

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**COMPORTAMENTO SEXUAL, CONCENTRAÇÕES PERIFÉRICAS DE
TESTOSTERONA E PERFIL CROMATOGRÁFICO DE PROTEÍNAS DO
SÊMEN COM AFINIDADE A HEPARINA, EM TOUROS JOVENS DA RAÇA
GUZERÁ**

JULIANO CESAR DIAS

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG
2008**

JULIANO CESAR DIAS

**COMPORTAMENTO SEXUAL, CONCENTRAÇÕES PERIFÉRICAS DE
TESTOSTERONA E PERFIL CROMATOGRÁFICO DE PROTEÍNAS DO
SÊMEN COM AFINIDADE A HEPARINA, EM TOUROS JOVENS DA RAÇA
GUZERÁ**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Venício José de Andrade
Co-Orientador: Prof. Martinho de Almeida e Silva
Co-Orientador: Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2008

D541c Dias, Juliano Cesar, 1977-

Comportamento sexual, concentrações periféricas de testosterona e perfil cromatográfico de proteínas do sêmen com afinidade a heparina, em touros jovens da raça Guzerá / Juliano Cesar Dias. – 2008.

110 p. : il.

Orientador: Venício José de Andrade

Co-orientadores: Martinho de Almeida e Silva, Vicente Ribeiro do Vale Filho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Guzerá (Zebu) – Reprodução – Teses. 2. Comportamento sexual dos animais – Teses. 3. Sêmen – Proteínas – Teses. 4. Andrologia veterinária – Teses. I. Andrade, Venício José de. II. Silva, Martinho de Almeida e. III. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.291 082

Tese defendida e aprovada em 30 de junho de 2008, pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Venício José de Andrade
(Orientador)

Prof. Luiz Altamiro Garcia Nogueira

Prof. Elmo Gomes Diniz

Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho

Prof. Jonas Carlos Campos Pereira

*A minha esposa, Suzete, e a minha filha, Luiza,
que com amor, carinho, paciência e compreensão estiveram sempre próximas
e souberm entender as dificuldades encontradas durante este período.*

*A minha mãe, Ivete, pelo carinho, apoio e constante incentivo.
A meu pai, Paulo.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*.

Ao Prof. *Venício José de Andrade*, pela orientação, confiança, ensinamentos, amizade e compreensão. Serei sempre grato.

Ao Prof. *Vicente Ribeiro do Vale Filho* pela co-orientação, amizade, conhecimentos e grande auxílio.

Ao Prof. *Martinho de Almeida e Silva* pela co-orientação e inestimável colaboração na elaboração dos dados.

Aos Professores *Elmo Gomes Diniz* e *Luiz Altamiro Garcia Nogueira* pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. *Helton Mattana Saturnino* pelos conhecimentos transmitidos e colaboração.

Ao Prof. *Álan Maia Borges* pela colaboração na coleta de dados.

Agradecimento muito especial a minha esposa *Suzete* e à minha filha *Luiza*, pelo incondicional apoio.

A minha mãe *Ivete*, e aos meus irmãos, *Alex* e *Tiago*, pela amizade, carinho, força e incentivo.

Agradecimento especial ao Senhor *Paulo Emílio de Almeida Carneiro*, proprietário da Fazenda Palestina, por permitir e muito contribuir na realização deste trabalho.

Aos funcionários da Fazenda Palestina, em especial: *Luciano*, *Dinei*, *Dinelson*, *Zé Brasil* e *Kid*, pelo auxílio sempre disponível.

Aos amigos de pós-graduação, *Jorge* e *Lucas*, pelo convívio, paciência e auxílio na coleta e análise dos dados.

Ao Prof. *Marcelo Matos Santoro* por permitir a utilização do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e pelas valiosas sugestões.

Aos biólogos, *Jamil* e *Janine*, pelo auxílio na realização das análises.

A professora *Adelina Martha dos Reis* por permitir a utilização do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e pelas valiosas sugestões.

A bolsista de iniciação-científica, *Thaís*, pela realização das análises.

Ao amigo *Dário Dias* pelo excelente convívio e ajuda sempre que necessário.

Aos demais professores e funcionários da Escola de Veterinária pelos ensinamentos, atenção, ajuda e amizade.

A todos os colegas da pós-graduação.

A Escola de Veterinária da UFMG pela acolhida e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

*“Dê-me, Senhor,
agudeza para entender,
capacidade para reter,
método e faculdade para aprender,
sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar.
Dê-me, Senhor,
acerto ao começar,
direção ao progredir
e perfeição ao concluir.”*
São Tomás de Aquino

*“É injusto e imoral tentar fugir às conseqüências dos próprios atos.
A natureza é inexorável, e vingará-se completamente de tal violação de suas leis.”*
Ghandi

*“Uma poderosa ferramenta para nos ajudar a gerir com habilidade a nossa vida é perguntar
antes de cada ato se isso nos trará felicidade.”*
Dalai Lama

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ANEXOS.....	16
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
CAPÍTULO 1	21
Resumo.....	21
Abstract.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1. <i>Mecanismos de Controle do Comportamento Sexual</i>	24
2.2. <i>Testes de Comportamento Sexual</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Caracterização da Propriedade.....	27
3.2. Animais e Metodologia Experimental.....	27
3.3. Análise dos Dados.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 2	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	53
2.1. <i>Síntese de Testosterona</i>	53
2.2. <i>Controle Hormonal da Testosterona</i>	54
2.3. <i>Principais Ações dos Andrógenos</i>	56
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1. Caracterização da Propriedade.....	57
3.2. Animais e Metodologia Experimental.....	57
3.3. Análise dos Dados.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÕES.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CAPÍTULO 3	75
Resumo.....	75
Abstract.....	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	77
2.1. <i>Glicosaminoglicanos (GAGs) e Heparina</i>	78
2.2. <i>Proteínas do Plasma Seminal e Membrana Espermática</i>	78
2.3. <i>Relação da Fertilidade com as Proteínas do Sêmen</i>	81
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	81

3.1. Coleta e Armazenamento do Sêmen para Análise.....	82
3.2. Análises Bioquímicas.....	82
3.3. Teste de Fertilidade.....	83
3.4. Análise dos Dados.....	84
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.1. Perfil por gel filtração de proteínas do plasma seminal.....	86
4.2. Proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina.....	91
4.3. Proteínas com afinidade a heparina aderidas a membrana espermática.....	95
4.4. Proteínas do sêmen e fertilidade a campo.....	98
5. CONCLUSÕES.....	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, circunferência escrotal e características seminais em touros da raça Guzerá, submetidos a avaliação da libido em curral e piquete.....	30
Tabela 2 - Distribuição de touros jovens Guzerá, como resultado de sua classificação em teste da libido por 15 minutos.....	31
Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos escores da libido, em avaliação individual e coletiva, em curral e piquete, com diferentes tempos de observação em touros jovens da raça Guzerá.....	32
Tabela 4 - Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, circunferência escrotal, características seminais e concentrações plasmáticas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá, com diferentes manifestações da libido.....	33
Tabela 5 - Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá em avaliação individual em curral.....	35
Tabela 6 - Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá em avaliação coletiva em curral.....	36
Tabela 7 - Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá, em avaliação individual em piquete.....	38
Tabela 8 - Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá em avaliação coletiva em piquete.....	38
Tabela 9 - Correlações de Spearman entre a frequência dos eventos de comportamento sexual em touros Guzerá em teste da libido em avaliação individual.....	42
Tabela 10 - Correlações de Spearman entre a frequência dos eventos de comportamento sexual em touros Guzerá em teste da libido em avaliação coletiva.....	42
Tabela 11 - Correlações de Spearman entre a libido individual e coletiva, e idade, peso corporal, características seminais, classificação andrológica por pontos e concentrações séricas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá.....	43
Tabela 12 - Correlações de Spearman entre a libido, segundo o método de avaliação, e idade, peso corporal, características andrológicas, classificação andrológica por pontos e concentrações séricas de testosterona em touros da raça Guzerá.....	45

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, características físicas e morfológicas do sêmen e classificação andrológica por pontos (CAP) de touros jovens da raça Guzerá.....	59
Tabela 2 - Médias e desvios-padrão da concentrações séricas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá, em diferentes horários de coleta.....	59
Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, características seminais e classificação andrológica por pontos (CAP) em touros jovens da raça Guzerá, com concentrações séricas de testosterona acima e abaixo da média ($1,36 \pm 1,12$ ng/ml).....	62

Tabela 4 -	Correlações de Pearson (paramétricas) e de Spearman (não paramétricas) entre concentrações séricas de testosterona e idade, peso corporal, circunferência escrotal, características físicas e morfológicas do sêmen e classificação andrológica por pontos em touros jovens da raça Guzerá.....	63
------------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós-congelação, em touros da raça Guzerá.....	85
Tabela 2 -	Variação do tempo (minutos) de retenção em coluna de Superose 12 e suas estimativas de pesos moleculares, em oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros Guzerá.....	86
Tabela 3 -	Valores mínimos, máximos e médios das áreas dos oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros jovens Guzerá, e suas respectivas freqüências.....	88
Tabela 4 -	Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e os diferentes picos de identificação.....	89
Tabela 5 -	Correlações de Pearson entre as áreas dos picos de proteínas do plasma seminal e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós-congelação, em touros da raça Guzerá.....	90
Tabela 6 -	Descrição dos picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade a heparina, em função das concentrações de NaCl (0 a 1,5 M) das proteínas do plasma seminal de touros Guzerá.....	91
Tabela 7 -	Médias e desvios-padrão das concentrações (mg/ml) das proteínas do plasma seminal, com afinidade a heparina, nos cinco picos identificados e suas freqüências.....	92
Tabela 8 -	Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e os diferentes picos com afinidade a heparina do plasma seminal e da membrana espermática.....	93
Tabela 9 -	Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas com afinidade a heparina, do plasma seminal e da membrana espermática, em touros jovens da raça Guzerá.....	93
Tabela 10 -	Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e da membrana espermática, com afinidade a heparina e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós-congelação, em touros da raça Guzerá.....	94
Tabela 11 -	Estatística descritiva da área total (%) e dos picos cromatográficos das proteínas aderidas a membrana espermática, com afinidade a heparina.....	96
Tabela 12 -	Descrição do grau de afinidade a heparina e da freqüência de aparecimento das proteínas aderidas a membrana espermática, com afinidade a heparina, para os três picos registrados.....	96
Tabela 13 -	Médias e desvios-padrão da concentração de proteínas do sêmen de touros jovens da raça Guzerá, conforme o índice de fertilidade.....	98

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá em teste da libido individual em curral, com diferentes tempos de avaliação..... 34
- Figura 2 - Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá, em teste da libido coletivo em curral, com diferentes tempos de avaliação..... 35
- Figura 3 - Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá, em teste da libido individual em piquete, com diferentes tempos de avaliação..... 37
- Figura 4 - Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá, em teste da libido coletivo em piquete, com diferentes tempos de avaliação..... 37
- Figura 5 - Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá, em teste da libido individual e coletivo, em curral e piquete..... 41

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Concentrações séricas médias de testosterona em touros da raça Guzerá, em diferentes horários de coleta..... 60
- Figura 2 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função do horário de coleta, em touros da raça Guzerá..... 61
- Figura 3 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função da idade, em touros jovens da raça Guzerá..... 62
- Figura 4 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função do peso corporal, em touros jovens da raça Guzerá..... 64
- Figura 5 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função da circunferência escrotal, em touros jovens da raça Guzerá..... 65
- Figura 6 - Regressão da concentração espermática do sêmen em função da concentração sérica de testosterona, em touros jovens da raça Guzerá..... 67

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Perfil padrão de picos cromatográficos de proteínas do plasma seminal, por gel filtração em coluna de Superose – 12, de touros jovens da raça Guzerá..... 87
- Figura 2 - Perfil padrão de picos cromatográficos de proteínas com afinidade a heparina, aderidas à membrana espermática, em touros jovens da raça Guzerá..... 95

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Índice pluviométrico (mm) mensal observado na sede da Fazenda Palestina, município de Unaí – MG, nas estações dos anos 2004/2005 e 2005/2006.....	109
Anexo 2 - Índice pluviométrico (mm) observado na sede da Fazenda Palestina, município de Unaí – MG, nos dez anos anteriores ao período experimental.....	109
Anexo 3 - Composição química de alimentos fornecidos aos animais, no período seco da estação 2005/2006.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH = hormônio adeno-corticotrófico
AMPc = adenosina monofosfato cíclica
ATP = adenosina trifosfato
BSP = *bovine seminal plasma proteins*
CAP = classificação andrológica por pontos
CE = circunferência escrotal
CCol = curral coletivo
CInd = curral individual
Conc = concentração espermática
CRP = cheirar a região perineal
DHEA = de-hidroepiandrosterona
DHT = dihidrotestosterona
DM = defeitos espermático maiores
Dm = defeitos espermáticos menores
DMPós = defeitos espermático maiores pós-congelação
DmPós = defeitos espermáticos menores pós-congelação
DT = total de defeitos espermáticos
DTPós = total de defeitos espermáticos pós-congelação
FAA = *fertility associated antigen*
FPLC = cromatografia líquida de performance rápida
FSH = hormônio folículo estimulante
GAGs = glicosaminoglicanos
GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas
GTP = guanosina trifosfato
HBP = *heparin binding protein*
HDL = lipoproteínas de alta densidade
HPLC = cromatografia líquida de alta performance
IM = impulso de monta
LA = livro aberto
LH = hormônio luteinizante
MC = monta completa
MH (1, 2, 3) = picos de proteínas com afinidade a heparina aderidas a membrana espermática
Mot = motilidade espermática
MotPós = motilidade espermática pós-congelação
NAD⁺ = nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADPH = nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
P (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) = picos de proteínas do plasma seminal por gel filtração
PCol = piquete coletivo
PH (1, 2, 3, 4, 5) = picos de proteínas com afinidade a heparina do plasma seminal
PInd = piquete individual
PO = puro de origem
ProtPico 3 = proteínas do plasma seminal do pico três
ProtPlasma AHe = proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina
PPS = proteínas do plasma seminal
P₄ = progesterona
RF = reflexo de Flehmen

ST = solução tampão
Testost = concentrações séricas de testosterona
TM/MA = tentativa de monta ou monta abortada
Vigor = vigor espermático
Vol = volume seminal.

Comportamento sexual, concentrações periféricas de testosterona e perfil cromatográfico de proteínas do sêmen com afinidade a heparina, em touros jovens da raça Guzerá

(Sexual behaviour, peripheral concentrations of testosterone and chromatographic profile of heparin binding proteins, in young Guzerat bulls)

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A adaptação dos zebuínos ao clima tropical possibilitou sua rápida e crescente dispersão por todo o território nacional, estimando-se que do efetivo de 185 milhões de bovinos (IBGE, 2004), os zebuínos e seus cruzamentos representem cerca de 80% ou mais do efetivo do rebanho nacional.

