2.

➤ Experimento “BSE-3”

Identificaram-se 11 spots com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os géis das amostras dos animais classificados como reprodutores ótimos, satisfatórios e insatisfatórios, cujos resultados de peso molecular, ponto isoelétrico, volume normalizado, desvio padrão e frequência estão descritos na tabela 41. Levando-se em consideração estes parâmetros, 06 spots (119, 162, 163, 263, 293 e 294) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos dos três grupos, como demonstram os gráficos 49 a 54.

Tabela 41 – Ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e médias de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência (%F) de detecção dos spots que demonstraram diferença estatística significativa nas amostras de proteína de plasma seminal de touros **Nelore**, entre os animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-3 – Dourados/MS – Jul 2001/Fev 2002

GRUPOS-BSE3											
Spot n°.	pI	PM	Ótimos			Satisfatórios			Insatisfatórios		
			VION	DP	%F	VION	DP	%F	VION	DP	%F
115	6,93	18,87	670,8	601,0	83,3	49,2	77,3	60,0	186,5	-	50,0
119	6,94	19,95	49,7	37,7	83,3	0,6	1,3	50,0	-	-	0,0
157	6,77	18,46	4936,7	3479,1	100,0	1334,9	1656,3	70,0	7292,2	7158,8	100,0
159	5,94	18,45	26667,6	21371,7	100,0	5396,6	3133,6	100,0	17965,7	16084,0	100,0
162	5,22	18,18	4062,5	2295,9	100,0	514,3	768,6	70,0	437,8	607,9	100,0
163	4,99	18,20	13647,9	8519,3	100,0	2970,2	2765,9	80,0	3728,5	4187,0	100,0
242	4,80	18,28	1267,8	1071,8	83,3	92,9	218,5	50,0	123,8	175,1	100,0
263	4,88	18,35	15834,5	11585,7	100,0	4686,1	2963,7	100,0	2950,0	2852,2	100,0
293	5,38	18,51	16235,5	12558,4	100,0	2984,7	3173,9	80,0	4293,9	-	50,0
294	5,53	18,41	2612,5	2002,3	100,0	121,8	142,5	40,0	511,5	-	50,0
302	5,24	18,41	4680,1	2981,4	83,3	1037,9	934,6	60,0	900,9	-	50,0

Gráfico 49 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 119**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.

Gráfico 50 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 162**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.

Gráfico 51 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 163**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.

Gráfico 52 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 263**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.

Gráfico 53 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 293**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.

Gráfico 54 – Médias dos valores de volume normalizado (VION), desvio padrão (DP) e frequência de detecção do **SPOT 294**, nas amostras de proteína de plasma seminal de touros da raça **Simental**, nos animais classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios segundo a BSE-3.

5 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos será subdividida nos seguintes tópicos: exame andrológico e análise seminal padrão, dosagem de proteína total no plasma seminal, quantificação da lipoperoxidação no plasma seminal e eletroforese bidimensional de proteínas do plasma seminal.

5.1 EXAME ANDROLÓGICO E ANÁLISE SEMINAL PADRÃO

➤ Motilidade progressiva retilínea

Os valores de motilidade progressiva retilínea não apresentaram diferença estatística entre as amostras coletadas no verão e no inverno, tanto para a raça Nelore como para Simental; também não houve diferença entre as duas raças, quando as amostras de verão e inverno foram avaliadas isoladamente. Estes resultados já eram esperados, visto que a motilidade espermática é um parâmetro questionável para a predição da fertilidade de touros, e mais ainda de variações decorrentes dos efeitos do estresse térmico ambiental no desempenho reprodutivo destes animais.

Fields, Burns e Warnick (1979) estudaram amostras seminais de touros das raças Brahman, Angus e Hereford, coletadas no verão e no inverno. Os taurinos não apresentaram diferenças na motilidade progressiva entre verão e inverno ($68 \pm 2,8\%$ e $70 \pm 2,8\%$, respectivamente; $p > 0,05$). Os touros Brahman, por sua vez, apresentaram valores menores no

verão em relação ao inverno subsequente ($37 \pm 4,9\%$ e $59 \pm 4,9\%$, respectivamente; $p < 0,01$); contudo, estes resultados podem ser decorrentes da imaturidade sexual dos touros Brahman, visto que quando as amostras de verão foram coletadas os animais estavam com 13 a 16 meses de idade, e na coleta seguinte (inverno), já possuíam idades entre 19 e 22 meses.

Mathevon, Buhr e Dekkers (1998), estudando touros adultos da raça Holandesa, não encontraram diferenças na motilidade espermática entre as estações do ano. Este resultado foi compartilhado por Chacón et al. (1999) e Kumi-Diaka, Nagaratnam e Rwuaan (1981), que avaliaram animais taurinos e zebuínos mantidos em centrais de inseminação artificial e criados a campo, respectivamente. Chandolia, Reinertsen e Hansen (1999) observaram que amostras espermáticas de touros zebuínos e taurinos, submetidas a desafio por calor, não apresentaram diferenças entre raças na porcentagem de espermatozóides móveis, na velocidade espermática e na frequência de batimentos da cauda.

Nichi (2003), estudando animais das raças Nelore e Simental nos períodos de verão e inverno, não observou diferenças entre as raças no verão, porém no inverno as amostras de touros Nelore apresentaram maiores valores de motilidade do que as de touros Simental ($62,7 \pm 14,0\%$ e $53,0 \pm 14,4\%$, respectivamente; $p = 0,042$).

Foote (2003) comentou que a avaliação da motilidade espermática é o teste mais utilizado para estimar a capacidade fertilizante do sêmen, pela rapidez e facilidade de aplicação, e por haver uma certa correlação com fertilidade; contudo, este autor salienta que o aspecto subjetivo da avaliação da motilidade geralmente diminui a confiabilidade deste teste. Entretanto, Brahmkshtri et al. (1999) verificaram que a motilidade espermática pré-congelamento de amostras seminais de touros cruzados não apresentou correlação com a taxa de concepção das fêmeas inseminadas com o sêmen, após a descongelamento.

➤ Perímetro escrotal

Os animais da raça Nelore apresentaram diferença estatística entre as medidas de perímetro escrotal nos períodos de inverno e verão ($36,7 \pm 1,4$ cm e $35,0 \pm 1,4$ cm, respectivamente; $p=0,005$). Embora tenha sido altamente significativa, os valores médios para cada estação estão bem próximos, com uma diferença de apenas 1,7 cm, a qual, embora não esperada, pode ser justificada por um grau leve de degeneração testicular nestes animais que, embora adaptados a condições tropicais, foram submetidos a temperatura e umidade muito elevadas. Singleton (1974) observou que touros zebuínos sofrem o mesmo grau de degeneração testicular e epididimária quando se ultrapassa o limite de termorregulação. Chacón et al. (1999) reforçam esta hipótese, ao demonstrar um efeito negativo entre o perímetro escrotal e a temperatura ambiente à qual o animal havia sido exposto no mês anterior à avaliação andrológica, e justificam que a diminuição do perímetro escrotal é uma consequência direta da redução na espermatogênese, ou seja, da degeneração testicular.

Já na comparação entre as medidas de perímetro escrotal de animais da raça Nelore e Simental, em cada estação separadamente, observou-se valores significativamente maiores para a raça Simental, tanto no verão quanto no inverno. Estes resultados concordam com a exaustiva descrição, encontrada na literatura, de maiores valores de perímetro escrotal para animais taurinos em comparação aos zebuínos, em parte explicada pelas diferenças no formato dos testículos destes animais (CHENOWETH et al., 1996; FIELDS; BURNS; WARNICK, 1979; FIELDS; HENTGER JR.; CORNELISSE, 1982; SILVA; DODE; PORTO, 1987).

➤ Morfologia espermática

Os touros da raça Nelore apresentaram valores mais altos de porcentagem de defeitos totais no verão. Ao analisar somente os defeitos maiores, porém, não se observou diferença estatística entre as amostras de verão e inverno, apesar das amostras de verão demonstrarem um aumento nos valores deste parâmetro. A raça Simental, por sua vez, apresentou porcentagens de defeitos totais semelhantes entre as estações do ano. No verão, apesar de não ter havido significância estatística, observou-se um aumento de defeitos maiores, caracterizando interferência do estresse térmico na espermatogênese destes animais.

Ao avaliar as amostras de inverno isoladamente, não houve diferença significativa entre os valores de morfologia espermática das duas raças estudadas, provavelmente em virtude da grande variabilidade individual encontrada; contudo, a raça Simental apresentou valores mais altos que os da raça Nelore, tanto para defeitos totais quanto para defeitos maiores. Já no verão, os touros da raça Simental apresentaram valores significativamente mais altos de defeitos espermáticos maiores, condizentes com a maior susceptibilidade destes animais ao estresse térmico ambiental e suas implicações na qualidade seminal.

Diversos autores salientam os efeitos deletérios do estresse térmico na morfologia espermática, principalmente para taurinos, devido à adaptabilidade destes animais. Chacón et al. (1999) encontraram uma relação positiva e estatisticamente significante entre temperatura ambiente e porcentagem de touros classificados como impróprios para a reprodução devido à anormalidades espermáticas. Kumi-Diaka, Nagaratnam e Rwuaan (1981) observaram efeitos sazonais na qualidade espermática de taurinos, com aumento no número de anormalidades espermáticas no verão; os animais zebuínos, por sua vez, não apresentaram variações neste parâmetro no decorrer do ano. Nichi (2003) encontrou altas porcentagens de defeitos espermáticos maiores na raça Simental, quando comparados às da raça Nelore. Também

encontrou maior porcentagem de defeitos maiores no verão, nas amostras seminais de touros Simental, do que no inverno, demonstrando assim uma menor adaptabilidade de taurinos a ambientes tropicais e a influência deletéria das altas temperaturas à morfologia espermática.

5.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL NO PLASMA SEMINAL

Não foi encontrada diferença entre as dosagens de proteína total no plasma seminal, comparando-se as estações de inverno e verão, para a raça Nelore. Já os animais da raça Simental apresentaram valores significativamente maiores de proteína total de plasma seminal no verão. Ainda, ao se realizar uma comparação entre as duas raças somente no período de verão, observou-se uma tendência de maiores valores de proteína total para a raça Simental, embora não tenha havido significância estatística. Tal fato pode ser explicado pela variabilidade individual entre as amostras.

Roncoletta (2003) encontrou diferença significativa entre as dosagens de proteína total de grupos de alta, média e baixa fertilidade, trabalhando com touros da raça Nelore. Os animais de melhor desempenho reprodutivo apresentaram menores concentrações de proteína total no plasma seminal. O coeficiente de Pearson mostrou uma correlação significativa ($p < 0,05$), negativa e relativamente baixa ($r = - 0,34$) entre porcentagem de prenhez obtida a campo e concentração de proteína total, ou seja, quanto maior a concentração de proteína total no plasma seminal de touros Nelore, pior foi sua fertilidade a campo.

Assim, a presença de maiores valores de proteína total no verão, para animais da raça Simental, parece ser mais um indicativo do prejuízo do estresse térmico à fertilidade de machos bovinos de raças taurinas.

Comparando-se a variação encontrada nos resultados de proteína total do presente trabalho com aquela encontrada por Roncoletta (2003) no plasma seminal de touros doadores de sêmen, observa-se que esta variabilidade é muito maior para touros a campo. Isso pode ser explicado pela interferência nutricional, fator que é controlado dentro de uma central de inseminação artificial, mas não em criações extensivas.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO NO PLASMA SEMINAL

Os animais da raça Nelore não apresentaram diferenças na quantidade de TBARS no plasma seminal, nos períodos de inverno e verão. Já para os animais da raça Simental foi observada uma diferença altamente significativa, com maiores valores de TBARS no verão. Além disso, semelhante ao ocorrido com proteína total, os valores de TBARS no verão foram significativamente maiores para a raça Simental em comparação à raça Nelore.

Nichi (2003) observou que os touros da raça Simental apresentaram maiores concentrações seminais de TBARS no verão, em relação aos valores apresentados pelos mesmos no inverno ($842,6 \pm 527,9$ ng/ml e $419,3 \pm 434,1$ ng/ml, respectivamente; $p = 0,006$) e aos valores apresentados pelos touros Nelore nestas duas estações do ano ($430,2 \pm 390,9$ ng/ml no inverno e $583,0 \pm 324,9$ ng/ml no verão). Estes resultados, em concordância com os encontrados no presente experimento, indicam um maior índice de peroxidação lipídica nos animais taurinos em relação aos zebuínos.

A dosagem de TBARS como estimativa da lipoperoxidação no sêmen é largamente difundida na espécie humana (ZABLUDOVSKY et al., 1999; AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a; ALVAREZ et al., 1987). Existem, porém, poucos trabalhos sobre os

níveis de TBARS presentes no sêmen de touros. A grande maioria dos estudos utiliza sistemas indutores de lipoperoxidação para testar o efeito protetor de antioxidantes, como fizeram Beconi et al. (1991), Schöneck, Braum e Einspanier (1996) e O'Flaherty, Beconi e Beorlegui (1997).

Ao induzir a lipoperoxidação em sêmen de touros Holandeses, Beconi et al. (1991) detectaram uma produção de 500ng/ml de TBARS no período de duas horas de incubação, sendo que a adição do antioxidante α -tocoferol reduziu este valor à metade. Utilizando o mesmo sistema gerador e trabalhando também com taurinos, Schöneck, Braum e Einspanier (1996) observaram os mesmos valores (500ng/ml) de TBARS, para um intervalo de 60 minutos, e redução nos valores de TBARS para amostras tratadas com glutathione redutase. O'Flaherty, Beconi e Beorlegui (1997) verificaram que os níveis de TBARS em touros Holandeses, obtidos através de indução de lipoperoxidação, foram menores quando as amostras foram tratadas com antioxidantes (6.160 ± 900 e 9.470 ± 1.200 ng/ 10^8 espermatozóides, respectivamente; $p < 0,05$).

Jones e Mann (1977), trabalhando com sêmen de carneiros Suffolk, determinaram os índices de lipoperoxidação sem indução, e obtiveram valores de TBARS em torno de 510ng/ml.

Pode-se observar que os valores de dosagem de TBARS no presente experimento foram bem menores que os descritos na literatura. Isso pode ser explicado pelo fato de que, neste experimento, utilizou-se o plasma seminal para a dosagem, enquanto a maioria dos pesquisadores utiliza sêmen total. Além disso, a técnica utilizada pela maioria dos autores consiste em quantificação da lipoperoxidação induzida, a fim de medir a susceptibilidade do espermatozóide à peroxidação, e no presente trabalho o objetivo foi detectar a ocorrência natural de lipoperoxidação e a diferença desta ocorrência entre os grupos avaliados, existindo portanto particularidades entre técnicas que podem causar variações nos resultados finais.

Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o estresse térmico interfere não só na espermatogênese, aumentando a taxa de defeitos morfológicos, mas também aumentando a ocorrência de lipoperoxidação no testículo e/ou reduzindo os níveis de antioxidantes no sêmen. Uma teoria para explicar este resultado é a de que, quando submetido a elevações de temperatura, o metabolismo testicular aumenta, sem contudo haver uma compensação da circulação, fazendo com que o tecido entre em hipóxia. Quando o metabolismo retorna aos níveis normais, o aporte de oxigênio também volta ao normal, gerando um excesso de oxigênio que provoca produção de EROs. Os resultados também mostram que este problema é mais evidente nos taurinos, mostrando o controle sobre a qualidade seminal de indivíduos mais adaptados (zebuínos).

5.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

➤ Análise inicial

A avaliação dos resultados obtidos a partir da técnica de eletroforese bidimensional evidenciou uma grande variabilidade no perfil proteico de plasma seminal, se considerarmos diferenças raciais e individuais.

O gel referência da raça Nelore apresentou 155 spots no total, sendo que apenas quatro (23, 34, 48 e 190) estavam presentes em 100% dos géis analisados. A raça Simental apresentou um número maior de spots no gel referência (248 spots no total), sendo que apenas seis (263, 270, 284, 327, 329 e 330) foram identificados em todos os géis. Estes resultados demonstram uma maior variação no perfil proteico de plasma seminal de touros a campo,

quando comparados a dados obtidos de touros mantidos em central de inseminação artificial, estudados por Roncoletta (2003). Este autor identificou 225 spots no perfil proteico da raça Nelore, com 40 spots apresentando 100% de frequência, ou seja, presentes em todos os géis analisados. Esta diferença pode ser explicada, em parte, pela maior seleção a que foram submetidos os touros doadores de sêmen, na busca por características produtivas e reprodutivas de interesse; o que já não ocorreu com os reprodutores a campo, pois apesar de serem avaliados antes da escolha como reprodutores, os critérios de seleção são muito menos rígidos que os utilizados por centrais de inseminação artificial. Além disso, e não menos importante, tem-se o fato de que a alimentação de touros mantidos em centrais é padronizada e balanceada, ao contrário do que acontece com touros a campo, e os fatores nutricionais podem interferir na expressão das proteínas do plasma seminal. Assim, observa-se uma grande variabilidade no perfil proteico de plasma seminal de touros criados a pasto.

➤ Experimentos

- Inverno x Verão

A análise dos géis de eletroforese de touros Nelore identificou 20 spots com diferenças significativas entre amostras de inverno e de verão, dentre os quais, ao se levar em consideração os dados de VION, DP e frequência, 10 spots se destacaram.

Destes 10 spots de interesse, 09 (spot 5, 6, 23, 34, 70, 86, 134, 166 e 190) apresentaram maiores valores de VION no inverno, e apenas um spot (64) esteve em maior concentração no verão.