Dentre as raças zebuínas, a raça Guzerá é uma das que apresentam boa aceitação nas condições de criação brasileira, graças à sua rusticidade e boa adaptabilidade às condições adversas (Cartaxo, 2001). No Brasil, o Guzerá foi a raça predominante até a década de trinta, sendo a partir daí, utilizada em cruzamentos representando importante papel na formação de novas raças, e influenciado a população mestiça (Melo & Penna, 2000). Desta forma, se tornou importante para a pecuária nacional por sua adaptação e como fonte de cruzamento com raças européias, necessitando mais estudos quanto aos seus parâmetros reprodutivos (Camargo et al., 2000).

A reprodução pode ser considerada o principal pilar da cadeia produtiva, no entanto, no Brasil ainda existem inúmeros pontos de estrangulamento no processo reprodutivo da bovinocultura de corte: taxas de gestação, parição e desmama relativamente baixas, apesar do enorme salto que deu na última década (Costa e Silva, 2000).

Considerando que 55% do rebanho brasileiro é composto de fêmeas em idade reprodutiva (Anualpec, 2002) e que apenas

7% dessas fêmeas são inseminadas (Asbia, 2003), pode-se afirmar que 93% das fêmeas são servidas em manejo de monta natural (Oliveira et al., 2007). Considerando ainda que somente 2% da demanda de reprodutores zebuínos é atendida por animais com registro definitivo junto a associação de criadores, o que não certifica a qualidade do animal (Pereira, 2000), reconhece-se que há enorme déficit de qualidade genética para atender à demanda de touros para criadores comerciais.

Dessa forma, o touro apresenta grande relevância no processo reprodutivo, principalmente se considerarmos que a grande maioria dos reprodutores utilizados na pecuária bovina brasileira não são animais selecionados e testados quanto a capacidade reprodutiva (Oliveira et al., 2007).

Na busca de touros com alto potencial de fertilidade, dúvidas ainda permanecem quanto ao melhor método para avaliação da capacidade reprodutiva e predição da fertilidade de reprodutores zebuínos em condições tropicais. O exame andrológico completo dos animais, que potencialmente serão usados em monta natural, inclui as avaliações clínica e da biometria testicular, das características espermáticas (aspectos físicos e morfológicos do sêmen), além da libido e da capacidade de monta, que são fatores altamente ligados à fertilidade e ao melhoramento genético de rebanhos bovinos (Vale Filho et al., 1989; Chenoweth, 2000; Pereira, 2000).

A alta variabilidade da eficiência nos processos de fertilização, principalmente na

congelamento de sêmen e fecundação “*in vitro*”, tem levado as avaliações andrológicas às técnicas mais apuradas, no que diz respeito à identificação do potencial fecundante do espermatozóide do touro no trato genital feminino. Neste contexto, a avaliação do perfil bioquímico do sêmen tem aberto novas fronteiras como avaliações reprodutivas complementares (Ax et al., 2002).

O fato de existir grande variabilidade na eficiência dos touros enfatiza a necessidade de se selecionarem animais geneticamente superiores, capazes de influenciar parâmetros associados a uma melhor

performance do rebanho (Moura et al., 2002).

O desempenho dos reprodutores depende do aprimoramento de técnicas de manejo e alimentação, mas é fundamental também o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento testicular e ponderal, além dos processos que potencialmente interferem com estes processos (Moura et al., 2002).

Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento sexual, os níveis séricos de testosterona e o perfil protéico do sêmen de touros jovens da raça Guzerá, e correlacioná-los com características reprodutivas indicativas de fertilidade e peso corporal.

CAPÍTULO 1

Comportamento sexual, durante o teste da libido, de touros jovens da raça Guzerá, sem experiência sexual, e suas associações com características reprodutivas, peso corporal e níveis séricos de testosterona

(Sexual behaviour during libido test in young Guzerat bulls with no previous sexual experience and their associations with reproductive traits, body weight and serum testosterone levels)

Resumo

Um total de 24 touros da raça Guzerá, de 24 a 34 meses de idade, avaliados andrológicamente, foram submetidos a teste da libido com o objetivo de estudar o comportamento sexual, em curral e em piquete, por cinco, 10 e 15 minutos de observação; e associar com características andrológicas (aspectos físicos: motilidade, vigor, turbilhonamento e concentração espermáticos, e volume do sêmen; e morfológicos: defeitos espermáticos maiores, menores e totais, do sêmen), circunferência escrotal (CE), classificação andrológica por pontos (CAP), peso corporal, idade e concentrações séricas de testosterona. Os comportamentos avaliados foram: 0) o touro não mostrou interesse sexual pela fêmea; 1) interesse sexual mostrado apenas uma vez (ex: cheirar a região perineal); 2) positivo interesse pela fêmea em mais de uma ocasião (ex: reflexo de Flehmen); 3) ativa perseguição da fêmea com persistente interesse sexual (ex: impulso de monta); 4) uma monta ou tentativa de monta, mas nenhum serviço; 5) duas montas ou tentativas de monta, mas nenhum serviço; 6) mais de duas montas ou tentativas de monta, nenhum serviço; 7) um serviço (monta completa ou cópula) seguido por nenhum interesse sexual; 8) um serviço seguido por interesse sexual, incluindo montas ou tentativas de monta; 9) dois serviços seguidos por nenhum interesse sexual; 10) dois serviços ou mais seguidos por interesse sexual, incluindo montas, tentativas de monta e serviços; dividindo os touros em três categorias: alta libido – comportamentos 7, 8, 9 e 10; média libido – comportamentos 4, 5 e 6 e baixa libido – comportamentos 0, 1, 2 e 3. Observou-se, de forma geral, baixa resposta dos animais aos testes, uma vez que menos da metade dos animais foi classificada com libido média ou alta. Verificou-se menor variação na pontuação entre os tempos, no teste individual em curral com escore 3,0 em cinco minutos e 3,3 em 15 minutos de avaliação ($p>0,05$); já a maior variação ocorreu no teste coletivo em curral com escore 2,0 em cinco minutos de avaliação e 3,6 com 15 minutos ($p<0,05$). Quando se comparou os animais pela libido, constatou-se diferença ($p<0,05$) no peso corporal entre os animais de alta e baixa libido sugerindo efeito de ambiente na manifestação do interesse sexual e dos eventos comportamentais do cortejo, em touros jovens Guzerá. Encontrou-se diferença ($p<0,05$) nos níveis séricos de testosterona em touros com alta e média libido, quando comparados a touros de baixa libido. Buscou-se também associação entre os diferentes eventos de comportamento nos testes e tempos de avaliação utilizados, observou-se, de forma geral, associações favoráveis e de alta magnitude entre os eventos, sugerindo que touros que mais manifestam eventos em teste da libido são os com maiores chances de realizar a cópula. A associação entre a libido e idade, peso corporal e concentrações séricas de testosterona, independente do sistema de avaliação, reforçam o achado de influência direta destas características na expressão do interesse sexual em touros jovens Guzerá.

Palavras-chave: comportamento sexual, Guzerá, libido, testosterona, zebu.

Abstract

Twenty four Guzerat bulls from 24 to 34 months olds, andrologically evaluated as normal were submitted to a libido test, to study sexual behaviour in pen and pasture conditions, for periods of 10 and 15 minutes of observations and associate with andrologic (physic aspects, motility, vigour, sperm mass motility and concentration, semen volume; and morphologic aspects: major, minor and total sperm defects), scrotal circumference, breeding soundness evaluation for Zebu, body weight, age and serum testosterone concentrations. The evaluated behaviors were: 0) the bull did not show sexual interest for the female; 1) sexual interest shown only one time (example: smelling the perineal region); 2) positive interest for the female in more than an occasion (example: Flehmen reflex); 3) active persecution of the female with persistent sexual interest (example: mounting impulse); 4) one mount or attempt to mount, but no service; 5) two mounts or attempts to mont, but no service; 6) more than two mounts or attempts to mount, no service; 7) one service (complete mount or mating) followed by no sexual interest; 8) a service followed for sexual interest, including mounts or attempts to mount; 9) two services followed for no sexual interest; 10) two or more services followed by sexual interest, including mounts, attempts to mount and services; classifying the bulls in three categories: high libido - behaviors 7, 8, 9 and 10; average libido - behaviors 4, 5 and 6 and low libido behaviors 0, 1, 2 and 3. It was observed, in a general way, low reply of the animals to the tests, once that half of them were classified with average or high libido. Lower variation in the punctuation between the observation times was verified, in the individual or pen test with score 3.0 in five minutes and 3.3 in 15 minutes of evaluation ($p>0.05$). Otherwise, the biggest variation was registered in the collective pen test, with score 2.0 in five minutes of evaluation and 3.6 with 15 minutes ($p<0.05$). When the animals were compared in agreement with their libido classifications, evidenced difference ($p<0.05$) in the corporal weight between high and low libido, suggesting environment effect in the manifestation of the sexual interest and the sexual behavior events of courtship, in young Guzerat bulls. Difference ($p<0.05$) in the serum testosterone levels in bulls with high and average libido, when compared the bulls of low libido were observed. It was recorded, in a general way, favorable associations and of high magnitude among the events, suggesting that bulls that showed more events in the libido test are those with higher change to carry through matings. The association between the libido and age, body weight and serum testosterone concentrations, independent of the evaluation system, strengthens the finding of direct influence of these characteristics in the expression of the sexual interest in young Guzerat bulls.

Keywords: *Guzerat, libido, sexual behavior, testosterone, zebu.*

1. INTRODUÇÃO

O comportamento sexual do touro, que sabidamente exerce importante influência na fertilidade do rebanho, tem sido avaliado pela intensidade da libido (Hultnäs, 1959; Rupp et al., 1977; Chenoweth et al., 1984; Vale Filho et al., 1994; Costa e Silva et al., 1999), da capacidade de serviço (Rupp et al., 1977; Blockey, 1978; Blockey, 1981; Chenoweth et al., 1979; Chenoweth et al., 1984) e do comportamento sexual a campo (Costa e Silva et al., 1998; Zuin, 2000; Santos, 2001).

A libido é o momento em que o macho demonstra o interesse sexual, podendo ser caracterizado como a espontaneidade ou avidez para montar e a habilidade de completar o serviço em uma fêmea (Hultnäs, 1959).

Desde as primeiras tentativas de Hultnäs (1959), de desenvolver uma prova confiável e padronizada para avaliação do comportamento sexual dos touros, vários esquemas para avaliação da libido vêm sendo propostos, tanto para touros europeus (Osborne et al., 1971; Chenoweth et al., 1979; Chenoweth et al., 1984), como para zebuínos (Pineda et al., 1997; Vale Filho et al., 1994).

Comparando-se os testes de libido, capacidade de serviço e tempo de reação para primeiro serviço em touros de corte jovens, Chenoweth et al. (1979) concluíram que o teste da libido apresenta vantagens por avaliar e refletir melhor o comportamento destes animais. Os autores ressaltaram ainda o fato do teste de libido tratar de uma avaliação de menor duração e maior praticidade que o teste de capacidade de serviço.

Apesar dos esforços de pesquisadores brasileiros (Barbosa, 1987; Pinto et al., 1989; Crudeli, 1990; Silva, 1994; Vale Filho et al., 1994), ainda existem muitas

dúvidas com relação aos critérios de execução dos testes de avaliação do comportamento sexual dos zebuínos e do real potencial reprodutivo da espécie em condições extensivas de criação.

Resultados de pesquisa com touros *Bos taurus indicus* indicam que esta avaliação deve ser realizada em locais apropriados, semelhantes aos ambientes onde os touros serão utilizados, sem comprometimento da observação daquelas atitudes realmente importantes, bem como valorização de alguns comportamentos espécie específicos, de forma diferenciada em relação aos touros europeus.

Avaliando o comportamento em teste da libido de touros Nelore e Pantaneiro (*Bos taurus taurus*), criados extensivamente, Costa e Silva et al. (1999) evidenciaram baixas frequências de comportamentos copulatórios, de impulso e tentativa de montas, e de serviços completos, sugerindo associação da baixa frequência destes comportamentos com a adaptação dos animais para menor desgaste nas montas a campo em condições tropicais. O efeito de ano influenciou ($p < 0,05$) a maioria dos comportamentos observados, sugerindo baixa repetibilidade de tais observações em teste realizados em curral.

Santos (2001), analisando o comportamento sexual de touros Nelore a pasto, observou que o comportamento de reflexo ou impulso de monta foi o evento de maior importância na conduta sexual dos touros, sugerindo ser este um comportamento estratégico para se testar a receptividade das fêmeas. O autor ressaltava ainda que o período de maior atividade sexual foi observado entre as 18 e 24 horas e que o estado reprodutivo da fêmea foi determinante como estímulo ao comportamento sexual do touro.

Tem sido demonstrado que touros que apresentam altas classificações quanto a libido, capacidade de serviço e de razoáveis

a alta pontuações nos sistemas de classificação andrológica, podem servir a maior número de fêmeas durante a estação de monta, possibilitando assim maior pressão de seleção (Vale Filho, et al., 1994; Fonseca, et al., 1997; Salvador, et al., 2003), aliado à redução dos custos com os mesmos (Neville et al., 1988; Fonseca, 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento sexual de touros jovens Guzerá, sem experiência sexual, e associá-lo com características reprodutivas, níveis séricos de testosterona e peso corporal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mecanismos de Controle do Comportamento Sexual

O sucesso do acasalamento, indispensável para a fertilização e a sobrevivência dos recém-nascidos, depende da conduta sexual dos pares atraídos pela sua condição hormonal (Fonseca, 2000).

As fases de abordagem sexual são estereotipadas e não influenciadas pela experiência, isto é, todos os machos das espécies domésticas antes de realizar a cópula passam por etapas comuns, independente da espécie ou da experiência sexual. Os recursos fisiológicos acionados, bem como as categorias comportamentais utilizadas em cada etapa, podem apresentar variações de acordo com a espécie, raça e ambiente (Blockey, 1976; Chenoweth, 1981; Costa e Silva, 2000).

Vários padrões de cortejo, ostentação, atividades motoras e atitudes, são direcionados a fim de aproximar os gametas masculino e feminino com o objetivo de assegurar a fertilização, a gestação e a sobrevivência da espécie (Hafez, 1995; Costa e Silva, 2000; Fonseca, 2000).