Já a raça Simental, dentre os 09 spots que demonstraram diferença entre os grupo de verão e inverno, apenas dois se destacaram, sendo o spot 224 mais freqüente e com maior

VION nas amostras de verão, enquanto o spot 327 apresentou 100% de frequência nos dois grupos porém maiores valores de VION no inverno.

Portanto, fica evidente que a adaptabilidade dos zebuínos, mantendo a qualidade espermática no verão em relação aos taurinos, pode ser explicada pela variação na expressão proteica das glândulas anexas do aparelho reprodutivo.

- Morfologia espermática

Nos géis da raça Nelore, 06 spots mostraram diferenças entre os grupos de morfologia espermática, mas apenas um foi considerado realmente interessante para a diferenciação dos grupos. Trata-se do spot 172, cuja frequência variou de 60 a 100% entre os grupos, aparecendo em 100% das amostras do grupo 1 (amostras com maiores porcentagens de espermatozóides morfológicamente normais). Também no grupo 1 este spot apresentou maiores valores de VION.

Para a raça Simental, foram identificados 08 spots com diferenças estatisticamente significantes, dentre os quais 04 se destacaram. Entre estes, O spot 121 foi o único que prevaleceu no grupo 1, funcionando como marcador para morfologia normal. Este spot apresentou valores intermediários de VION nos grupos 2 e 3 e esteve ausente no grupo 4, ou seja, nas amostras com altas porcentagens de defeitos espermáticos. Os outros três spots (128, 224 e 287) apresentaram valores bem maiores de VION no grupo 4 quando comparado aos outros grupos, ou seja, estão presentes em maior quantidade em amostras de touros com problemas de morfologia espermática anormal.

Estes resultados demonstram a relação entre algumas proteínas solúveis do plasma seminal e integridade morfológica dos espermatozóides.

- Defeitos maiores

Foram identificados 08 spots que apresentaram diferenças significantes entre os grupos de defeitos maiores da raça Nelore, sendo que apenas um spot mostrou-se realmente interessante para caracterização deste parâmetro. Trata-se do spot 69, que apresentou maiores valores de VION no grupo 1 (amostras com baixas porcentagens de defeitos maiores), cuja variação deveu-se à quantidade relativa entre os grupos, já que a frequência de aparecimento esteve acima de 88% em todos os grupos.

Dentre os 11 spots que demonstraram diferenças para esta característica entre os grupos da raça Simental, 04 merecem maior destaque. Dentre estes, os spots 6, 156 e 223 apresentaram maiores valores de VION para o grupo 4, e apenas o spot 327 foi encontrado em maior quantidade no grupo de menor porcentagem de defeitos maiores (grupo 2).

Avaliando-se os resultados de relação entre morfologia espermática e proteínas do plasma seminal, verificou-se que existe a possibilidade de ocorrer tal relação, entretanto a mesma deve estar associada a defeitos de morfologia que interfiram na integridade estrutural e funcional da membrana, alterando sua interação com proteínas solúveis do plasma seminal.

- Proteína total

Identificaram-se, para a raça Nelore, 21 spots com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de proteína total. Contudo, ao se analisar os resultados de VION, DP e frequência, apenas o spot 44 apresentou relação interessante com esta característica, com valores mais baixos de VION no grupo 1, ou seja, nas amostras com menores valores de proteína total no plasma seminal.

Apenas 03, dentre os 13 spots com diferenças significativas de VION entre os grupos, apresentaram resultados interessantes para a raça Simental. São eles os spots 6, 156 e 287, que comportaram-se de maneira semelhante, com maiores valores de VION para o grupo 4, ou seja, essas proteínas aparecem em maior quantidade em amostras com maiores valores de proteína total.

Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por Roncoletta (2003), que sugere que as quantidades de alguns spots interferem na quantidade de proteína total da amostra. Os spots encontrados no presente experimento, porém, foram diferentes dos observados por este autor, demonstrando mais uma vez as divergências entre a análise do perfil proteico de touros mantidos a campo e em centrais de inseminação, explicadas, conforme já foi citado anteriormente, pela maior variabilidade nutricional e genética dos touros a campo.

- Lipoperoxidação

Para a raça Nelore, 22 spots apresentaram diferença estatística entre os grupos. Destes, 04 spots (5, 7, 68 e 174) se destacaram como possíveis marcadores de diferenças entre os perfis proteicos de amostras com graus distintos de peroxidação lipídica, medida pela dosagem de TBARS. Os spots 5 e 68 apresentaram valores crescentes de VION do grupo 1 ao grupo 4, sendo, portanto, mais freqüentes em amostras com maiores níveis de TBARS, ou seja, maior lipoperoxidação. Já os spots 7 e 174 apresentaram resultados contrários aos anteriores, sendo mais freqüentes no grupo 1, que reúne as amostras com menores níveis de TBARS; assim, possivelmente tratam-se de proteínas com papel antioxidante.

No perfil da raça Simental, 18 spots demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mas apenas 2 (spots 156 e 224) com resultados interessantes. Ambos apresentaram valores crescentes de VION do grupo 1 ao grupo 4, ou seja, quanto

maior o grau de peroxidação lipídica da amostra, maiores são os valores de VION destes dois spots. Trata-se, portanto, de proteínas que interferem negativamente no sistema antioxidante para prevenção da lipoperoxidação.

Existem algumas descrições, na literatura, de proteínas presentes no plasma seminal que atuam como antioxidantes. Schöneck, Braum e Einspanier (1996), por exemplo, sugeriram que a aSFP, uma proteína de 12,9 kDa e pI 4,8 encontrada no plasma seminal, agiria como um redutor de peroxidação lipídica (estresse oxidativo) na membrana do espermatozóide, regulando o metabolismo espermático e possuindo, assim, potencial preservativo à membrana.

- *BSE-STF*

Nas amostras da raça Nelore foram identificados 15 spots com diferenças significativas entre os dois grupos (satisfatórios e insatisfatórios). Dentre estes, 06 spots (34, 64, 70, 82, 139 e 140) destacaram-se como possíveis marcadores de diferenças entre os grupos. Os spots 34, 70, 139 e 140 apareceram em maior quantidade no grupo de amostras provenientes de reprodutores potencialmente satisfatórios, ou seja, grupo 1. Seriam, portanto, spots marcadores de touros potencialmente mais férteis. Já os spots 64 e 82 comportaram-se de maneira oposta, com maiores valores de VION no grupo 2 (reprodutores insatisfatórios); assim, parecem estar relacionados à baixa fertilidade.

Já nas amostras de touros Simental somente 05 spots apresentaram diferenças estatísticas, dentre os quais 02 (spots 156 e 263) se destacaram. Ambos apresentaram 100% de frequência nos dois grupos, e maiores valores de VION para o grupo 1 (reprodutores satisfatórios), ou seja, parecem atuar como marcadores de indivíduos com potencialidade para maior fertilidade.

- BSE-2

Identificaram-se 16 spots com diferenças significativas entre as amostras classificadas nos três grupos (reprodutores superiores, satisfatórios e insatisfatórios). Destes, 06 spots destacaram-se como possíveis marcadores de diferenças entre os grupos. Os spots 70, 139, 140, 146 e 147 comportaram-se de maneira muito semelhante, com valores muito mais altos de VION no grupo 1, apontando, assim, a possibilidade de atuarem como marcadores de touros com desempenho reprodutivo superior. Já o spot 82 apresentou valores mais baixos de VION no grupo 1, atuando provavelmente de maneira contrária aos anteriores.

- BSE-3

Foram encontrados 11 spots com valores significativamente diferentes de VION entre os três grupos de amostras. Destes, 06 spots (119, 162, 163, 263, 293 e 294) destacaram-se na diferenciação dos grupos. Todos eles apresentaram comportamento bem semelhante, com valores muito maiores de VION para o grupo 1, ou seja, possivelmente atuam como marcadores para características ligadas a alto desempenho reprodutivo.

➤ Principais spots estudados

A idéia deste trabalho, ao dividir os touros de acordo com várias características relacionadas com a fertilidade masculina, era poder encontrar spots que se comportassem como marcadores bioquímicos de desempenho reprodutivo para touros criados a campo. Assim, observou-se que alguns spots apresentaram diferenças estatísticas (entre os grupos

avaliados) em mais de um experimento, o que mostra que muito provavelmente poderiam ser utilizados como marcadores.

Para a raça Nelore, os spots mais interessantes identificados no perfil de proteínas de plasma seminal foram os de número 34, 70, 139 e 140 (figura 1 – anexo 1), e para a raça Simental, os spots que mais se destacaram foram os de número 156, 224, 263 e 327 (figura 2 – anexo 1).

Através da localização dos spots nos géis, pode-se perceber que o spot 34 (16,74kDa; pI 4,90), do perfil proteico da raça Nelore, coincide com o spot 263 (18,35kDa; pI 4,88), do perfil proteico da raça Simental, além dos valores de peso molecular e ponto isoelétrico também estarem bem próximos. O spot 34 (Nelore) foi encontrado em maior quantidade no inverno e no grupo de reprodutores satisfatórios da BSE-STF, e o spot 263 (Simental) apresentou valores mais altos de VION para os grupos de reprodutores satisfatórios, na BSE-STF, e de reprodutores ótimos, na BSE-3. Assim, provavelmente trata-se de uma proteína marcadora de características ligadas ao potencial para alta fertilidade, que atuaria de forma semelhante nas duas raças.

O spot 70 (16,87kDa; pI 6,38), do perfil da raça Nelore, e o spot 156 (18,46kDa; pI 6,29), do perfil da raça Simental, também possuem localização semelhante nos géis, com peso molecular e pI bastante parecidos. Além disso, ao compará-los com o perfil obtido por Roncoletta (2003), nota-se que parece se tratar do spot identificado por este autor como spot 204 (17,4kDa; pI 6,4), que se comportou como marcador de baixa fertilidade naquele trabalho. No presente experimento, o spot 70, contrariamente, apareceu como marcador do grupo de amostras de touros satisfatórios na BST-STF e superiores na BSE-2, enquanto o spot 156, concordando com o resultado de Roncoletta (2003), apresentou maiores valores de VION nos grupos de alta porcentagem de defeitos maiores, maiores quantidades de proteína total e maiores quantidades de TBARS; mostrando, assim, estar ligado a parâmetros

relacionados ao baixo desempenho reprodutivo. Contudo, o spot 156 também apareceu com valores significativamente maiores de VION no grupo de reprodutores satisfatórios do experimento BSE-STF. Isso coloca em dúvida a possibilidade de utilização desta classificação para selecionar reprodutores bovinos, porém foi o único spot em que este tipo de discrepância ocorreu. Todos os outros tiveram comportamento compatível entre as classificações utilizadas (BSE-STF, BSE-2 e/ou BSE-3) e os outros parâmetros avaliados (proteína total, TBARS, morfologia).

Convém destacar aqui que, no perfil de reprodutores Nelore, os spots 34 e 70 apresentaram maiores valores de VION no inverno e nos grupos de maior potencial para alta fertilidade de acordo com a BSE-STF, sendo que o spot 70 ainda apareceu em maior quantidade no grupo de reprodutores superiores da BSE-2. Analisando estes dois spots, parece que o inverno coincide com a estação de melhor desempenho reprodutivo para a raça Nelore, de acordo com as avaliações de capacidade reprodutiva (BSEs). Apesar da adaptabilidade dos zebuínos ser maior que a dos taurinos, eles também podem sofrer consequências indesejáveis frente ao estresse térmico, desde que o verão seja suficientemente quente e úmido para causar um certo grau de degeneração testicular também nestes animais. Assim, mesmo os reprodutores zebuínos apresentariam maior fertilidade no período de inverno, na região Centro-oeste do Brasil. Em concordância com esta hipótese, Singleton (1974) encontrou o mesmo grau de degeneração testicular e epididimária em taurinos e zebuínos, quando o limite termorregulatório dos animais foi ultrapassado ou eliminado.

Ainda na raça Nelore, os spots 139 (PM=49,37kDa; pI 5,94) e 140 (PM=49,19kDa; pI 5,99) apresentaram o mesmo perfil tanto no experimento BSE-STF quanto no BSE-2, o que era esperado, já que as duas classificações são bastante semelhantes. Assim, estes spots seriam marcadores de características ligadas ao potencial para alta fertilidade em touros Nelore. Wolfe, Bradley e Riddell (1993) observaram o desaparecimento da banda de 49 kDa

após a insulação escrotal de bovinos de corte, confirmando assim o papel desta proteína como marcadora de bom desempenho reprodutivo.

No perfil proteico da raça Simental, o spot 327 (PM=18,66kDa; pI 4,73) apareceu com maior VION médio no inverno, estação onde os animais desta raça possuem melhor desempenho reprodutivo, e no grupo com menores porcentagens de defeitos maiores, mostrando estar relacionado com características ligadas à alta fertilidade.

O spot 224 (PM=18,63kDa; pI 4,05), marcador de características de baixa fertilidade para touros Simental, apresentou maior VION nos grupos de verão, alta porcentagem de morfologia anormal, e maiores quantidades de TBARS, mostrando uma relação bem interessante entre estes três parâmetros, conforme já foi comentado no item 5.3.

Além dos spots descritos acima, convém destacar aqui os spots 190 (perfil da raça Nelore – 17,02kDa; pI 4,98) e 287 (perfil da raça Simental – 18,59kDa; pI 4,90), que coincidem com o spot de 15,5kDa e pI 4,9, identificado como aSFP por Roncoletta (2003). Este autor não observou correlação desta proteína, quando presente no plasma seminal, com fertilidade ou congelabilidade de touros; porém, a quantificação da aSFP na membrana espermática sugeriu potencial como marcador bioquímico para predição de alto desempenho em fertilidade. Schöneck, Braum e Einspanier (1996) também sugeriram que a aSFP encontrada no plasma seminal possui funções preservativas à integridade do espermatozóide favorecendo, assim, a fertilidade de touros. No presente experimento, o spot 190 apareceu em maior quantidade no grupo de inverno, na raça Nelore, e o spot 287 apresentou maior VION nos grupos de alta porcentagem de espermatozóides morfológicamente anormais e maior quantidade de proteína total, na raça Simental; mostrando, assim, algumas discrepâncias frente aos resultados obtidos por outros autores.

Após o estudo dos resultados obtidos neste trabalho, surge a necessidade de pesquisar mais precisamente os spots que demonstraram potencial como marcadores de características

de interesse para o desempenho reprodutivo. Para tanto, existem várias técnicas, como o imunobloting, o seqüenciamento de aminoácidos do N-terminal e a espectrometria de massa, que permitem a identificação de proteínas, além de se fazerem necessários estudos sobre a localização destas proteínas no trato reprodutivo e pesquisas sobre as funções que elas exercem.

Existem muitas razões pelas quais utiliza-se testes laboratoriais da qualidade seminal, na tentativa de prever a fertilidade de bovinos. Estas incluem exames da capacidade reprodutiva, seleção de ejaculados para criopreservação, descarte de sêmen criopreservado, e identificação de causas de subfertilidade (AMANN, 1995). Nos rebanhos de corte criados em sistema de acasalamento múltiplo e condições extensivas, as dificuldades de obter informações individualizadas do desempenho de cada touro levam, muitas vezes, à utilização de animais inférteis ou subférteis, resultando em grandes perdas econômicas para os criadores. Assim, cada vez mais torna-se importante a busca de testes mais precisos para a predição de fertilidade, entre os quais podemos incluir a eletroforese bidimensional de proteínas de plasma seminal. Sabe-se que estes testes não serão utilizados como rotina na avaliação seminal de reprodutores de corte, mas seu principal mérito consiste em possibilitarem um estudo bastante aprofundado da fisiologia e patologia reprodutivas destes animais, e no caso do presente trabalho, demonstrando a realidade da maior parte dos rebanhos de corte brasileiros. Só conhecendo muito bem o funcionamento do sistema reprodutivo e todos os fatores que o influenciam, pode-se buscar alternativas e soluções adequadas para a resolução dos problemas que ainda afligem a pecuária nacional.

6 CONCLUSÕES

- Não houve diferença entre os valores de motilidade progressiva retilínea entre as raças (Nelore e Simental) e as estações do ano (inverno e verão) estudadas.
- Os animais da raça Nelore apresentaram maior perímetro escrotal no inverno.
- Os animais da raça Simental apresentaram maior perímetro escrotal em comparação aos da raça Nelore, tanto no inverno quanto no verão.
- Os touros da raça Nelore apresentaram valores mais altos de porcentagem de defeitos totais no verão. Não houve diferença entre as porcentagens de defeitos maiores das amostras de inverno e verão, para a raça Nelore.
- Os animais da raça Simental não apresentaram diferenças entre os valores de morfologia espermática nas duas estações do ano (inverno e verão).
- No período de inverno, não houve diferença entre os valores de morfologia espermática das raças Nelore e Simental. No verão, os touros da raça Simental apresentaram valores mais altos de defeitos espermáticos maiores.
- Não foi encontrada diferença entre os valores de proteína total no plasma seminal, no inverno e no verão, para a raça Nelore.
- Os animais da raça Simental apresentaram valores maiores de proteína total no plasma seminal no período de verão em relação ao inverno.
- Não foi encontrada diferença entre os valores de TBARS no plasma seminal, no inverno e no verão, para a raça Nelore.
- Os animais da raça Simental apresentaram valores maiores de TBARS no plasma seminal no período de verão em relação ao inverno.