A conduta sexual envolve uma seqüência de manifestações a partir do despertar sexual e

seguida pelo cortejo (exibição sexual), ereção, protusão do pênis, monta, introdução (procura), ejaculação (arranque final), desmonta e refratariedade (saciedade) (Hafez, 1995; Fonseca, 2000). Todos os machos passam por estas etapas até alcançar o acasalamento, no entanto, variações dentro de cada etapa podem ser observadas entre as subespécies bovinas, entre raças e indivíduos, quanto a duração, categorias comportamentais, mecanismos fisiológicos e estruturais envolvidos (Costa e Silva, 2000).

O comportamento sexual é desencadeado a partir de estímulos sensoriais que ativam os centros superiores, principalmente a região hipotalâmica, desencadeando uma série de alterações neuro-endócrinas que resultam na expressão de comportamentos (Costa e Silva, 2002).

Os recursos sensoriais são de extrema importância na busca do parceiro, na identificação do estado fisiológico da fêmea, no cortejo (caracterizando o período de excitação), na ereção e monta. Destacase a visão como o sentido mais importante para a detecção da fêmea em cio e cortejo, seguido da olfação (Hale, 1966; Geary & Reeves, 1992; Chenoweth, 2000; Costa e Silva, 2002). Outros sentidos (auditivo, gustativo e tátil) estariam presentes, mas utilizados em diferentes níveis (Costa e Silva, 2000; Costa e Silva, 2002).

Em machos adultos mamíferos, o controle endócrino do comportamento sexual é feito pela testosterona, no entanto existem evidências de que o estrógeno e a dihidrotestosterona também participam da função erétil em algumas espécies (Henney et al., 1990; Parvizi, 2000; Pinckard et al., 2000). Alguns trabalhos (Henney et al., 1990; Pinckard et al., 2000) sugerem que a diferenciação sexual encontra-se relacionada com a atividade da aromatase cerebral, muito mais que com a testosterona ou o estrógeno, embora se reconheça a

participação efetiva da testosterona na diferenciação dimórfica sexual cerebral.

A organização sensitiva da conduta sexual envolve interações de conduta que levam a cópula e que podem ser divididas, conforme a seguir (Hafez, 1995; Chenoweth, 2000; Fonseca, 2000):

a) a procura mútua do parceiro sexual: nos bovinos, dá-se pela visão do grupo sexualmente ativo ou pelo olfato (feromônios), ou por ambos, o que é mais comum. O touro aproxima-se da vaca em cio, ou por vê-la assediada por outros touros e pelas companheiras de rebanho;

b) identificação do estado fisiológico da parceira: é de iniciativa do touro que está sempre disponível para o sexo identificar a parceira em cio. Uma vez próximo, ele explora todas elas até identificar aquela em cio mais positivo. Havendo outros touros no grupo, o dominante exerce preferencialmente esta atividade. Entretanto, se houver muitas fêmeas receptivas, as atividades são divididas com os subordinados e várias vacas são cortejadas ao mesmo tempo;

c) seqüência de intervenções comportamentais que resultam na adoção da posição de cobrição pela fêmea: é o momento em que ela se entrega ao macho, influenciada pelas altas concentrações de estrógeno circulante que a levam ao máximo do desejo, submissa aos caprichos do touro cortejador;

d) reação de monta pelo touro: a reação de monta ocorre dentro da seqüência da conduta sexual e culmina com a cópula que pode ser imediata ou demorar algum tempo, dependendo do estado de saciedade do touro. Quanto maior o tempo de repouso sexual, mais ávido estará e mais montas realizará.

O sistema de acasalamento dos bovinos é similar ao da maioria dos mamíferos, ou seja, é descrito como poligínico (Chenoweth, 1981; Chenoweth, 2000; Paranhos da Costa & Costa e Silva, 2007),

com competição entre machos, sendo que as fêmeas providenciam o maior investimento parental (Costa e Silva, 2002).

2.2. Testes de Comportamento Sexual

Costa e Silva (2002) caracterizou o comportamento social dos zebuínos como agrupamentos com vários machos num sistema de acasalamento promíscuo, com touros compartilhando o espaço físico e também as atividades sexuais de cortejo, sendo o acasalamento garantido ao dominante, quando a oferta de cio for baixa e, conseqüentemente, maior competição entre os touros. Observou ainda o compartilhamento do cortejo das fêmeas entre dominantes e subordinados, no entanto o serviço era realizado exclusivamente pelo dominante quando a oferta de incidência de cio era baixa.

Os testes desenvolvidos para avaliar o comportamento sexual enfatizam métodos cuja finalidade compreende a quantificação do desejo e da capacidade sexual na tentativa de classificar os reprodutores (Santos, 2001). Entretanto, o comportamento sexual envolve fatores sociais, hormonais, nutricionais, ambientais, individuais, idade, experiência e hierarquia social (Chenoweth & Osborne, 1975; Blockey, 1979; Chenoweth, 1981), além do componente genético (Chenoweth, 1981; Hohenboken, 1986; Quirino et al., 2004).

Hulnãs (1959) desenvolveu um teste para avaliar a libido e a capacidade reprodutiva de touros em centrais de inseminação artificial, com vacas contidas fora do estro. Posteriormente, Osborne et al. (1971) sugeriram um teste que utilizou o mesmo conceito da libido, para avaliar touros. Os autores utilizaram fêmeas estrogenizadas livres como estímulo, em um teste de cinco minutos, e classificavam os touros em escores de zero a quatro, conforme a manifestação sexual: (0) nenhum interesse sexual; (1) algum interesse sem tentativas

de monta; (2) montas ou tentativas de monta ao menos uma vez; (3) montas ou tentativas de monta mais de uma vez; (4) um serviço completo.

Posteriormente, este teste sofreu modificações aumentando o tempo de cinco para 10 minutos de observação, e o aumento do escore, inicialmente até quatro, para 10 níveis (Chenoweth, 1981). Esse escore é obtido a partir de observações da atividade e conduta do reprodutor de acordo com a escala abaixo:

- 0) o touro não mostra interesse sexual pela fêmea;
- 1) interesse sexual mostrado apenas uma vez (ex: cheirar a vulva);
- 2) interesse sexual mostrado em mais de uma ocasião;
- 3) ativa perseguição da fêmea com persistente interesse sexual;
- 4) uma monta ou tentativa de monta, mas nenhum serviço;
- 5) duas montas ou tentativas de monta, mas nenhum serviço;
- 6) mais de duas montas ou tentativas de monta, nenhum serviço;
- 7) um serviço seguido por nenhum interesse sexual;
- 8) um serviço seguido por interesse sexual, incluindo montas ou tentativas de monta;
- 9) dois serviços, seguidos por nenhum interesse sexual;
- 10) dois serviços ou mais, seguidos por interesse sexual, incluindo montas, tentativas de monta e serviços.

Outros testes foram desenvolvidos para avaliar o número de serviços completos, conhecidos como teste de capacidade de serviço. Esse teste permite a avaliação simultânea da capacidade de serviço do reprodutor e da hierarquia de dominância do grupo, uma vez que as provas são realizadas com vários touros ao mesmo tempo, durante 40 minutos, promovendo a competição pela oferta de uma fêmea a menos que o número

de touros em teste (Blockey, 1976; Blockey, 1978).

Foram observadas correlações significativas entre os testes da libido e capacidade de serviço, trabalhando com fêmeas contidas em estro (0,45; $p < 0,01$) ou não (0,63; $p < 0,01$), sugerindo ser o teste de libido como melhor opção por requerer menor tempo de avaliação que os testes de capacidade de serviço (Chenoweth et al., 1979).

Além das pontuações aferidas durante os testes da libido, tem sido usado o tempo de reação de cada touro para avaliar seu desempenho sexual caracterizado pelo intervalo de tempo entre o início do teste até a realização do serviço completo (Fraser, 1960).

A avaliação do comportamento de zebuínos no Brasil tem sido feita, principalmente, por teste da libido; entretanto, os resultados das avaliações desses reprodutores nos testes idealizados para touros europeus não são tão eficientes, devido à dificuldade de adequação dos testes para esses reprodutores (Silva, 1994; Pineda et al., 1997; Costa e Silva, 2002). As interações sexuais propostas nos testes para touros *Bos taurus taurus*, comentadas anteriormente, não se aplicam totalmente para reprodutores *Bos taurus indicus*, pelo fato, em parte, do comportamento sexual dos reprodutores dessas subespécies serem distintos (Santos, 2001).

Os touros zebuínos apresentam baixa frequência de monta durante a realização dos testes (Chenoweth & Osborne, 1975; Silva, 1994; Pineda et al., 1997; Salvador et al., 2003), o que interfere diretamente na pontuação alcançada no teste por estes animais. O fato de apresentarem pequeno número de serviços completos durante o teste tem sugerido a adoção de critérios que dêem maiores pesos a outros tipos de

condutas relacionadas ao interesse sexual (Santos, 2001).

O local de realização do teste pode ser fator limitante devido ao possível estresse causado nos touros zebuínos (Fraser, 1960). A hierarquia social que atua de forma acentuada nos teste de capacidade de serviço, devido a inibição do comportamento dos touros na presença de um touro dominante, parece ser outro fator (Santos, 2001; Costa e Silva, 2002). Outro aspecto de grande importância é a necessidade de fêmeas em cio durante o teste de touros *Bos taurus indicus* (Chenoweth, 1981; Santos, 2001; Torres Júnior, 2004), sendo que estas devem estar soltas para que não haja interferência nos resultados (Fonseca, 2000).

Costa e Silva & Encarnação (1995), citados por Costa e Silva (2002), fizeram considerações sobre o uso dos testes comportamentais em touros Nelore: “durante os testes pôde ser observado, inegavelmente, que o touro zebu comportasse com restrições em currais fechados. Entretanto, a tentativa de realizar estes testes em ambiente mais natural, como piquetes de dimensões de aproximadamente um hectare, resultou em fracasso, pois as vacas, após duas ou três montas, demonstraram cansaço e passaram a fugir sistematicamente do touro em teste”.

Diante de tantas dificuldades, alguns trabalhos têm sugerido adaptações no teste da libido, no sentido de adequá-lo ao zebu quanto ao tempo, utilização de fêmeas em cio e soltas e, de certa forma, já respeitando algumas diferenças básicas entre o comportamento das duas subespécies, modificando os critérios de pontuação (Pineda et al., 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Propriedade

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Palestina, de propriedade da Palestina Agropastoril Ltda., município de Unaí, noroeste do estado de Minas Gerais, situada às margens da rodovia MG-188, na região conhecida como “Serra do Bebedouro”, tendo como coordenadas geográficas 46°47’S de latitude e 16°35’W de longitude, situada em área de Cerrado.

A região apresenta clima descrito como quente e úmido tipo AW de Köppen, com temperaturas máxima e mínima de 30,8° e 17,2°C, respectivamente, com precipitação pluviométrica média anual de 1437 mm, registrada nos últimos dez anos (Anexos 1 e 2). Dois períodos climáticos são observados, o seco que se estende de abril a setembro e o chuvoso de outubro a março.

A fazenda possui área total de 1800 ha, com pastagens predominantes de *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum*, rebanho de aproximadamente 1500 animais da raça Guzerá, “PO”, sendo aproximadamente 600 fêmeas em reprodução, servidas em sistema de inseminação artificial, de onde são obtidos os tourinhos para reposição anual dos reprodutores do rebanho comercial e venda. A propriedade faz ainda a aquisição, de animais jovens que são criados e vendidos como reprodutores.

O sistema de manejo é extensivo, e o rebanho é mantido em regime de pastejo, com suplementação volumosa a base de silagem de milho, e concentrado protéico (Anexo 3) no período seco, e suplementação mineral *ad libitum* o ano todo.

3.2. Animais e Metodologia Experimental

Foram inicialmente examinados andrologicamente, um total de 150 touros da raça Guzerá, com idades variando entre 18 e 37 meses. Dentre os animais previamente avaliados e clinicamente normais, 24 touros com idades variando de

24 a 34 meses, sem experiência sexual prévia, foram selecionados para avaliação do comportamento sexual, em teste da libido, em curral e em piquete.

Avaliaram-se os aspectos clínico-andrológicos, circunferência escrotal (CE) e biometria testicular (comprimento e largura), além dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), sendo então os animais submetidos à classificação andrológica por pontos (CAP), segundo (Vale Filho, 1989).

As medições de circunferência escrotal (CE) foram obtidas por meio de fita métrica posicionada na região de maior diâmetro da bolsa escrotal; e a biometria testicular: comprimento (comprimento dos testículos direito e esquerdo) e largura (largura dos testículos direito e esquerdo), foram obtidas com o auxílio de paquímetro, sendo cada testículo medido individualmente.

Foi realizada, também, a verificação da consistência testicular, pontuada em uma escala de um a cinco, conforme proposto por Vale Filho (1997), sendo a consistência cinco a ideal, sugerindo produção espermática normal. A consistência quatro indicada por menor tensão superficial nos testículos, representando um quadro espermático normal ou recuperação de leve degeneração testicular. A consistência três indicada por elasticidade dos testículos, representativa de degeneração testicular de leve a moderada, e, por fim, as consistências um e dois indicadas por flacidez dos testículos, indicativas de degenerações graves.

Quanto ao sêmen foram avaliados os aspectos físicos (volume seminal, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermáticos) e morfológicos, classificados em defeitos maiores (DM), menores (Dm) e totais (DT) (Blom, 1973).

As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de aparelho de eletroejaculação e as avaliações físicas do sêmen realizadas imediatamente após as colheitas. Para a avaliação morfológica, o sêmen foi fixado em solução de formol salina (Hancock, 1957) e transportado em temperatura ambiente até os laboratórios de andrologia da Escola de Veterinária da UFMG.

O esquema de teste da libido utilizado foi o proposto por Vale Filho et al. (1994), no qual os autores sugerem que a libido seja avaliada num lote de 20 fêmeas soltas no curral, das quais três em estro. Neste teste, o animal a ser avaliado permanece por aproximadamente 15 minutos, em lotes de três touros, em curral adjacente ao local do teste da libido, para observação das fêmeas em cio (pré-estimulação coletiva); sendo posteriormente colocado individualmente em curral anexo (pré-estimulação individual), e em seguida, colocado em teste para observação do comportamento sexual.

Os touros foram divididos em dois grupos, tendo cada grupo 12 animais que foram avaliados em curral ou piquete, sendo cada animal submetido ao teste da libido individual e coletivo, conforme descrição abaixo:

Teste da libido individual em curral: neste teste, os animais após pré-estimulação coletiva e individual, foram colocados individualmente junto com as fêmeas (20 vacas, três em cio), em curral com aproximadamente 225 m² (15 x 15 m), sendo observados por cinco, 10 e 15 minutos seqüenciais.