- No verão, os animais da raça Simental apresentaram valores maiores de TBARS no plasma seminal que os da raça Nelore.
- O perfil de proteínas de plasma seminal da raça Simental demonstrou quantidade maior de spots que o da raça Nelore, e a variabilidade individual ao realizar o pareamento de spots nas duas raças foi muito acentuada.
- O perfil eletroforético bidimensional de plasma seminal demonstrou diferença de 09 spots (5, 6, 23, 34, 64, 70, 86, 134, 166 e 190) entre os períodos de inverno e verão, para a raça Nelore. Já para a raça Simental, apenas 02 spots (224 e 327) apresentaram diferenças entre as estações do ano estudadas.
- O spot 172, na raça Nelore, e os spots 121, 128, 224 e 287, na raça Simental, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de morfologia espermática normal.
- O spot 69, na raça Nelore, e os spots 6, 156, 223 e 327, na raça Simental, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de defeitos maiores.
- O spot 44, na raça Nelore, e os spots 6, 156 e 287, na raça Simental, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de proteína total no plasma seminal.
- Os spots 5, 7, 68 e 174, na raça Nelore, e os spots 156 e 224, na raça Simental, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de lipoperoxidação no plasma seminal.
- Os spots 34, 64, 70, 82, 139 e 140, na raça Nelore, e os spots 156 e 224, na raça Simental, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de reprodutores classificados como satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-STF.
- Os spots 70, 139, 140, 146 e 147, na raça Nelore, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de reprodutores classificados como superiores, satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-2.

- Os spots 119, 162, 163, 263, 293 e 294, na raça Simental, demonstraram diferenças interessantes entre os grupos de reprodutores classificados como ótimos, satisfatórios e insatisfatórios, segundo a BSE-3.
- Ao analisar todos os experimentos em conjunto, verificou-se que os spots 34, 70, 139 e 140 demonstraram maior potencial como marcadores de características de interesse para desempenho reprodutivo, na raça Nelore.
- Ao analisar todos os experimentos em conjunto, verificou-se que os spots 156, 224, 263 e 327 demonstraram maior potencial como marcadores de características de interesse para desempenho reprodutivo, na raça Simental.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **Journal of Urology**, v. 152, p. 107-110, 1994.

AGARWAL, Y. P.; VANHA-PERTTULA, T. Glutathione, L-Glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. **International Journal of Andrology**, v. 11, p. 123-131, 1988.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 459-469, 1987a.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Generation of reactive oxygen species by human spermatozoa. In: DROMANDY, T.; RICE-EVANS, C. (Ed.). **Free radicals: recent developments in lipid chemistry, experimental pathology and medicine**. Londres: Richelieu Press, 1987b. p. 333-335.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183-197, 1989.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; HARGREAVE, T. B.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 214-220, 1989.

AITKEN, R. J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993a.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993b.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D.S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, p. 542-551, 1991.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; MOLAN, P. C. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects motility of bull sperm. **Reproduction Fertility and Development**, v. 6, p. 165-171, 1994a.

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Anionic and Cationic components from protein aggregates in Bovine Seminal Plasma and their effects on sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 328-336, 1994b.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

AMANN, R.P. Evaluation of sperm quality: Can we pick the winners? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.206-212.

AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p.191-200, 1991.

AYYAGARI, R. R.; FAZLEABAS, A. T.; DAWOOD, M. Y. Seminal plasma proteins of fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 157, n. 6, p. 1528-1533, 1987.

BALL, L.; OTT, R. S.; MORTIMER, R. G. Manual for breeding soundness examination of bulls. **Theriogenology**, v. 12, p. 1-65, 1983.

BARBOSA, P. F. Critérios de seleção para a raça Canchim. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 3., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA, 1997. p. 47-75.

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1531-1537, 2000.

BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHAND, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of Heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

BELLVE, A. R. Viability and survival of mouse embryos following paternal exposure to high temperature. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 71-81, 1972.

BENTLEY, L. G.; ANSAH, G. A.; BUCKLAND, R. B. Seminal plasma proteins from a line of chickens selected for fertility of frozen-thawed semen and control line. **Poultry Science**, v. 63, p. 1444-1445, 1984.

BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHERO, G.; CORDOBA, M.; BECONI, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v. 29, p. 37-42, 1997.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRACALE, A.; SPALLETTI-CERNIA, D.; MASTRONICOLA, M.; CASTALDI, F.; MANNUCCI, R.; NITSCH, L.; D'ALESSIO, G. Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal Ribonuclease. **Biochemical Journal**, v. 362, p. 553-560, 2002.

BRAHMKSHTRI, B. P.; EDWIN, M. J.; JOHN, M. C.; NAINAR, A. M.; KRISHNAN, A. R. Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 159-168, 1999.

BRANDON, C. I.; HEUSNER, G. L.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, 52, p. 863-873, 1999.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A. G.; KASTELIC, J. P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 181-190, 2002.

BROWN, L. F.; BERSE, B.; VAN DER WATER, L.; PAPADOPOLUS-SERGIOU A.; PERRUZI, C. A.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, H. F.; SENGGER, D.R. Expression and distribution osteopontin in human tissues: widespread with luminal epithelial surfaces. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3, p. 1169-1180, 1992.

BRUNER, K. A.; McCRAW, R. L.; WHITACRE, M. D.; VAN CAMP, S. D. Breeding soundness examination of 1952 yearling beef bulls in North Carolina. **Theriogenology**, v. 44, p. 129-145, 1995.

CALVETE, J.; VARELA, P.; SANZ, L.; ROMERO, A.; MANN, K.; TOPFER-PETERSEN, E. A procedure for large-scale isolation of major seminal plasma proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 8, p. 48-56, 1996.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-Kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1293-1301, 1997.

CARTWRIGHT, T. C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **Journal of Animal Science**, v. 14, p. 350-362, 1955.

CASADY, R. B.; MYERS, R. M.; LEGATES, J. E. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 14-23, 1953.

CAVALIERI, J.; VAN CHAMP, S. D. Bovine seminal vesiculitis. A review and update. Review. **Veterinary Clinical North Am Food Animal Practice**, v. 13, p. 233-241, 1997.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, p. 221-231, 1999.

CHANDOLIA, R. K.; REINERTSEN, E. M.; HANSEN, P. J. Short communication: lack of breed differences in response of bovine spermatozoa to heat shock. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2617-2619, 1999.

CHEMINEAU, P. Medio ambiente y reproduccion animal. **Revue Mondiale de Zootechnie**, v. 77, p. 2-14, 1993/4. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v1650t/v1650T04.html>>. Acesso em: 2 fev. 2003.

CHENOWETH, P. J.; CHASE JR., C. C.; THATCHER, M.J. D.; WILCOX, C. J.; LARSEN, R. E. Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida. **Theriogenology**, v. 46, p. 1159-1170, 1996.

CHENOWETH, P. J.; HOPKINS, F. M.; SPITZER, J. C.; LARSEN, R. E. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. **Theriogenology Handbook**, p. B-10, 1993.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v. 41, p. 653-667, 1994.

COULTER, G. H.; KOZUB, G. C. Efficacy of methods used to test fertility of beef bulls used for multiple-sire breeding under range conditions. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 1757-1766, 1989.

CRAIG, A. M.; DENHART, D. T. The murine gene encoding secreted phospho-protein1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. **Gene**, v. 100, p. 163-171, 1991.

D'ALESSIO, G.; DIDONATO, A.; PARENTE, A.; PICCOLI, R. Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. **TIBS**, v. 16, p. 104-106, 1991.

D'ALESSIO, G.; FLORIDI, A.; DE PRISCO, R.; PIGNERO, A.; LEONE, E. Bull semen ribonucleases. 1. Purification and physico-chemical properties of the major component. **European Journal of Biochemistry**, v. 26, p. 153-161, 1972.

DE LAMIRANDE, E.; EILEY D.; GAGNON, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 258-266, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 255-265, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction** v. 10, n. 1, p. 15-21, 1995.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149-10155, 1992.

DESNOYERS, L.; THÉRIEN I.; MANJUNATH, P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 425-435, 1994.

DHAMI, A. J.; KODAGALI, S. B. Correlation between biochemical and enzymatic constituents of semen from Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 57, n. 12, p. 1283-1286, 1986.

EINSPANIER, R.; EINSPANIER, A.; WEMPE, F.; SCHEIT, K. H. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, v. 179, n. 2, p. 1006-1010, 1991.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n. 1, p. 17-22, 1999.

ESCH, F. S.; LING, N. C.; BÖHLEN, P.; YING, S. Y.; GUILLEMIN, R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, v. 113, n. 3, p. 861-867, 1983.

ESTAÇÃO AGROCLIMATOLÓGICA DA EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE (EMBRAPA - CPAO). **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <mnichi@usp.br> em 7 jan. 2003.

FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979.

FIELDS, M. J.; HENTGES JR., J. F.; CORNELISSE, K. W. Aspects of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. **Theriogenology**, v. 18, p. 17-31, 1982.

FINCH, V. A. Heat as a stress factor in herbivores under tropical conditions. In: GILCHRIST, F. M. C.; MACKIE, R. I. **Herbivore nutrition in the subtropics and tropics**. Craighall, South Africa: The Science Press, 1984. p. 89-104.

FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; MILLER, R. G.; HOLROYD, R. G. Bull selection and use in the northern Australia – Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 39-49, 2002.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 119-139, 2003.

FOUCHÉCOURT, S.; CHARPIGNY, G.; REINAUD, P.; DUMONT, P.; DACHEUX, J. Mammalian lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 458-467, 2002.

FRAZER, G. S.; BUCCI, D. M. SDS-PAGE characterization of the proteins in equine seminal plasma. **Theriogenology**, v. 46, p. 579-591, 1996.

FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 308-313, 2002.

GARCIA, M. A.; GRAHAM, E. F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v. 24, p. 446-454, 1987.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.

GERENA, R. L.; EGUCHI, N.; URADE, Y.; KILLIAN, G. J. Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the adult murine testis and epididymis. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 848-854, 2000a.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; EGUCHI, N.; URADE, Y.; KILLIAN, G. J. Immunocytochemical localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 547-556, 2000b.

GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ALVAREZ, J. G.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 81-94, 1998.

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P.; LE LANNOU, D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 300-307, 1994.

HALL, J. C.; KILLIAN, G. J. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of rat sperm membrane interaction with cauda epididymal fluid. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 64-76, 1989.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 543.

HAMMERSTEDT, R. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 77, 1996.

HAO, Z.; WOLKOWICZ, M. J.; SHETTY, J.; KLOTZ, K.; BOLLING, L.; SEN, B.; WESTBROOK, V. A.; COONROD, S.; FLICKINGER, C.; HERR, J. C. SAMP32, a testis-specific, isoantigenic sperm acrosomal membrane-associated protein. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 735-744, 2002.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 199-204, 1996.

HIGDON, H. L.; SPITZER, J. C.; HOPKINS, F. M.; BRIDGES JR, W. C. Outcomes of breeding soundness evaluation of 2892 yearling bulls subjected to different classifications systems. **Theriogenology**, v. 53, p. 1321-1332, 2000.

HOLROYD, R. G.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; VANKAN, D. M.; FITZPATRICK, L. A.; JAYAWARDHANA, G. A.; MILLER, R. G. Bull selection and use in northern Australia – Part 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 67-79, 2002.

HOLROYD, R. G.; ENTWISTLE, K. W.; O'ROURKE, P.K.; FORDYCE, G. Reproductive traits and mating outcomes of *Bos indicus* bulls in northern Australia. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL REPRODUCTION, 7., 1993, Edmonton. **Proceedings...** p. 44-45 [Abstract 23].

HYNES, R. O. Integrins: A family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, p. 549-554, 1987.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 409-416, 1992.

JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America – Equine Practice**, n. 8, p. 129-148, 1992.

JOHNSON, W. H. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America**, v. 13, p. 255-270, 1997.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H. Scrotal/testicular thermoregulation in bulls. In: CHENOWETH, P.J. **Topics in Bull Fertility**. Last updated: 21 June 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 20 set. 2003.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, p. 935-942, 1996.

KENNEDY, S. P.; SPITZER, J. C.; HOPKINS, F. M.; HIGDON, H. L.; BRIDGES JR., W. C. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. **Theriogenology**, v. 58, p. 947-961, 2002.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. E. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, n. 49, p. 1202-1207, 1993.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effects of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 151-157, 1996.

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, v. 3, p. 13-15, 1981.

LANE, M. E.; THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1690-1675, 1999.

LOBREIRO, J. C. T.; MACIEL, A. S. Propostas de tabela para avaliar a aptidão fecundante de Nelores criados em regime extensivo no Centro-oeste brasileiro. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987. **Resumos...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 86-87.

LOWRY Determination of protein with the Follin Phenol Reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 192, p. 265, 1951.

LUNEC, J. Oxygen radicals: their measurement in vivo. **Analytical Proceedings**, v. 26, p. 130-131, 1989.

MANCHEÑO, J. M.; GASSET, M.; OÑADERRA, M.; GAVINALES, J. G.; D'ALESSIO, G. Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 199, n. 1, p. 119-124, 1994.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3) from bovine seminal plasma. **Biochemical Journal**, v. 241, p. 685- 692, 1987.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27-37, 1994.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENÁRD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; BAILLARGEON, L.; ROBERTS, K. D. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 75-81, 1993a.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 27-37, 1993b.

MARCHINI, M.; AMORETTI, M.; GIUNTA, A.M.; PIFFARETTI-YANES, A.; MEDICI, G.; BALERNA, M. Eletrophoretical patterns of seminal plasma proteins in patients with cystic fibrosis. **Fertility and Sterility**, v. 53, n. 3, p. 541-545, 1990.

MATHEVON, M.; BUHR, M. M.; DEKKERS, J. C. M. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3321-3330, 1998.

MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; MARCHESINI, M.; RONCONI, C.; DONDERO, F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 862-868, 1994.

MIES FILHO, A. M.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; WALD, V. B.; GIRÃO, R. N. Proposição de normas ao exame andrológico de Bos taurus. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 21-24, 1982.

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

MOORE, H. D. M., HIBBIT, K. C. S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 46, p. 71, 1976.

MORGENTALER, A.; SCHOPPERLE, W. M.; CROCKER, R. H.; WOLF, W. C. Protein differences between normal and oligospermic human sperm demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis. **Fertility and Sterility**, v. 54, n. 5, p. 902-905, 1990.

MOUSTAFA, A. R.; MESZAUROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of the spermatozoa after freezing-and-thawing. **Acta Vet. Acad. Sci. Hung.**, v. 28, n. 4, p. 403-408, 1981.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for Bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A-2, BSP-A3 and BSP-30kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados/MS**. 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

NOLAND, T. D.; OLSON, G. E.; BARBERG, D. L. Protein phosphorylation of plasma membranes from bovine epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 185-194, 1984.

O'FARREL, P. H. High Resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

O'FLAHERTY, C. M.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269-275, 1997.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e mestiços criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 31-35, 1988.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLLERO, M.; BESCOS, O.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MIIÑO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriogenology**, v. 49, p. 547-555, 1998.

OLLERO, M.; GIL-GUZMAN, E.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVERSON, D.; THOMAS JR., A. J.; ALVAREZ, J. G. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1912-1921, 2001.

PANGAWKAR, G. R.; SHARMA, R. D.; SINGH, R. Protein, sialic acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 65, p. 58-60, 1988.

PARKINSON, T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: Correlations with environmental temperature. **Veterinary Record**, v. 16, p. 479-482, 1987.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.

RAO, B.; SOUFIR, J. C.; MARTIN, M.; DAVID, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, v. 24, p. 127-134, 1989.

REDDY, J. M.; STARK, R. A.; ZANEVELD, L. J. D. A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 437-446, 1979.

RHEMREV, J. P. T.; VERMEIDEN, J. P. W.; HAENEN, G. R. M. M.; DE BRUIJNE, J. J.; REKERS-MOMBARG, L. T. M.; BAST, A. Progressively motile human spermatozoa are well protected against *in vitro* lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, v. 33, p. 151-158, 2001.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEI, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease

oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.

RODRIGUEZ, C. M.; JONATHAN R. D.; KILLIAN, G. J. Osteopontin gene expression in the Holstein Bull Reproductive Tract. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 414-420, 2000.

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

RONCOLETTA, M. **Perfil em SDS-PAGE das proteínas de membrana de espermatozóides e plasma seminal correlacionados com a congelabilidade do sêmen de touros**. 1999. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; OLIVEIRA, M. A.; FRANCESCHINI, P. H.; RAMOS, P. R. R. Comparação do perfil proteico de membrana de espermatozóides do sêmen fresco, diluído e pós-congelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 226-228, 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; FRANCESCHINI, P. H. 14kDa seminal plasma protein identification and its relation with bull semen freezeability. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 479, 2002.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; FRANCESCHINI, P. H.; RAMOS, P. R. R. Caracterização da proteínas 26kDa no plasma seminal e sua relação coma congelabilidade do sêmen de touros. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRRS**, v., p., 2000.

RUSSEL, L. D.; PETERSON, R. N.; RUSSEL, T. A.; HUNT, W. An electrophoretic map of boar sperm plasma membrane polypeptides and localization and fractionation of specific polypeptides subclasses. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 393-413, 1983.

SAACKE, R. G; NADIR, S.; DALTON, J.; BAME, J.; DEJARNETTE, D. S.; NEBEL, R. L. Accessory sperm evaluation and bull fertility – An update. In: TECHNICAL CONFERENCE ON AI AND REPRODUCTION, 15.,1994, Columbia. **Proceedings...** p.57.

SAS. **The statistical analyze systems for Windows**. V8. Cary, 1999-2001.