Teste da libido coletivo em curral: neste teste, os animais após pré-estimulação coletiva, foram colocados em grupos de três junto com as fêmeas (20 vacas, cinco em cio), em curral com aproximadamente 225 m² (15 x 15 m), sendo todos os animais observados por cinco, 10 e 15 minutos seqüenciais.

Teste da libido individual em piquete: neste teste, os animais após pré-estimulação coletiva e individual em piquetes anexos ao local do teste, foram colocados junto com as fêmeas (20 vacas, com três em cio), em piquete com aproximadamente 900 m² (30 x 30 m), sendo observados por cinco, 10 e 15 minutos seqüenciais.

Teste da libido coletivo em piquete: neste teste, os animais após pré-estimulação coletiva em piquetes anexos ao local do teste, foram colocados em grupos de três junto com as fêmeas (20 vacas, com cinco em cio), em piquete com aproximadamente 900 m² (30 x 30 m), sendo observados por cinco, 10 e 15 minutos seqüenciais.

Os principais comportamentos padronizados para observação durante a avaliação foram os descritos por Chenoweth (1984):

- 0) o touro não mostrou interesse sexual pela fêmea;
- 1) interesse sexual mostrado apenas uma vez (ex: cheirar a região perineal);
- 2) positivo interesse pela fêmea em mais de uma ocasião (ex: reflexo de Flehmen);
- 3) ativa perseguição da fêmea com persistente interesse sexual (ex: impulso de monta);
- 4) uma monta ou tentativa de monta, mas nenhum serviço;
- 5) duas montas ou tentativas de monta, mas nenhum serviço;
- 6) mais de duas montas ou tentativas de monta, nenhum serviço;
- 7) um serviço (monta completa ou cópula) seguido por nenhum interesse sexual;
- 8) um serviço seguido por interesse sexual, incluindo montas ou tentativas de monta;
- 9) dois serviços seguidos por nenhum interesse sexual;
- 10) dois serviços ou mais, seguidos por interesse sexual, incluindo montas, tentativas de monta e serviços.

As observações/anotações foram realizadas por quatro observadores posicionados em pontos distintos do curral, escondidos e interferindo o mínimo possível no comportamento dos animais.

Para cada atitude dos touros frente às vacas foi atribuída uma pontuação, e após o término do teste da libido, foi feita a leitura complementar ou média entre as planilhas dos observadores, sendo os touros classificados em três categorias:

- Baixa libido – comportamentos 0, 1, 2 e 3;
- Média libido – comportamentos 4, 5 e 6;
- Alta libido – comportamentos 7, 8, 9 e 10.

Realizou-se, ainda, a anotação de todo evento comportamental realizado pelos touros durante os testes, para a verificação da frequência de cada comportamento nos diferentes testes e diferentes tempos de observação.

Os touros foram reavaliados andrologicamente após os testes, para a tomada das características andrológicas dos animais próximo a realização dos testes; foram ainda, submetidos a coleta de sangue por punção da veia jugular, para avaliação das concentrações séricas de testosterona (Capítulo 2), na busca de associações entre a libido, as características andrológicas e a concentração sérica de testosterona.

As vacas utilizadas no teste foram avaliadas ginecologicamente e tiveram o estro induzido por hormonioterapia, com aplicação intramuscular de 5 ml de cipionato de estradiol (E.C.P.^{®*}) e 3 ml de prostaglandina sintética (Ciosin^{®**}). As fêmeas eram substituídas constantemente, ou a cada duas montas completas, para evitar recusa a novos serviços.

Para a comparação das frequências de manifestações dos diferentes

*Laboratório Pfizer

**Laboratório Schering-Plough

comportamentos dos touros frente as vacas, e a associação entre os eventos e entre estes e diferentes características andrológicas, agrupou-se os eventos em basicamente cinco eventos:

- Cheirar a região perineal (CRP);
- Reflexo de Flehmen (RF);
- Impulso de monta (IM);
- Tentativa de monta ou monta abortada (TM/MA);
- Monta completa (MC).

3.3. Análise dos Dados

As comparações da classificação final dos animais nos diferentes testes e nos diferentes tempos, assim como as freqüências dos comportamentos dos touros foram feitas como análises não paramétricas usando-se o teste de Wilcoxon, para pares ordenados, e testes de Kruskall Wallis e Mann-Withney, para grupos diferentes de animais, segundo proposição de Sampaio (2002). Para a análise de comparação das freqüências dos eventos entre os testes, foi adotado o teste de maior duração (15 minutos).

Para a análise das correlações entre os eventos comportamentais utilizou-se a correlação de Spearman, recomendada para dados não paramétricos, também segundo Sampaio (2002). Para o cálculo das correlações entre os eventos comportamentais; e entre estes e as características andrológicas, peso corporal e idade dos animais, o escore utilizado para o cálculo foi o da pontuação máxima de cada animal no teste individual de maior duração.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tab. 1 são apresentadas às médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, CE, características físicas e morfológicas do sêmen e CAP para touros Guzerá, submetidos a teste da libido em curral e piquete. Observou-se, que não houve diferenças ($p>0,05$) entre as características avaliadas sugerindo uniformidade entre os grupos, e ausência de influência destas características no desempenho dos animais. Os resultados encontrados são semelhantes aos descritos para touros Guzerá por Trocóniz et al. (1991) e Torres Júnior (2004).

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, circunferência escrotal e características seminais em touros da raça Guzerá, submetidos a avaliação da libido em curral e piquete

	Idade (meses)	Peso (Kg)	CE (cm)	Mot (%)	Vigor* (0-5)	DM (%)	DT (%)	Vol (ml)	Conc ($\times 10^6$ sptz/ml)	CAP* (0-100)
Curral	29,8 ± 3,1	463,5 ± 97,4	31,9 ± 2,6	58,3 ± 8,3	4,2 ± 0,7	7,8 ± 5,2	19,5 ± 6,4	9,0 ± 1,4	284,4 ± 102,1	66,5 ± 13,8
	Piquete	28,9 ± 3,2	464,6 ± 105,7	32,7 ± 2,6	62,0 ± 5,8	4,3 ± 0,6	7,1 ± 3,0	19,5 ± 6,6	9,0 ± 1,5	284,5 ± 184,4

Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre as características pelo teste de Fisher (características paramétricas) e pelo teste de Mann-Whitney (características não paramétricas)*. OBS: Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Mot = motilidade espermática; Vigor = vigor espermático; DM = defeitos espermáticos maiores; DT = total de defeitos espermáticos; Vol = volume seminal; Conc = concentração espermática; CAP = classificação andrológica por pontos.

Observou-se, de forma geral, baixa resposta dos animais aos testes, uma vez que menos da metade dos animais foi classificada com libido média ou alta (Tab. 2). Apenas no teste coletivo em curral, a maioria dos animais (58,3%) respondeu adequadamente

ao teste; entretanto, notou-se aumento apenas no número de animais classificados com libido média. No teste individual em piquete, não foram classificados animais com libido alta.

Tabela 2 – Distribuição de touros jovens Guzerá, como resultado de sua classificação em teste da libido por 15 minutos

	Curral (%)		Piquete (%)	
	Individual	Coletivo	Individual	Coletivo
Alta	16,7	16,6	0,0	16,7
Média	16,7	41,7	25,0	16,7
Baixa	66,6	41,7	75,0	66,6

De forma geral, observou-se que, independentemente da metodologia utilizada para avaliação do comportamento sexual, os eventos foram realizados por uma porcentagem similar de machos. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Jiménez-Severiano (2002), que reportaram menos de 20% de montas completas em machos das raças Holandês e Pardo-Suiço, com idades variando de seis a 16 meses.

Fonseca et al. (1997), avaliando touros adultos da raça Nelore por 10 minutos, observaram resultados semelhantes, com 50,8; 45,6; 3,6 e 0,0%, de animais classificados como questionáveis, bons, muito bons e excelentes, respectivamente. Já Santos et al. (2004) observaram, em teste de libido por 10 e 15 minutos, também com animais adultos, 32,1; 42,9; 21,4 e 3,6%, e 26,8; 25,0; 42,8 e 5,4%, respectivamente, utilizando o mesmo critério de classificação descrito anteriormente. Os autores alegaram que o aumento no tempo de avaliação de 10 para 15 minutos reduziu o percentual de touros classificados como de boa ou questionável libido e elevou o de touros com libido muito boa e excelente.

Os resultados obtidos nos testes mostram inibição dos animais na manifestação dos eventos comportamentais e sugerem que tais resultados devem-se, provavelmente, à baixa idade, aliada a inexperiência sexual dos animais avaliados, semelhante aos descritos por Torres Júnior (2004) que, trabalhando com machos jovens Guzerá, observou que o aumento da frequência de eventos sexuais, em machos sem

experiência sexual, ocorreu em função da idade.

Segundo Hafez (1995), a eficiência da cópula de machos e fêmeas é melhorada pela experiência e contatos individuais antes da puberdade podem proporcionar um efeito organizador sobre o desempenho sexual subsequente.

Phillips (1993), citado por Quirino et al. (2004), sugeriu que, em touros de raças européias variações quanto à classificação da libido poderiam existir em função da inexperiência sexual, quando comparados aos animais mais velhos. Entretanto, Zuin (2000), ao estudar o comportamento de touros Nelore aos dois, e posteriormente aos três anos de idade, não observou qualquer efeito da experiência sexual prévia nos diversos comportamentos avaliados.

Na Tab. 3 encontram-se as médias e desvios-padrão dos escores classificatórios da libido em touros Guzerá, em diferentes sistemas e tempos de avaliação. Observou-se menor variação na pontuação entre os tempos, no teste individual em curral com escore 3,0 em cinco minutos e 3,3 em 15 minutos de avaliação ($p>0,05$). A maior variação ocorreu no teste coletivo em curral com escore 2,0 em cinco minutos de avaliação e 3,6 com 15 minutos ($p<0,05$). As menores notas foram registradas nos testes coletivo em curral e piquete, ambos com escore 2,0 em cinco minutos de avaliação, e a maior pontuação ocorreu no teste coletivo em curral com escore 3,6 em 15 minutos.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão dos escores da libido, em avaliação individual e coletiva, em curral e piquete, com diferentes tempos de observação em touros jovens da raça Guzerá

Tratamento		Tempo de avaliação (minutos)		
		5	10	15
Curral	Individual	3,0 ± 2,3 ^{aA}	3,0 ± 2,3 ^{aA}	3,3 ± 2,3 ^{aA}
	Coletivo	2,0 ± 3,1 ^{aA}	2,8 ± 2,8 ^{aA}	3,6 ± 2,6 ^{bA}
Piquete	Individual	2,1 ± 1,2 ^{aA}	2,3 ± 1,5 ^{aA}	2,5 ± 1,4 ^{aA}
	Coletivo	2,0 ± 1,8 ^{aA}	2,6 ± 2,5 ^{bA}	2,9 ± 2,7 ^{bA}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon e letras maiúsculas semelhantes na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelos teste de Mann-Whitney e Wilcoxon.

No teste coletivo em piquete as avaliações por 10 e 15 minutos mostraram-se superiores a avaliação por cinco minutos com escores de 2,6; 2,9 e 2,0, respectivamente.

Pineda et al. (1997) observaram em touros Nelore, com 96 meses de idade, pontuação média de 4,5 em avaliação por 10 minutos, semelhante ao descrito por Santos et al. (2004) utilizando touros da mesma raça e mesmo tempo de avaliação.

Chenoweth et al. (1979) encontraram em touros jovens *Bos taurus taurus*, em teste da libido por 10 minutos, pontuação média de 5,7 e sugeriram que embora a pontuação no teste possa ser um método útil de avaliação da conduta sexual dos animais, isso não quer dizer que seja o método mais adequado.

Santos et al. (2004) encontraram diferença na pontuação de touros Nelore adultos em dois tempos de avaliação, sugerindo que o tempo de 10 minutos poderia interferir negativamente no desempenho sexual dos touros, quando comparado a avaliação por 15 minutos (4,5 vs 5,5). Oliveira et al. (2007) também questionam o tempo de avaliação de 10 minutos em curral, sugerindo ser insuficiente para expressão do potencial sexual dos animais.

Quando se compararam os testes nos tempos de avaliação, observou-se não existir diferenças ($p > 0,05$) entre os métodos utilizados, indicando que, independentemente do método proposto

para avaliar o comportamento dos touros frente a vacas em estro, a resposta obtida não mudará a classificação dos animais. Os resultados sugerem que os métodos utilizados mostraram-se eficientes em detectar a expressão de interesse sexual, bem como avaliar os padrões comportamentais durante o cortejo sexual em machos jovens Guzerá, sem experiência sexual.

Observou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) entre idade, CE, características seminais e CAP entre os animais classificados com alta, média e baixa libido, indicando não haver influência dessas características na classificação final desses animais (Tab. 4).

Chenoweth et al. (1984) encontraram resultado semelhante sobre a influência da idade na libido dos animais, trabalhando com touros jovens das raças Angus e Hereford, alegando ausência desta influência, pela relativa inexperiência na habilidade de monta em touros jovens. Pineda et al. (2000) verificaram efeito da idade afetando significativamente a libido que, segundo os autores, se deve ao fato deste efeito estar associado ao desenvolvimento/maturidade sexual do animal; de acordo com o modelo utilizado pelos autores para descrever este efeito, para cada mês de aumento na idade houve acréscimo de $0,16 \pm 0,03$ pontos na libido. Os autores registraram ainda, efeito da CE aos 12 e 18 meses de idade sobre a libido dos animais, que segundo os mesmos acrescia a cada centímetro de aumento na

CE em $0,06 \pm 0,04$ e $0,16 \pm 0,06$ pontos na libido, respectivamente. Estes resultados não foram encontrados neste trabalho

devido, provavelmente, a homogeneidade dos animais estudados.

Tabela 4 – Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, circunferência escrotal, características seminais e concentrações plasmáticas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá, com diferentes manifestações da libido

	Idade (meses)	Peso (Kg)	CE (cm)	Mot (%)	DM (%)	DT (%)	Vol (ml)	Conc ($\times 10^6$ sptz/ml)	CAP* (0-100)	Testost (ng/ml)
Alta	31,4 \pm 1,5 ^a	616,5 \pm 61,5 ^a	35,8 \pm 2,3 ^a	65,0 \pm 7,1 ^a	4,0 \pm 1,4 ^a	13,0 \pm 2,8 ^a	10,5 \pm 0,7 ^a	377,5 \pm 46,0 ^a	84,0 \pm 11,3 ^a	2,97 \pm 0,03 ^a
Média	30,7 \pm 3,0 ^a	514,4 \pm 116,7 ^{ab}	32,2 \pm 3,3 ^a	60,0 \pm 12,2 ^a	5,8 \pm 1,6 ^a	20,0 \pm 9,4 ^a	9,7 \pm 1,9 ^a	380,0 \pm 165,7 ^a	68,8 \pm 15,3 ^a	2,34 \pm 1,27 ^a
Baixa	28,7 \pm 3,2 ^a	431,3 \pm 75,7 ^b	31,9 \pm 2,3 ^a	59,7 \pm 5,7 ^a	8,4 \pm 4,6 ^a	20,2 \pm 5,4 ^a	8,6 \pm 1,2 ^a	240,8 \pm 137,4 ^a	69,6 \pm 15,3 ^a	0,91 \pm 0,82 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$), pelo teste de SNK e Kruskal-Wallis (características não paramétricas)*. OBS: Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Mot = motilidade espermática; Vigor = vigor espermático; DM = defeitos espermáticos maiores; DT = total de defeitos espermáticos; Vol = volume seminal; Conc = concentração espermática; CAP = classificação andrológica por pontos; Testost = testosterona.

Não se encontraram diferenças ($p > 0,05$) entre as características físicas e morfológicas do sêmen e CAP em touros com libido alta, média e baixa. Os resultados concordam com os descritos na literatura (Barbosa, 1987; Salvador, 2001; Salvador et al. 2003).

Tais resultados reforçam a importância da avaliação clínica dos órgãos genitais e análise do sêmen na seleção andrológica dos reprodutores, mostrando ser a libido um teste complementar importantíssimo no sentido de aumentar a segurança na avaliação do potencial reprodutivo dos touros para uso com maiores proporções touro:vaca, durante a estação de monta, conforme sugerido por Salvador et al. (2003). O fato da CAP não diferir entre os grupos, pode ser explicado por ser este um método de seleção de reprodutores que leva em consideração a CE e as características físicas e morfológicas do sêmen, aspectos estes que não diferiram neste estudo.

Constatou-se diferença ($p < 0,05$) no peso corporal entre os animais de alta e baixa libido sugerindo efeito de ambiente na manifestação do interesse sexual e dos eventos comportamentais do cortejo (Tab. 4). Chenoweth et al. (1979) estudando o

comportamento sexual de touros jovens *Bos taurus taurus*, registraram diferenças na manifestação dos eventos sexuais entre grupos, sugerindo que tais diferenças poderiam ser devido aos fatores raça e nutricional.

Pruitt & Corah (1985) comentam que a ingestão de baixos níveis de energia pode ser prejudicial ao desempenho reprodutivo de touros jovens por atrasar a puberdade e reduzir a libido. De acordo com Quirino et al. (2004) a libido pode ser significativamente afetada pelo peso corporal em qualquer idade, indicando cuidado com a alimentação dos animais. Chenoweth (1986) sugere que alguns touros, particularmente o *Bos taurus indicus*, podem apresentar deficiência temporária na libido por influência ambiental.

Registraram-se diferenças ($p < 0,05$) nos níveis séricos de testosterona em touros com alta e média libido, quando comparados a touros de baixa libido, semelhante ao descrito por Smith et al. (1981). Entretanto, os resultados são diferentes da maioria dos registrados na literatura (Chenoweth et al., 1979; Barbosa, 1987; Price et al., 1986; Santos et al., 2004a) que não reportaram

associação entre os níveis circulantes de testosterona e o desempenho sexual de touros. Price et al. (1986) concluíram que as diferenças individuais no comportamento sexual não podem ser previstas com base nos níveis circulantes de testosterona e hormônio luteinizante (LH).

Pode-se especular que a menor concentração sérica de testosterona encontrada em touros com baixa libido, seja reflexo da pior condição corporal destes animais, já que os mesmos apresentaram menor peso corporal que os animais de alta libido. Entretanto, Hafez (1995) sugere certa especificidade sexual de hormônios esteróides, levantando a questão da influência direta do hormônio sobre o comportamento sexual; e Smith et al. (1981) concluíram que as diferenças na capacidade de serviço de touros com diferentes concentrações de testosterona, foram resultados da resposta dos órgãos alvo aos níveis deste hormônio.

A seguir serão apresentados os resultados das freqüências médias dos eventos comportamentais em touros Guzerá, manifestados durante os testes da libido; sendo os comportamentos de cheirar e lamber a região perineal (CRP), reflexo de Flehmen (RF), impulso de monta (IM), tentativa de monta/monta abortada (TM/MA) e monta completa (MC) descritos para touros de alta; os comportamentos CRP, RF, IM e TM/MA para os de média; e os comportamentos CRP, RF e IM para os de baixa libido. Esses eventos de manifestação sexual podem, ainda, ser divididos em comportamentos de identificação (CRP, RF), pré-copulatórios (IM, TM/MA) e copulatórios (MC) (Santos, 2001; Torres Júnior, 2004).

Na Fig. 1 é apresentada a freqüência dos eventos de comportamento sexual, em touros da raça Guzerá, em teste da libido individual em curral.

Teste da Libido Individual em Curral

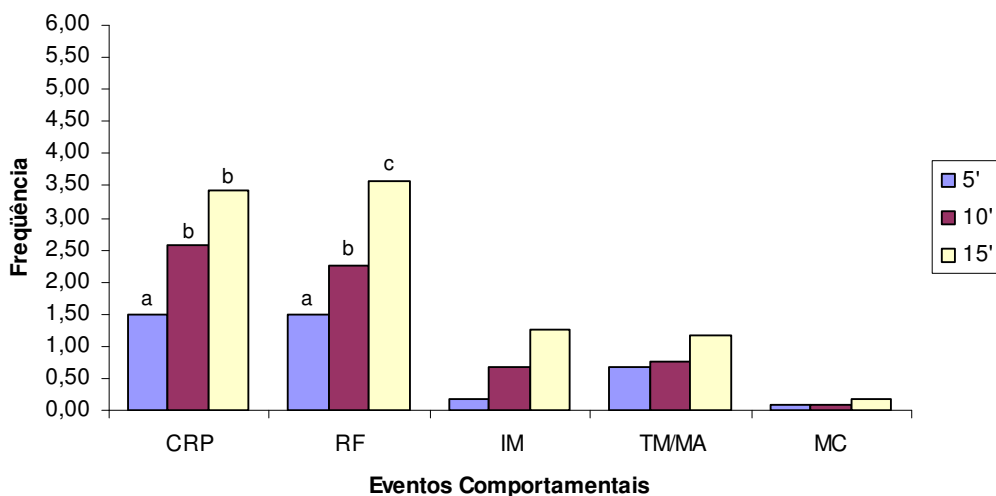


Figura 1 – Freqüência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá em teste da libido individual em curral, com diferentes tempos de avaliação.

OBS: Letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa; 5' = cinco minutos; 10' = 10 minutos; 15' = 15 minutos.

Observou-se que os eventos com maior frequência de manifestação foram os de identificação, principalmente os eventos CRP e RF, independentemente do tempo de avaliação. Registrou-se baixa incidência dos eventos de impulso de monta (IM) e, tentativa de monta/monta abortada (TM/MA), com incidência mínima para o evento de monta completa (MC), conforme relatado por Torres-Júnior (2004). Quando se comparou a frequência de manifestação dos eventos entre os tempos de avaliação, registrou-se diferença ($p < 0,05$) apenas nos

eventos CRP e RF, com o RF aumentando juntamente com o aumento no tempo de avaliação.

Não se registrou diferença entre os eventos nos animais com alta, média e baixa libido, em avaliação individual em curral (Tab. 5); constatou-se que os eventos indicativos de interesse sexual ou reconhecimento da fêmea em estro foram manifestados por um maior número de animais, independente de sua classificação final.

Tabela 5 – Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá em avaliação individual em curral

	Eventos Sexuais				
	CRP	RF	IM	TM/MA	MC
Alta	3,5 ± 0,7	7,5 ± 4,9	3,5 ± 4,9	2,5 ± 0,7	1,0 ± 0,0
Média	4,5 ± 2,1	4,0 ± 1,4	4,0 ± 5,6	4,5 ± 4,9	-
Baixa	3,1 ± 3,0	2,5 ± 1,6	-	-	-

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as características pelos testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. OBS: CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa.

Na Fig. 2 é apresentada a frequência dos eventos de comportamento sexual, em

touros da raça Guzerá em teste da libido coletivo em curral.

Teste da Libido Coletivo em Curral

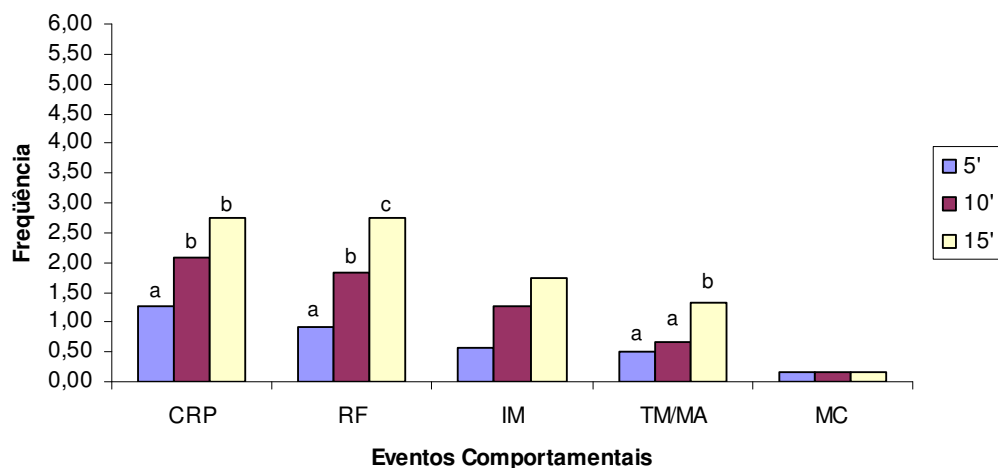


Figura 2 – Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá em teste da libido coletivo em curral, com diferentes tempos de avaliação.

OBS: Letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa; 5' = cinco minutos; 10' = 10 minutos; 15' = 15 minutos.

Semelhante ao encontrado na avaliação individual, os eventos com maior frequência de manifestação foram os de identificação CRP e RF, com baixa ocorrência de realização de MC. Quando se comparou a frequência de manifestação dos eventos entre os tempos de avaliação, registrou-se diferença ($p < 0,05$) nos eventos CRP, RF e TM/MA. O evento TM/MA é classificado como evento pré-copulatório, o que sugeriu

maior disposição dos animais em realizar serviço completo, com o aumento no tempo de observação, neste sistema de avaliação.

Quando se divide os animais avaliados no sistema coletivo em curral (Tab. 6) pela classificação no teste (alta, média e baixa libido), não se encontram diferenças ($p < 0,05$) entre a frequência de manifestação dos eventos.

Tabela 6 – Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá em avaliação coletiva em curral

	Eventos Sexuais				
	CRP	RF	IM	TM/MA	MC
Alta	5,5 ± 6,3	5,0 ± 1,4	8,5 ± 6,3	3,5 ± 2,1	1,0 ± 0,0
Média	3,2 ± 2,6	3,8 ± 3,7	0,8 ± 1,7	1,8 ± 1,3	-
Baixa	1,2 ± 1,3	0,8 ± 0,8	-	-	-

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as características pelos testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. OBS: CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa.

Nas Figuras 3 e 4 são apresentadas as frequências dos eventos de comportamento sexual em teste da libido individual e coletivo, em piquete. Observou-se, assim como nos testes em curral, que os eventos com maior frequência de manifestação foram os de identificação, principalmente os eventos CRP e RF, independentemente do tempo de avaliação. Constatou-se ainda, baixa incidência de MC nos testes, com frequência menor que as observadas nos testes em curral; sendo que, no teste

individual, nenhum reprodutor realizou serviço completo e, no teste coletivo, isto ocorreu somente após os cinco minutos iniciais de observação.

Quando se comparou a frequência de manifestação dos eventos entre os tempos de avaliação no teste individual em piquete (Fig. 3), registrou-se diferença ($p < 0,05$) para os eventos CRP e RF, que aumentaram juntamente com o tempo, diferindo entre cinco, 10 e 15 minutos de avaliação.

Teste da Libido Individual em Piquete

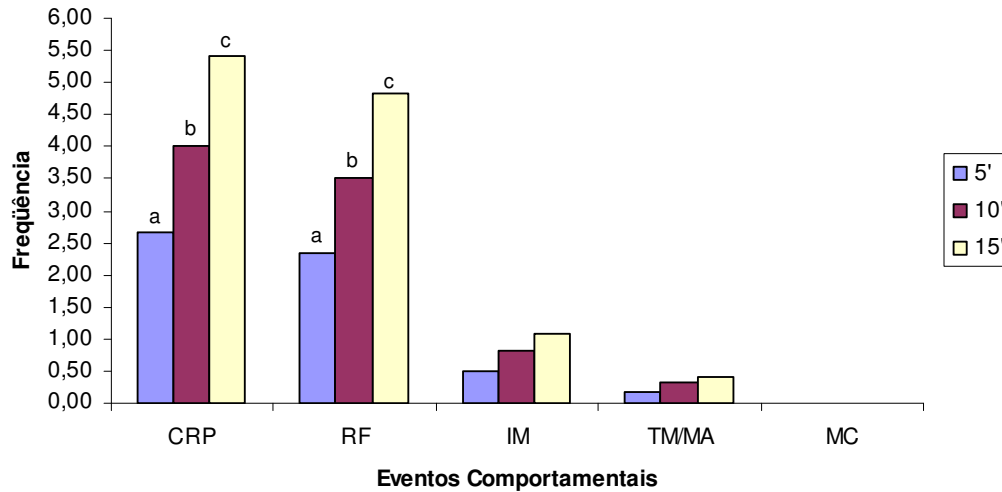


Figura 3 – Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá em teste da libido individual em piquete, com diferentes tempos de avaliação.

OBS: Letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa; 5' = cinco minutos; 10' = 10 minutos; 15' = 15 minutos.