SCHEIT, K. H. The major basic protein of bull seminal vesicle secretion. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v. 337, n. 3, p. 229-233, 1986.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, p. 633-642, 1996.

SEIDAH, N. G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J.; SAIRAM, M. R.; CHRÉTIEN, M. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and the collagen-binding domain of fibronectin. **Biochemical Journal**, v. 243, p. 195-203, 1987.

SENGER, D. R.; PERRUZI, C. A.; PAPADOPOULOS, A.; TENEN, D. G. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phospholipoproteins and osteopontin. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 996, p. 43-48, 1989.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.

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

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SHIVAGI, S.; RUKMINI, V.; GUPTA, P. D.; BHARGAVA, P. M. Localization of bovine seminal plasma RNA-A BS1, on the surface of bovine spermatozoa. **Cell Molecular Biology**, v. 3, n. 35, p. 285-291, 1989.

SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 43, p. 192-197, 1998.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; PORTO, J. A. Efeito da estacionalidade nas características testiculares e espermáticas de touros Nelore e mestiços. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., Belo Horizonte, 1987. **Resumos...** Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p.55.

SINGLETON, E. F. **The effect of heat on reproductive function in the bull**. Ph.D. Thesis, University of Queensland, 1974.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, p. 1784, 1966.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 283-293, 1984.

SODERQÜIST, L.; JASON, L.; HÅÅRD, M.; EINARSSON, S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A. I. bulls. **Animal Reproduction Science**, n. 44, p. 91-98, 1996.

SORRENTINO, C.; SILVESTRINI, B.; BRAGHIROLI, L.; CHUNG, S. S. W.; GAICOMELLI, S.; LEONE, M.; XIE, Y.; SUI, Y.; MO, M.; CHENG, Y. Rat prostaglandin D2 synthase: its tissue distribution, changes during maturation, and regulation in the testis and epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 843-853, 1998.

SPITZER, J. C. Bull Breeding Soundness Evaluation: Current Status. In: CHENOWETH, P. J. **Topics in bull fertility**. Last updated: 16 Oct. 2000. Disponível em: <<http://www.avis.org>>. Acesso em: 20 set. 2003.

SWINSCOW, T. D. V.; CAMPBELL, M. J. **Statistics at square one**, 9th ed., BMJ Publishing Group, 1997.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and High-density Lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by High-density Lipoprotein. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

TOKUGAWA, Y.; KUNISHIGE, I.; KUBOTA, Y.; SHIMOYA, K.; NOBUNAGA, T.; KIMURA, T.; SAJI, F.; MURATA, Y.; EGUCHI, N.; ODA, H.; URADE, Y.; HAYASHI, O. Lipocalin-type prostaglandin D synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 600-607, 1998.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 1201-1205, 1980.

URADE, Y.; HAYASHI; Prostaglandin D synthase: structure and function. **Vitamins and Hormones**, v. 58, p. 89-120, 2000.

VERNET, P.; FULTON, N.; WALLACE, C.; AITKEN, R. J. Analysis of plasma membrane redox system in rat epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1102-1113, 2001.

VESCIA, S.; TRAMONTANO, D. Antitumoral action os bovine seminal ribonuclease. **Mol. Cell Biochem.**, v. 36, p. 125-128, 1981.

VOGLER, C. J.; BAME, J. H.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207-1219, 1993.

WEMPE, F.; EINSPANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acid seminal plasma. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, v. 183, n. 1, p. 232-237, 1992.

WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K. W. Spermiogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls after scrotal insulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 69, p. 711-716, 1983.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction**. 4^a ed. Cambridge: University Press, 1999. 130 p.

XU, C.; RIGNEY, D. R.; ANDERSON, D. J. Two dimensional electrophoretic profile of human sperm membrane proteins. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 6, p. 595-602, 1994.

ZABLUDOVSKY, N.; ELTES, F.; GEVA, E.; BERKOVITZ, E.; AMIT, A.; BARAK, Y.; HAR-EVEN, D.; BARTOOV, B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. **Andrologia**, v. 31, p. 91-98, 1999.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M. G. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 253-260, 1999.

ANEXO A – DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL (MÉTODO DE LOWRY, 1951)

Princípio: em uma solução alcalina, forma-se um complexo entre proteína e cobre. Este complexo reduz o reagente “phosphomolybolic – phosphotungstic” (Folin Reagent), formando um composto colorido que é mensurado fotometricamente.

Reagentes:

- 1) 0,1 N NaOH (0,4g NaOH / 100 mL ddH₂O) – estoque
- 2) 2% Na₂CO₃ (Na Carbonate – 10g) e 0,02% Na₂C₄H₄O₆ (Na tartrate – 0,01g) em 0,1 N NaOH (500 mL) – reagente 2 (estoque)
- 3) 0,5% CuSO₄ x 5H₂O (0,5g / 100 mL ddH₂O) – reagente 3 (estoque)
- 4) Alkaline Cooper Reagent (fazer na hora do uso): misturar 100 mL do reagente 2 com 2 mL do reagente 3.
- 5) Diluted Folin Reagent (preparar na hora do uso): diluir Folin Reagent (Sigma F-4252, mantido sob refrigeração) 1:1 com ddH₂O.
- 6) Solução padrão de proteína (mantida sob refrigeração): 1,0 mg Bovine serum albumin (BSA) / mL de 0,1 N NaOH (0,1g / 100 mL 0,1 N NaOH).

Procedimentos:

- Preparar um “branco” e padrões de BSA em duplicata:

AMOSTRAS PADRÃO	BSA (1 mg / mL)	0,1 N NaOH
“blank”	-	1,00 mL
10 µL	0,01 mL	0,99 mL
50 µL	0,05 mL	0,95 mL
100 µL	0,10 mL	0,90 mL
200 µL	0,20 mL	0,80 mL
400 µL	0,40 mL	0,60 mL
600 µL*	0,60 mL	0,40 mL

* Fazer o padrão de 600 µL para as amostras de plasma seminal, pois a quantidade de proteína é maior.

- Preparar as amostras: colocar 990 μL de 0,1 N NaOH e adicionar 10 μL de cada amostra;
- Adicionar 5,0 mL do Alkaline Cooper Reagent a cada tubo e fazer o vortex imediatamente (ou misture bem ao pipetar). Deixar descansar à temperatura ambiente por 10 minutos ou mais;
- Adicionar 0,5 mL do Diluted Folin Reagent rapidamente. Misturar imediatamente com o vortex (o reagente de Folin é reativo por pouco tempo neste pH);
- Ligar o espectrofotômetro, para ir aquecendo até o momento da leitura;
- Deixar por 30 minutos à temperatura ambiente e ler a absorbância dos padrões e das amostras no espectrofotômetro, contra um “blank”, a 660 nm. Para lipoproteínas, ler a 750 nm;
- Através dos valores de absorbância obtidos, calcular a concentração da amostra, em μg de proteína / mL.

ANEXO B – PREPARO DOS GÉIS SDS

Soluções:

- SDS 10%
- DALT Acrylamide Stock
- 1,5 M Tris HCl pH 8,8
- 10% Persulfato de amônio (preparar no momento do uso)
- 10% TEMED (preparar no momento do uso)
- Solução de água saturada em Butanol
- Displacing solution
- Gel storage solution

Preparo do GEL CASTER:

- Colocar o GEL CASTER em local nivelado e dentro de uma bandeja;
- Retirar a tampa;
- Lubrificar a borracha vedante com graxa de silicone ou vaselina sólida;
- Colocar os filtros triangulares no local adequado;
- Acondicionar primeiro as placas de acrílico, sempre separadas pelas folhas de acetato;
- Colocar as placas dos *slab gels*, contendo já o papel de identificação do gel (sempre do lado esquerdo do gel, perto do silicone);
- Completar até a superfície, colocar a tampa e parafusar;
- Colocar o tubo no furo do sistema de alimentação.

Preparo de SLAB GEL HOMOGÊNEO:

- Preparar o volume necessário de solução (ver item 2.4.) e água saturada em Butanol (cerca de 0,75 mL para cada gel);
- Preparar cerca de 200 mL de Displacing Solution e colocar 150 mL da solução no *container*;
- Preparar o Persulfato de Amônio 10% e o Temed 10%, agitar manualmente e deixar sob refrigeração até o momento do uso;
- Despejar a solução, com o auxílio de um funil, no sistema de alimentação do GEL CASTER;

- Quando faltar pouco espaço para a solução preencher as placas, desconectar o funil do sistema de alimentação, deixando escorrer a Displacing solution, até preencher o sulco no fundo do GEL CASTER;
- Colocar cerca de 0,75 mL de solução de água saturada em Butanol em cada placa, para dissolver as bolhas;
- Aguardar a polimerização (cerca de 2 a 3 horas);
- Retirar as placas e lavar o Butanol;
- Estocar as placas imersas em Gel Storage solution, sob refrigeração, por até 30 dias.