Teste da Libido Coletivo em Piquete

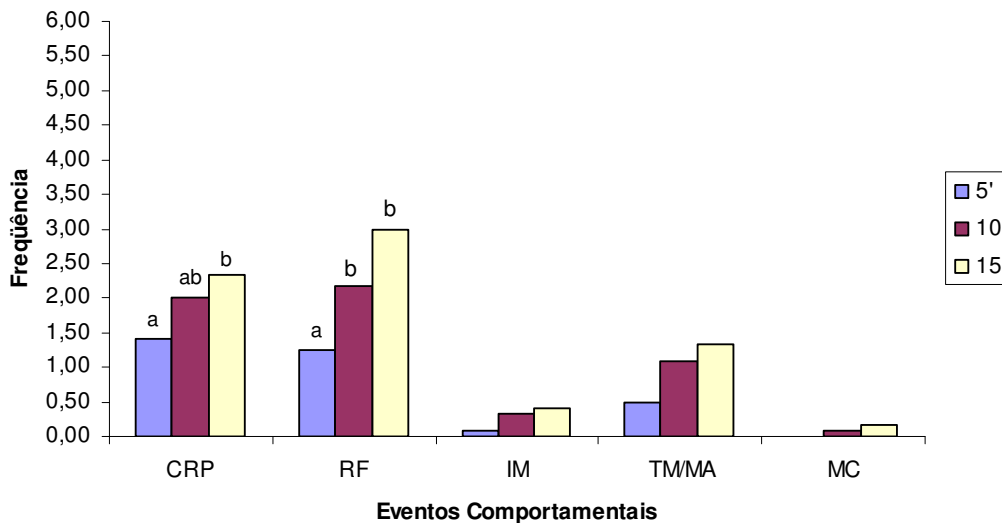


Figura 4 – Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá em teste da libido coletivo em piquete, com diferentes tempos de avaliação.

OBS: Letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa; 5' = cinco minutos; 10' = 10 minutos; 15' = 15 minutos.

No teste individual em piquete não foi encontrado animal classificado como de alta libido (Tab. 7). Apesar de não existir diferença entre a frequência dos eventos CRP e RF nos animais de média e baixa libido, observou-se maior incidência destes

nos touros de média libido; registrou-se diferença ($p < 0,05$) na ocorrência de IM entre as categorias da libido, sendo este um evento auxiliar na identificação das fêmeas em estro, conforme Santos (2001) e Oliveira et al.(2007).

Tabela 7 – Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá, em avaliação individual em piquete

	Eventos Sexuais				
	CRP	RF	IM	TM/MA	MC
Alta	-	-	-	-	-
Média	8,0 ± 4,5	8,3 ± 2,5	3,6 ± 2,0 ^a	1,6 ± 1,1	-
Baixa	4,5 ± 4,5	3,6 ± 3,5	0,2 ± 0,6 ^b	-	-

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste Mann-Whitney. OBS: CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa.

Assim como observado nos demais sistemas de avaliação da libido, as frequências dos eventos diferiram apenas nos comportamentos CRP e RF, no teste coletivo em piquete (Fig. 4), mostrando a importância desses eventos na manifestação do interesse sexual e no cortejo.

Quando se comparou a frequência de manifestação dos eventos de comportamento sexual em touros Guzerá com diferentes classificações quanto à libido, em sistema coletivo em piquete (Tab. 8), observou-se maior incidência dos eventos nos animais de alta libido, a exceção da TM/MA, maior nos animais de média libido ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Médias e desvios-padrão da frequência de eventos sexuais em touros da raça Guzerá em avaliação coletiva em piquete

	Eventos Sexuais				
	CRP	RF	IM	TM/MA	MC
Alta	5,5 ± 2,1	8,5 ± 0,7	1,5 ± 2,1	1,5 ± 0,7	1,0 ± 0,0
Média	3,0 ± 0,0	3,0 ± 1,4	0,5 ± 0,7	6,5 ± 3,5	-
Baixa	1,3 ± 2,7	1,6 ± 4,2	0,1 ± 0,3	-	-

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as características pelos testes de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. OBS: CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa.

Os resultados apresentados indicam que machos jovens da raça Guzerá, sem experiência sexual prévia, podem manifestar interesse sexual por fêmeas em estro, em teste da libido. Apesar da menor frequência na manifestação dos eventos, quando comparados com *Bos taurus taurus* (Chenoweth et al., 1979; Neville Jr. et al., 1988) e com *Bos taurus indicus*, em idades mais avançadas e experientes sexualmente (Santos, 2001; Salvador et al., 2003; Santos et al., 2004; Costa e Silva, 2002), pôde-se constatar certa eficiência nos testes na detecção de animais com maiores potenciais de cobertura.

Crudeli (1990) sugeriu que o teste da libido não está perfeitamente adequado ao temperamento dos zebuínos, bastante nervoso e sensível ao estresse em ambiente diferente ao que se encontra acostumado. Silva (1994) enfatizou que o touro zebu comporta-se com restrições em currais fechados; entretanto destacou que a tentativa de realizar estes testes em ambiente mais natural como piquetes, resultou em fracasso, principalmente por problemas relacionados às fêmeas.

A utilização de fêmeas em estro, juntamente com as fora de estro, durante a realização

dos testes foi importante para comprovar que os machos foram atraídos às fêmeas em estro, concentrando os eventos sexuais, quase em sua totalidade, sobre estas; semelhante ao descrito na literatura para avaliação em zebuínos (Silva, 1994; Torres Júnior, 2004); indicando que o estado reprodutivo da fêmea foi determinante como estímulo ao comportamento sexual do touro (Santos, 2001).

Observou-se que os eventos classificados como de identificação foram os com maior incidência neste trabalho, com os eventos de cheirar e lambar a região perineal (CRP) e reflexo de Flehmen, com ocorrência variando de 50 a 100% e 33,3 a 91,6%, respectivamente, nos sistemas testados para avaliação dos animais, mostrando a importância de tais eventos na manifestação do desejo sexual nesses animais, fato também reportado por outros pesquisadores (Costa e Silva et al, 1999; Santos, 2001; Salvador et al., 2003).

Silva (1994) levanta a questão dos valores atribuídos a cada atitude do comportamento sexual, onde as mais importantes são os serviços completos, seguidos das tentativas de monta e montas; entretanto cita fatos que contradizem a valorização destas atitudes na subespécie zebuína, onde o cortejo é mais demorado e envolvente, resultando em menor número de montas, conforme observado neste estudo.

Salvador (2001) ao estudar o comportamento sexual de touros Nelore adultos, observou que touros de alta libido foram mais diretos ou mais rápidos na realização dos comportamentos copulatórios, com menor frequência de RF que os touros classificados como de baixa libido, fato não observado neste estudo. O autor sugeriu ainda que touros com comportamentos mais diretos durante os testes da libido em curral, podem também ser os de maior dominância a campo, semelhante ao descrito por Costa e Silva

(2000) ao observar que, em touros Nelore, em acasalamentos múltiplos, o estabelecimento da relação de dominância, determinava que os subordinados praticavam com maior frequência os comportamentos de identificação de fêmeas no cio e os dominantes mostrando-se mais rápidos em atingir os eventos copulatórios.

O impulso de monta (IM), evento caracterizado como um leve e súbito movimento do touro em direção a fêmea, com a retirada ou não dos membros anteriores do solo, sem apoio sobre a fêmea; e a tentativa de monta/monta abortada (TM/MA), foram eventos com ocorrência semelhante neste trabalho, diferente do registrado por vários outros pesquisadores (Santos, 2001; Costa e Silva, 2002; Torres Júnior, 2004). Estes autores encontraram maior ocorrência de IM, alegando que este evento está associado a uma forma de excitação, assim como, a uma forma de identificar a receptividade da fêmea e eventual melhor momento para realização da cópula. Já Santos (2001), caracteriza a TM/MA como evento pouco expressivo para expressar o comportamento de touros zebuínos, diferentemente do exposto por Chenoweth (1974) para touros taurinos.

Torres Júnior (2004) trabalhando com touros jovens da raça Guzerá, em avaliação individual e coletiva, observou que comportamentos de identificação (CRP e RF) tenderam a ser mais frequentemente manifestados quando os animais foram avaliados coletivamente e o IM foi discretamente mais freqüente quando avaliados individualmente, o que não ocorreu no presente estudo.

O comportamento de MC foi o evento de menor ocorrência nos sistemas de avaliação utilizados, com frequência de 0 a 16,6% entre os animais avaliados. Chenoweth et al. (1996) também trabalhando com machos zebuínos (Brahman e Nelore x Brahman), de até 20 meses de idade, não reportaram a

ocorrência de montas completas, em teste com 10 minutos de duração, porém utilizando fêmeas contidas e sem manifestação do estro.

Na Fig. 5 encontram-se as frequências de manifestação de eventos de comportamento sexual entre diferentes sistemas de avaliação. Observa-se diferença apenas no evento CRP entre os testes individual e coletivo em piquete; o que sugere não existir diferença na manifestação dos eventos pelos animais, quando em avaliações individual e coletiva, em curral e piquete. Torres Júnior (2004) não encontrou diferença entre os sistemas de avaliação

individual e coletivo, em avaliação de comportamento sexual de tourinhos Guzerá em piquete, sugerindo que ambos foram eficazes em detectar a expressão do interesse sexual.

Desta forma, pode-se especular que não há diferença entre os métodos de avaliação, curral ou piquete, em touros jovens Guzerá, e que talvez o maior entrave na avaliação do comportamento desses animais seja a inexperiência sexual, reforçando ainda mais o que sugeriu Salvador (2001), que a libido é um teste complementar na avaliação de reprodutores para alto potencial de cobrição.

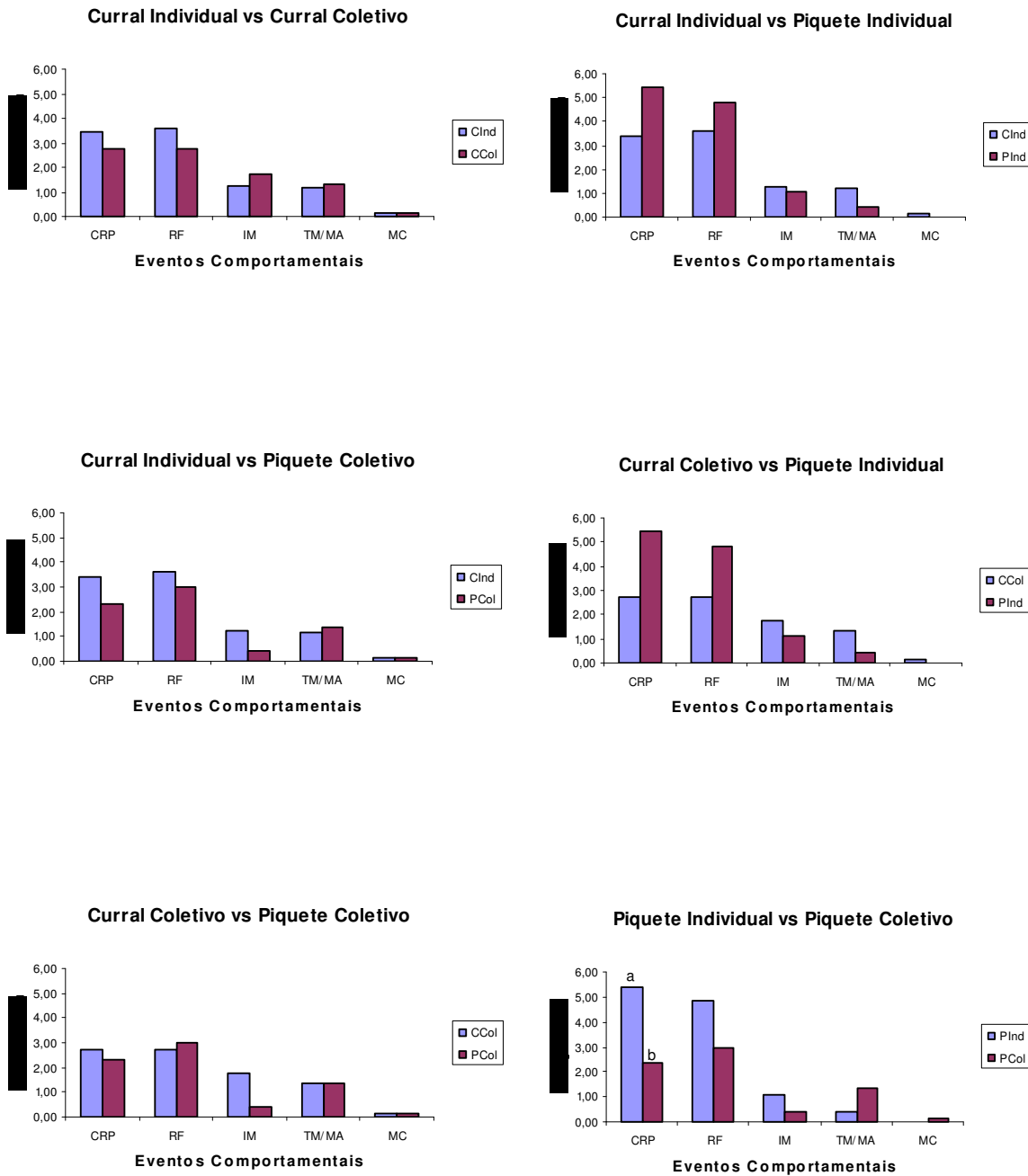


Figura 5 – Frequência de eventos de comportamento sexual em touros jovens da raça Guzerá, em teste da libido individual e coletivo, em curral e piquete.

OBS: Letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney.

CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa; CIInd = curral individual; CCol = curral coletivo; PInd = piquete individual; PCol = piquete coletivo.

Observaram-se, de forma geral, associações favoráveis entre os eventos em teste da libido individual (Tab. 9), sugerindo que touros que mais manifestam eventos em teste da libido são os com maiores chances de realizar a cópula.

Estes resultados concordam com relatos de Costa e Silva et al. (1998) e Salvador (2001), que utilizando touros Nelore, observaram que o comportamento de IM é uma atitude importante e está ligada ao início das atitudes de monta.

Tabela 9 - Correlações de Spearman entre a frequência dos eventos de comportamento sexual em touros Guzerá em teste da libido em avaliação individual

	CRP	RF	IM	TM/MA
RF	0,72 (0,0005)*	-	-	-
IM	0,59 (0,0044)	0,53 (0,0103)	-	-
TM/MA	0,47 (0,0242)	0,57 (0,0061)	0,83 (<0,0001)	-
MC	0,40 (0,0497)	0,51 (0,0130)	0,67 (0,0012)	0,75 (0,0003)

OBS: * = nível de significância. CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa.

Assim como descrito para touros em teste da libido individual, observaram-se associações favoráveis entre os diferentes

eventos manifestados no teste da libido coletivo (Tab. 10).

Tabela 10 - Correlações de Spearman entre a frequência dos eventos de comportamento sexual em touros Guzerá em teste da libido em avaliação coletiva

	CRP	RF	IM	TM/MA
RF	0,75 (0,0003)*	-	-	-
IM	0,52 (0,0126)	0,66 (0,0014)	-	-
TM/MA	0,60 (0,0038)	0,65 (0,0016)	0,67 (0,0011)	-
MC	0,56 (0,0067)	0,64 (0,0020)	0,78 (0,0002)	0,65 (0,0018)

OBS: * = nível de significância. CRP = cheirar a região perineal; RF = reflexo de Flehmen; IM = impulso de monta; TM/MA = tentativa de monta/monta abortada; MC = monta completa.

Constatou-se, ainda, semelhança entre os valores observados no teste individual (Tab. 9), que somado a correlação favorável (0,83) entre os testes (Tab. 11), sugerem não existir influência da presença de mais de um reprodutor na manifestação dos eventos e, conseqüentemente, na classificação final dos animais durante a realização da avaliação.

A maior incidência dos eventos de identificação (CRP, RF e IM), aliada as associações favoráveis entre estes, ou entre estes e a monta completa, concordam com os resultados descritos por Costa e Silva (2002), que sugere relação de dependência

entre IM e CRP com a ocorrência de MC, em touros Nelore, mostrando que o IM, comportamento descrito apenas em zebuínos, é uma atitude importante e está ligada ao início das atitudes de monta, conforme relataram Costa e Silva et al. (1998) e Salvador (2001), em touros Nelore.

Costa e Silva (2002) relatou ainda que tal dependência traz nova informação sobre o perfil comportamental desses animais, onde CRP além de ser componente de identificação da fêmea em cio, parece ter importância fundamental na excitação do touro, classificando a olfação como um recurso sensorial tão fundamental quanto a

visão para determinar o momento da finalização do cortejo.

Os resultados sugerem que os eventos de identificação deveriam ser melhor pontuados durante a realização dos testes utilizados na avaliação do comportamento sexual de zebuínos, principalmente em touros jovens e sem experiência sexual; devendo levar em consideração o comportamento adaptativo, típico desta subespécie. Mader & Price (1984) citaram que, em situação de acasalamento natural, comportamentos sexuais que não culminem com serviço completo não necessariamente representam desperdício de tempo e energia.

Costa e Silva (2002) sugere revisão nas metodologias dos testes comportamentais, indicando adequação aos mesmos de forma a privilegiar eventos importantes para o sucesso reprodutivo dos touros a campo. Sugere ainda, mais estudos para confirmar a hipótese de que comportamentos como CRP e IM, importantes na determinação da cópula em touros Nelore, têm componentes adaptativos e se são herdáveis, com possibilidade de seleção.

Constatou-se que as correlações entre a libido e as características seminais, foram mais favoráveis na avaliação individual, sendo tais resultados de difícil interpretação (Tab. 11).

Tabela 11 - Correlações de Spearman entre a libido individual e coletiva, e idade, peso corporal, características seminais, classificação andrológica por pontos e concentrações séricas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá

	Avaliação	
	Individual	Coletiva
Idade (meses)	0,44 (0,0337)*	0,41 (0,0461)
Peso corporal (Kg)	0,56 (0,0065)	0,46 (0,0247)
Circunferência escrotal (cm)	0,39 (0,0568)	0,27 (0,1961)
Motilidade espermática (%)	0,44 (0,0325)	0,25 (0,2182)
Vigor espermático (0-5)	0,35 (0,0892)	0,23 (0,2615)
Turbilhonamento espermático (0-5)	0,41 (0,0495)	0,24 (0,2354)
Volume do sêmen (ml)	0,47 (0,0263)	0,31 (0,1459)
Defeitos espermáticos maiores (%)	-0,08 (0,6698)	0,07 (0,7230)
Defeitos espermáticos menores (%)	0,16 (0,4209)	0,02 (0,9236)
Total de defeitos espermáticos (%)	-0,61 (0,7703)	-0,25 (0,9037)
Concentração espermática (spz/ml)	0,54 (0,0218)	0,33 (0,1519)
Consistência testicular (1-5)	0,50 (0,0155)	0,44 (0,0319)
Classificação andrológica por pontos (0-100)	0,33 (0,1070)	0,01 (0,9286)
Testosterona (ng/ml)	0,70 (0,0008)	0,51 (0,0132)
Libido coletiva	0,83 (<0,0001)	-

OBS: * = Nível de significância

Observou-se associação favorável da libido com idade (0,44 e 0,41) e peso corporal (0,56 e 0,46), respectivamente, nos sistemas de avaliação individual e coletivo, sugerindo influência direta destas características na manifestação do desejo sexual em touros jovens Guzerá, e ainda,

possível influência de ambiente nesta manifestação, conforme comentado anteriormente (Tab. 4). Pineda et al. (1997) e Salvador et al. (2003) encontraram resultados diferentes, não observando associação entre a libido e essas características, em touros Nelore adultos.

Observou-se ainda correlação favorável entre libido e CE (0,39) no teste de avaliação individual, não se repetindo na avaliação coletiva. Silva (1994) encontrou associação desfavorável entre libido e CE (-0,22), sugerindo não ser possível a seleção da libido, por meio da CE. No entanto, Sarreiro et al. (2000) avaliando a associação genética entre a libido e características andrológicas, observaram que a CE era favoravelmente associada a libido (0,59), sugerindo que a seleção para CE poderia levar a resposta correlacionada para libido.

Pineda et al. (2000) sugerem que a correlação entre a libido e o peso corporal decorre do fato de que o peso corporal e a idade são correlacionados entre si. Os autores afirmam ainda que a idade determina a maior libido, pois com seu avanço caminha-se na direção da maturidade sexual, quando a libido atinge sua expressão máxima. Quirino et al. (2004) ao encontrarem correlação de alta magnitude entre a libido e o peso corporal (0,69) constataram que a libido, em zebuínos, é altamente influenciada pelo sistema de manejo.

A libido em avaliação individual apresentou associação favorável com motilidade (0,44), vigor (0,35), turbilhonamento (0,41) e concentração (0,54) espermáticas e volume seminal (0,47). Resultados semelhantes foram encontrados por Sarreiro et al. (2002) que encontraram associação genética favorável entre a libido e características seminais, com exceção do vigor espermático, indicando que a seleção para maior libido levaria a seleção indireta para concentração (1,00) e motilidade (0,57) espermáticas e defeitos espermáticos totais (-1,00), sendo esta última não confirmada neste trabalho.

Encontrou-se ainda, associação favorável entre libido e concentrações séricas de testosterona, em ambos os sistemas de avaliação, sugerindo influência direta deste

hormônio na manifestação do comportamento sexual dos animais, corroborando os resultados descritos anteriormente (Tab. 4).

Alguns trabalhos têm sugerido que, em machos adultos mamíferos, o controle endócrino do comportamento sexual é feito pela testosterona, entretanto evidências indicam que estrógeno e dihidrotestosterona também participam da função erétil e do comportamento sexual em algumas espécies (Henney et al., 1990; Parvizi, 2000; Pinckard et al., 2000).

Henney et al. (1990) descrevem que a testosterona liga-se a área pré-óptica do hipotálamo onde é convertida em estradiol pela enzima aromatase, com o estradiol afetando positivamente o comportamento sexual masculino. Hormônios androgênicos estimulam a atividade da enzima aromatase e, maiores níveis circulantes de testosterona, disponíveis para aromatização no cérebro, afetam a libido.

Foote et al. (1976) alegaram que se a associação entre a libido e a testosterona, existir dentro de uma população de touros, resultados adversos podem ser provenientes de variações no complexo globulina-testosterona, nos receptores hormonais ou na inabilidade do tecido neural alvo em converter a testosterona circulante para uma forma mais ativa. Entretanto, em bovinos, a testosterona não tem sido associada a diferenças na libido (Barbosa, 1987; Santos et al., 2000) sugerindo que a concentração para manter o comportamento sexual masculino seja menor que a capacidade secretora dos testículos, fato não confirmado neste estudo.

Não se encontraram associações favoráveis entre a libido e defeitos espermáticos maiores, menores e totais, e CAP, reforçando a importância da análise do sêmen na seleção andrológica de reprodutores.

Na Tab. 12 encontram-se correlações simples entre a libido em curral e piquete, e idade, peso corporal, características andrológicas, CAP e concentrações séricas de testosterona em touros da raça Guzerá.

Observou-se que as associações apresentaram, em sua maioria, valores mais elevados e significativos na avaliação em piquete, sendo os resultados de difícil interpretação.

Tabela 12 - Correlações de Spearman entre a libido, segundo o método de avaliação, e idade, peso corporal, características andrológicas, classificação andrológica por pontos e concentrações séricas de testosterona em touros da raça Guzerá

	Curral		Piquete	
	Individual	Coletivo	Individual	Coletivo
Idade (meses)	0,41 (0,1676)*	0,25 (0,4070)	0,49 (0,1045)*	0,62 (0,0379)
Peso corporal (Kg)	0,55 (0,0652)	0,36 (0,2212)	0,61 (0,0407)	0,65 (0,0297)
Circunferência escrotal (cm)	0,31 (0,2993)	0,18 (0,5465)	0,44 (0,1377)	0,37 (0,2147)
Consistência testicular (1-5)	0,44 (0,1440)	0,40 (0,1804)	0,63 (0,0358)	0,60 (0,0436)
Motilidade espermática (%)	0,34 (0,2509)	-0,03 (0,9031)	0,63 (0,0348)	0,64 (0,0319)
Vigor espermático (0-5)	0,16 (0,5778)	-0,17 (0,5738)	0,60 (0,0448)	0,66 (0,0268)
Turbilhamento espermático (0-5)	0,24 (0,4203)	0,03 (0,9169)	0,61 (0,0424)	0,45 (0,1347)
Volume do sêmen (ml)	0,26 (0,3844)	-0,09 (0,7498)	0,85 (0,0069)	0,73 (0,0199)
Concentração espermática (sptz/ml)	0,50 (0,1505)	0,45 (0,2031)	0,51 (0,1201)	0,23 (0,4783)
Defeitos espermáticos maiores (%)	-0,24 (0,4270)	-0,07 (0,7986)	0,13 (0,6553)	0,24 (0,4136)
Defeitos espermáticos menores (%)	0,12 (0,6806)	0,02 (0,9307)	0,22 (0,4650)	0,06 (0,8256)
Total de defeitos espermáticos (%)	-0,24 (0,4236)	-0,12 (0,6806)	0,15 (0,6018)	0,11 (0,6934)
CAP (0-100)	0,46 (0,1258)	0,11 (0,7063)	0,29 (0,3271)	0,07 (0,8031)
Testosterona (ng/ml)	0,78 (0,0097)	0,61 (0,0430)	0,65 (0,0292)	0,46 (0,1230)
Libido coletiva	0,76 (0,0109)	-	0,91 (0,0025)	-

OBS: * = nível de significância. CAP = classificação andrológica por pontos.

Observou-se alta correlação entre os testes individual e coletivo (Tab. 11 e 12), independentemente do sistema de avaliação, sugerindo que a resposta final na avaliação do comportamento sexual de touros jovens Guzerá, independe do sistema utilizado.

5. CONCLUSÕES

Cheirar a região perineal e reflexo de Flehmen foram os principais eventos manifestados no teste de libido em touros jovens da raça Guzerá.

A avaliação do comportamento sexual pela libido, pode ser realizada em curral ou em piquete, em avaliações individuais ou coletivas, sem prejuízo para os animais avaliados, entretanto, a praticidade da

realização do teste em curral indica este sistema para avaliação do comportamento sexual.

A avaliação do comportamento sexual, em teste da libido, por cinco, 10 e 15 minutos se mostrou eficiente na manifestação do desejo sexual.

As correlações favoráveis entre a libido e a circunferência escrotal, peso corporal e características físicas do sêmen sugerem que a seleção pela libido pode levar a resposta correlacionada nestas características.

Alterações nos níveis circulantes de testosterona podem ser responsáveis por diferenças na manifestação do

comportamento sexual em touros jovens Guzerá.

O teste da libido deve ser uma avaliação complementar ao exame andrológico na avaliação do potencial reprodutivo de touros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC. *Anuário estatístico de produção animal*. São Paulo: FNP, 2002. 385p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL – ASBIA. [2003]. *Mnual de inseminação artificial*. Disponível em: <http://www.asbia.org.br>. Acesso em: 12/01/2006.

AX, R.L.; HAWKINS, S.K.; DENISE, T. R. et al. New developments in managing the bull. In: FIELDS, M.J.; SAND, R.S.; YELICH, J.V. *Factors affecting calf crop: Biotechnology of reproduction*. Flórida: CRC Press, 2002. P.287-296.

BARBOSA, R.T. *Comportamento sexual, biometria testicular, aspectos do sêmen e níveis plasmáticos de testosterona, em touros Canchim e Nelore*. 1987. 135p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BLOCKEY, M.A.B. Serving capacity – A measure of serving efficiency of bulls during pasture mating. *Theriogenology*, v.6, n.4, p.393-401, 1976.

BLOCKEY, M.A.B. The influence of serving capacity of bulls on herd fertility. *J. Anim. Sci.*, v.46, n.3, p.589-595, 1978.

BLOCKEY, M.A.B. Observations on group mating of bulls at pasture. *Appl. Anim. Ethol.*, v.5, n.1, p.15-34, 1979.

BLOCKEY, M.A.B. Development of a serving capacity test for beef bulls. *Appl. Anim. Ethol.*, v.7, p.307-319, 1981.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, v.25, p.383-391, 1973.

CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Concentração espermática na fecundação *in vitro*, com sêmen de touro da raça Guzerá. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.1, p.59-64, 2000.

CARTAXO, W.O.; PEÑA-ALFARO, C.E.; BACALHAU, A. et al. Parâmetros seminais e circunferência escrotal de touros jovens da raça Guzerá criados no estado da Paraíba. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, n.2, 2001.

CHENOWETH, P.J.; OSBORNE, H.G. Breed differences in the reproductive function of young beef bulls in Central Queensland. *Aust. Vet. J.* v.51, p.405, 1975.

CHENOWETH, P.J.; BRINKS, J.S.; NETT, T.M. A comparison of three methods of assessing sex-drive in yearling beef bulls and relationships with testosterone and LH levels. *Theriogenology*, v.12, n.4, p.223-233, 1979.

CHENOWETH, P.J. Libido and mating behavior in bulls, boars and rams: A review. *Theriogenology*, v.16, n.2, p.155-177, 1981.

CHENOWETH, P.J. Examination of bulls for libido and breeding ability. *Vet. Clin. North Am.: Anim. Pract.*, v.5, p.59-74, 1984.

CHENOWETH, P.J.; FARIN, P.W.; MATEOS, E.R. et al. Breeding soundness and sex drive by breed and age in beef bulls used for natural mating. *Theriogenology*, v.22, n.4, p.341-349, 1984.