Soluções para a confecção de 23 géis SDS homogêneos, com 1,5mm de espessura, para corrida eletroforética bidimensional de proteína de plasma seminal (17% de acrilamida):

SOLUÇÕES	VOLUME (em mL)
	17% (Plasma Seminal)
Acrylamide Stock	1020
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	450
Água	292
10% SDS	18
10% Persulfato de amônio	18
10% TEMED	1,82
TOTAL	1800

ANEXO C – ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA (2D-PAGE) – MÉTODO DE O’FARRELL (1975) MODIFICADO

PROTOCOLO DE IEF – IPG STRIP (PRIMEIRA DIMENSÃO)

Rehidratação das IPG strips

Amostras: dosagem de proteína total fornece a quantidade de amostra, em mL, a ser colocada para se ter 50 ou 100 µg de proteína por strip (padronização).

Soluções:

- Rehydration Stock Solution without IPG buffer (estoque aliquotado em 2,5 mL e congelado a -20°C)
- IPG Buffer – pH 4-7 para plasma seminal e pH 3-10NL para membrana espermática (mantido sob refrigeração)
- IPG Cover Fluid

Passos:

- Descongelar vagorosamente as amostras e a Rehydration Stock Solution (à temperatura ambiente);
- Calcular o volume necessário de Rehydration Stock Solution: 350 µL / strip 18 cm;
- Adicionar DTT – 7 mg / 2,5 mL de solução;
- Adicionar IPG buffer (pH 4-7 para plasma ou 3-10NL para membrana) – 50µL / 2,5 mL de solução (2%);
- Completar o volume para 350 µL com Rehydration stock solution, já adicionada de DTT e IPG Buffer;
- Colocar a bandeja de re-hidratação em local nivelado;
- Colocar lentamente, no meio de cada poço da bandeja, os 350 µL de Rehydration Stock solution + DTT + IPG Buffer (cuidado para não formar bolhas);
- Retirar os strips do freezer;

- Retirar o adesivo de proteção dos strips – utilizar pinças para manuseio dos mesmos;
- Posicionar cada strip sobre o poço e abaixá-lo lentamente para deixar o líquido ir escorrendo e completando todo o strip, tomando cuidado com a formação de bolhas;
- Cobrir os strips com 1,5 a 3 mL de IPG Cover Fluid por strip;
- Tampar a bandeja;
- Tempo de re-hidratação : overnight (mínimo de 10 horas), em temperatura ambiente (25°C) – Manter o ar condicionado ligado em épocas quentes.

Montagem do Kit

- Colocar a cooling plate na cuba;
- Ligar a circulação de água;
- Banho circulador deve manter a água a 15°C;
- Colocar 10 mL de IPG Cover Fluid sobre o cooling plate;
- Colocar a bandeja do Immobiline DryStrip, mantendo a posição correta dos eletrodos e removendo o máximo de bolhas possíveis;
- Colocar 15 mL de IPG Cover Fluid na bandeja e remover bolhas;
- Colocar o alinhador dos strips dentro da bandeja e remover bolhas;
- Cortar fitas de IEF eletrodos (papel de filtro) – 11 cm x 0,5 cm;
- Embeber os eletrodos em água MilliQ – retirar o excesso de água (opcional: pode-se embeber outra fita em DTT 20 mM e colocar por cima, visando melhorar a focalização);
- Remover os strips da bandeja de re-hidratação, lavá-los em água MilliQ e escorrer em papel de filtro (com os strips em pé);
- Posicionar os strips dentro do alinhador, colocando a ponta cortada do strip no eletrodo vermelho (anodo / ácido);
- Colocar as fitas de eletrodos sobre as pontas dos strips, posicionar os adaptadores de eletrodos e conectar os cabos;
- Colocar 70ml de IPG Cover Fluid sobre os strips;
- Colocar os aplicadores, e 150 µL de IPG Cover Fluid em cada;
- Aplicar a amostra em 100 µL de Rehydration Stock solution + DTT + IPG Buffer;
- Tampar a cuba;
- Ligar a fonte.

- Corrida:
 - Step 01 – 500V 2mA 5W 1' – Vh recomendado 1
 - Step 02 – 3500V 2mA 5W 1:30h – Vh recomendado 3000
(gradiente de voltagem)
 - Step 03 – 3500V 2mA 5W 6:20h – Vh recomendado 17000-22000
 - Total: 7:50h – Vh recomendado 20000-25000

PROTOCOLO DE SDS – PAGE (SEGUNDA DIMENSÃO)

Soluções:

- SDS Equilibration Buffer
- Urea
- Glicerol
- DTT
- Agarose Sealing solution

Passos:

Equilíbrio dos IPG strips (após a IEF):

- Descongelar o SDS Equilibration Buffer – volume necessário = 2,5 mL / strip, quando o equilíbrio for realizado na bandeja de re-hidratação dos strips;
- Adicionar 100 mg de DTT para cada 10 mL de SDS Equilibration Buffer;
- Acondicionar os strips dentro da bandeja;
- Colocar o SDS Equilibration Buffer + DTT;
- Manter por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Após o equilíbrio, colocar os strips imediatamente nos slab gels.

Preparo dos slab gels para a corrida em segunda dimensão (SDS-PAGE):

- Colocar os slab gels em suporte;

- Colocar o marcador de peso molecular – dissolver em tampão de amostra, aplicar a solução do marcador em um pedaço de papel filtro (1,0 x 0,5 cm), embeber em Agarose sealing solution e colocar sobre a extremidade superior esquerda de cada gel;
- Posicionar os strips sobre os géis;
- Despejar 2,5 mL de Agarose sealing solution, evitando formar bolhas;
- Aguardar solidificar – 2-5 minutos;
- Colocar os géis no DALT Tank (silicone p/ baixo);
- Verificar se o volume de tampão na cuba está cobrindo até a metade do espaçador superior;
- Fechar o DALT Tank e ligar os cabos;
- Corrida: 100V – overnight.

ANEXO D – SOLUÇÕES

Rehydration Stock Solution without IPG Buffer

	Concentração Final	Quantidade
Uréia	8 M	12 g
CHAPS	2%	0,5 g
Azul de bromofenol	traços	poucos grãos
ddH ₂ O		até 25 mL

Armazenar em alíquotas de 2,5 mL a -20 °C.

SDS Equilibration Buffer

	Concentração Final	Quantidade
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	50 mM	6,7 mL
Uréia	6 M	72,07 g
Glicerol	30%	69 mL
SDS	2%	4,0 g
Azul de bromofenol	Traços	poucos grãos
ddH ₂ O		até 200 mL

Armazenar em alíquotas de 40 mL a -20 °C.

Monomer Stock Solution

	Concentração Final	Quantidade
Acrilamida	30%	60 g
N,N'-metilenebisacrilamida	2%	0,5 g
ddH ₂ O		até 200 mL

Filtrar a solução com um filtro de 0,45 µm.

Armazenar a 4 °C, protegida da luz.

4X Resolving Gel Buffer

	Concentração Final	Quantidade
Tris base	1,5 M	181,5 g
DdH ₂ O		750 mL
HCl		ajustar p/ pH 8,8
DdH ₂ O		Até 1000 mL

Filtrar a solução com um filtro de 0,45 μ m.

Armazenar a 4 °C.

10% SDS

	Concentração Final	Quantidade
SDS	10%	5,0 g
DdH ₂ O		até 50 mL

Filtrar a solução com um filtro de 0,45 μ m.

Armazenar à temperatura ambiente.

Persulfato de amônio 10%

	Concentração Final	Quantidade
Persulfato de amônio	10%	0,1 g
DdH ₂ O		até 1,0 mL

Preparar no momento do uso.

Gel Storage Solution

	Concentração Final	Quantidade
4X Resolving gel buffer (sol. 4.4)	1X	50 mL
10% SDS (sol. 4.5)	0,1%	2 mL
ddH ₂ O		até 200 mL

Armazenar a 4 °C.

SDS Electrophoresis Buffer

	Concentração Final	Quantidade
Tris base	25 mM	15,1 g
Glicina	192 mM	72,1 g
SDS	0,1%	5,0 g
ddH ₂ O		até 5000 mL

Armazenar à temperatura ambiente.

Agarose Sealing Solution

	Concentração Final	Quantidade
SDS Electrophoresis buffer (sol. 4.8)		100 mL
Agarose (NA ou M)	0,5%	0,5 g
Azul de bromofenol	traços	poucos grãos

ANEXO E - FIGURAS

Figura 1 – Gel bidimensional de proteína de plasma seminal, obtido a partir de amostra de sêmen de touro da raça Nelore, com destaque para os spots com maior potencial como marcadores de características ligadas ao desempenho reprodutivo.

Figura 2 – Gel bidimensional de proteína de plasma seminal, obtido a partir de amostra de sêmen de touro da raça Simental, com destaque para os spots com maior potencial como marcadores de características ligadas ao desempenho reprodutivo.