- CHENOWETH, P.J. Libido testing. In: MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. P.136-142.
- CHENOWETH, P.J.; CHASE JR, C.C.; LARSEN, R.E. et al. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v.48, n.3-4, p.225-235, 1996.
- CHENOWETH, P.J. Impulso sexual del toro y comportamiento reproductivo. In: CHENOWETH, P.J. *Topics in bull fertility*. New York: IVIS, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 20/01/2008.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- COSTA E SILVA, E.V.; SERENO, J.R.B.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R. et al. Frequência de montas por touros Nelore (*Bos taurus indicus*) em sistema de acasalamento múltiplo: efeito da hierarquia. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 16, 1998, São José do Rio Preto. *Anais...* São José do Rio Preto: SBET, p.48, 1998.
- COSTA E SILVA, E.V.; SERENO, J.R.B.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R. et al. Comportamento sexual de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) e pantaneiro (*Bos taurus taurus*) durante os procedimentos de teste de libido. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.3, p.214-216, 1999.
- COSTA E SILVA, E.V. *Avaliação do comportamento de touros*. In: CURSO DE ANDROLOGIA DA EMBRAPA/CNPQC, 2000, 25p. (Monografia).
- COSTA E SILVA, E.V. *Comportamento sexual de touros Nelore (Bos taurus indicus) em monta a campo e em teste de libido*. 2002. 137p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CRUDELI, G.A. *Avaliação da aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore e seu efeito sobre a taxa de gestação do rebanho*. 1990. 135p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FONSECA, V.O.; FRANCO, C.S.; BERGMANN, J.A.G. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) acasalados com elevado número de vacas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.53-62, 1997.
- FONSECA, V.O. O touro no contexto da eficiência reprodutiva do rebanho. *Informe Agropecuário*, v.21, n.205, p.48-63, 2000.
- FOOT, R.H.; MUNKENBECK, N.; GREENE, A. Testosterone and libido in Holstein bulls of various ages. *Journal of Dairy Science*, v.59, n.11, p.2011-2013, 1976.
- FRASER, A.F. The influence of psychological and other factors on reaction time in the bull. *Cornell Vet.*, v.50, n.1, p.126-132, 1960.
- GEARY, T.W.; REEVES, J.J. Relative importance of vision and olfaction for detection of estrus by bulls. *J. Anim. Sci.*, v.70, n.9, p.2726-2731, 1992.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 6.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1995. 582p.
- HALE, E.B. Visual stimuli and reproductive behavior in bulls. *J. Anim. Sci.*, v.25, suppl.1, p.36-48, 1966.

- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Micro. Soc.*, v.76, p.84-87, 1957.
- HENNEY, S.R.; KILLIAN, G.J.; DEEVER, D.R. Libido, hormone concentrations in blood plasma and semen characteristics in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.*, v.68, p.2784-2792, 1990.
- HOHENBOKEN, W. Inheritance of behavioural characteristics in livestock. A review. *Anim. Breed. Abstr.*, v.54, n.8, p.623-639, 1986.
- HULTNÄS, C.A. Studies on variation on mating behavior and semen picture in young bulls of the swedish red-and-white bred and on causes of this variations. *Acta Agric. Scand.*, v.9, n.6, p.1-82, 1959.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. [2004]. *Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) 1990 a 2002, SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática: Quantidade de Animais – Unidades*. Disponível em: <http://www.ibge.org.br>. Acesso em: 03/04/2005.
- JIMÉNEZ-SEVERIANO, H. Sexual development of dairy bulls in the Mexican tropics. *Theriogenology*, v.58, p.921-932, 2002.
- MADER, D.R.; PRICE, E.O. The effects of sexual stimulation on the sexual performance of Hereford bulls. *J. Anim. Sci.*, v. 59, n.2, 1984.
- MELO, V.J.M.; PENNA, V.M. Programas de melhoramento da raça Guzerá. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, Belo Horizonte, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2000. P.219-221.
- MOURA, A.A.A.; RODRIGUES, G.C.; MARTINS FILHO, R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça Nelore. *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.2, p.934-943, 2002 (suplemento).
- NEVILLE JR., W.E.; WILLIAMS, D.J.; RICHARDSON, K.L. et al. Relationship of breeding soundness evaluation score and its components with reproductive performance of beef bulls. *Theriogenology*, v.30, n.3, p.429-436, 1988.
- OLIVEIRA, C.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P. et al. Avaliação do comportamento sexual em touros Nelore: comparação entre os testes da libido em curral e do comportamento sexual a campo. *Rev. Bras. Zootec.*, v.36, n.1, p.32-42, 2007.
- OSBORNE, H.G.; WILLIAMS, L.G.; GALLOWAY, D.B. A test for libido and serving ability in beef bulls. *Austr. Vet. J.*, v.47, n.10, p.465-467, 1971.
- PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; COSTA E SILVA, E.V. Aspectos básicos do comportamento social de bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.2, p.172-176, 2007. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br>. Acesso em: 20/01/2008.
- PARVIZI, N. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, n.1, p.31-47, 2000.
- PEREIRA, J.C.C. Contribuição genética do zebu na pecuária bovina do Brasil. *Inf. Agropec.*, v.21, n.205, p.30-38, 2000.
- PINCKARD, K.L.; STELLFLUG, J.; RESKO, J.A. et al. Review: brain aromatization and other factors affecting male reproductive behavior with emphasis

- on the sexual orientation of rams. *Dom. Anim. Endocr.*, v.18, p.83-96, 2000.
- PINEDA, N.; LEMOS, P.F.; FONSECA, V.O. Comparação entre dois testes de avaliação do comportamento sexual (libido) de touros Nelore (*Bos taurus indicus*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n.4, p.29-34, 1997.
- PINEDA, N.R.; FONSECA, V.O.; ALBUQUERQUE, L.G. Estudo preliminar da influência do perímetro escrotal sobre a libido em touros jovens da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.1, p.69-75, 2000.
- PRICE, E.O.; KATZ, L.S.; MOBERG, G.P. et al. Inability to predict sexual and aggressive behaviors by plasma concentrations of testosterone and luteinizing hormone in Hereford bulls. *J. Anim. Sci.*, v.62, n.3, p.613-617, 1986.
- PRUITT, R.J.; CORAH, L.R. Effect of energy intake after weaning on the sexual development of beef bulls. I. Semen characteristics and serving capacity. *J. Anim. Sci.*, v.61, n.5, p.1186-1193, 1985.
- QUIRINO, C.R.; BERGMANN, J.A.G.; VALE FILHO, V.R. et al. Genetic parameters of libido in Brazilian Nelore bulls. *Theriogenology*, v.62, p.1-7, 2004. Disponível em: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(03\)00125-0/pdf](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(03)00125-0/pdf). Acesso em: 20/12/2007.
- RUPP, G.P.; BALL, L.; SHOOP, M.C. et al. Reproductive efficiency of bulls in natural service: effects of male to female ratio and single vs. multiple-sire breeding groups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.171, n.7, p.639-642, 1977.
- SALVADOR, D.F. *Perfis andrológico, de comportamento sexual e desempenho reprodutivo de touros Nelore desafiados com fêmeas em estro sincronizado*. 2001. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. et al. Avaliação da libido de touros Nelore adultos em curral e sua associação com características andrológicas e desempenho reprodutivo a campo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.5, p.588-593, 2003.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002. 265p.
- SANTOS, N.R. *Comportamento sexual de touros da raça Nelore (Bos taurus indicus) a pasto*. 2001. 70p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Correlação da concentração sérica de testosterona com a libido de touros da raça Nelore. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. (CD-Rom).
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Teste da libido e atividade de monta em touros da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.504-510, 2004.
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro:vaca. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.497-503, 2004a.
- SARREIRO, L.C.; QUIRINO, C.R.; PINEDA, N.R. et al. Associações genéticas entre libido, perímetro escrotal e qualidade do sêmen de tourinhos da raça Nelore. In:

SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: SBMA, p.449-451, 2000.

SARREIRO, L.C.; BERGMANN, J.A.G. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal, libido e características seminais de touros Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, n.6, p.602-608, 2002.

SILVA, E.V.C. *Capacidade reprodutiva de touros Nelore: exame andrológico, teste de comportamento sexual e desafio de fertilidade*. 1994. 102p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SMITH, M.F.; MORRIS, D.L.; AMOSS, M.S. et al. Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality, and libido in Santa Gertrudis bulls. *Theriogenology*, v.16, n.4, p.379-397, 1981.

TORRES JÚNIOR, J.R.S. *Desenvolvimento ponderal e sexual de machos da raça Guzera (Bos taurus indicus)*. 2004. 44p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TROCÓNIZ, J.F.; BELTRÁN, J.; BASTIDAS, H. et al. Testicular

development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nelore bulls. *Theriogenology*, v.35, n.4, p.815-826, 1991.

VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil; análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, 1989, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, v.2, 1989. P.94-118.

VALE FILHO, V. R., BERGMANN, J.A.G., ANDRADE, V.J. et al. Classificação andrológica por pontos (CAP), versus libido, na eficiência na fecundação de touros Nelore de 2 e 3 anos de idade, usados em estação de monta bem definida. In: Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, 14., v.1, 1994, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG, 1994. P.88.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.3, p.7-13, 1997.

ZUIN, L.F.S. *Descrição e análise do comportamento sexual de touros da raça Nelore (Bos taurus indicus) aos dois e aos três anos de idade*. 2000. 14p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CAPÍTULO 2

Concentrações séricas de testosterona, em touros jovens da raça Guzará, e suas associações com peso corporal e características reprodutivas

(Serum testosterone concentrations in Guzerat young bulls and their correlations with body weight and reproductive traits)

Resumo

Foram avaliados 24 touros da raça Guzará, de 24 a 34 meses de idade, criados extensivamente, com o objetivo de avaliar o perfil das concentrações séricas de testosterona, e associá-las com características andrológicas (aspectos físicos: motilidade, vigor, turbilhonamento e concentração espermáticos, e volume seminal; e aspectos morfológicos: defeitos espermáticos maiores, menores e totais, do sêmen), circunferência escrotal (CE), classificação andrológica por pontos (CAP), libido, peso corporal e idade. A concentração média de testosterona foi de 1,36 ng/ml, com influência do horário de coleta nos níveis circulantes, com maior concentração ocorrendo às sete horas e menor às 19:00 horas; observou-se estabilização na concentração de testosterona circulante a partir das 13:00 horas. Observaram-se diferenças ($p < 0,05$) entre idade e peso corporal entre os animais com concentrações séricas de testosterona acima e abaixo da média registrada para o grupo dos animais. A equação de regressão da concentração sérica de testosterona em função do horário de coleta ($\hat{Y} = 668,8117 * X^{-2,8922}$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,39$), apresentou efeito geométrico, com redução média de -0,184 ng/ml a cada hora; e a regressão da testosterona em função da idade dos animais ($\hat{Y} = 0,00000012 * X^{4,8042}$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,32$), também apresentou efeito geométrico, constatando-se que para cada mês a mais na idade de touros, ocorreu acréscimo médio de 0,199 ng/ml nas concentrações séricas de testosterona. A equação de regressão da concentração sérica de testosterona em função do peso corporal dos animais ($\hat{Y} = -2,4404 + 0,0082 * X$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,52$), apresentou efeito linear, sugerindo que, para cada quilograma a mais no peso corporal, ocorre acréscimo de 0,0082 ng/ml nas concentrações séricas de testosterona; e a regressão da concentração sérica de testosterona e a CE, também apresentou efeito linear ($\hat{Y} = -6,144 + 0,2319 * X$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,30$). Os resultados mostram que para cada centímetro a mais na CE nos touros Guzará, ocorreu aumento de 0,2319 ng/ml na concentração sérica de testosterona. A regressão da concentração espermática do sêmen em função da concentração sérica de testosterona, apresentou efeito linear ($\hat{Y} = 143,2567 + 92,703 * X$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,55$), os resultados mostram que para cada 0,1 ng/ml a mais na concentração média de testosterona circulante, ocorreu aumento de $9,29 \times 10^6$ espermatozoides/ml de sêmen. As correlações fenotípicas observadas entre as concentrações de testosterona e a idade (0,53), peso corporal (0,72), CE (0,55), volume de sêmen (0,56), concentração espermática (0,71), consistência testicular (0,40), CAP (0,46) e libido (0,70) sugerem associação favorável entre as características. Os resultados indicam compatibilidade entre crescimento corporal, fertilidade com as concentrações séricas de testosterona; e, que os níveis circulantes de testosterona podem auxiliar na identificação e seleção de touros Guzará, com maior potencial reprodutivo.

Palavras-chave: andrologia, correlações fenotípicas, Guzará, sêmen, testosterona, zebu.

Abstract

Twenty-four Guzerat bulls, raised extensively, were evaluated from 24 to 34 months of age, aiming to determinate the bulls serum testosterone concentration profile and associate it with andrological characteristics (physical aspects: sperm motility, vigor, mass motility, sperm concentration and semen volume; and morphological aspects: major, minor and total sperm defects) scrotal circumference (SC) Breeding Soundness Evaluation for Zebu (BSEz), libido, body weight and age. The average of testosterone concentration was 1.36 ng/ml, with influence of time at harvest on circulating levels, with the higher concentration occurring at 7:00 am and the lowest at 7:00 pm. There was differences ($p < 0.05$) between age and body weight among animals with serum testosterone concentrations above and below average for the group of animals. The regression equation of serum testosterone concentration according to the time at harvest ($\hat{Y} = 66.8117 * X^{-2.8922}$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.39$), showed geometric effect, with an average reduction of -0.184 ng/ml each hour; and the regression of testosterone according to animals age ($\hat{Y} = 0.00000012 * X^{4.8042}$, $p > 0.01$, $R^2 = 0.32$), also showed and geometric effect, affirming that for each month of age of the bulls an increase of 0.199 ng/ml on serum testosterone concentration. The regression equation of testosterone according to body weight ($\hat{Y} = -2.4404 + 0.0082X$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.52$) showed linear effect, suggesting that for each kilogram added to the body weight, an increase of 0.0082 ng/ml on serum testosterone concentrations occurs; and the regression of testosterone according to SC also showed linear effect ($\hat{Y} = -6.144 + 0.2319X$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.30$). The results shows that for each centimeter added to SC in Guzerat bulls, an increase of 0.2319 ng/ml on testosterone concentrations occurs. The regression of sperm concentration according to serum testosterone showed a linear effect ($\hat{Y} = 143.2567 + 92.703X$, $p < 0.01$, $R^2 = 0.55$), the results show that for each 0.1 ng/ml added to serum testosterone concentration, an increase of 9.29×10^6 spermatozoa/ml of semen occurs. The phenotypic correlations observed between testosterone and age (0.53), body weight (0.72), SC (0.55), semen volume (0.56), sperm concentration (0.71), testis consistence (0.71) BSEz (0.46) and libido (0.70) suggest favorable associations among those characteristics. The results indicate compatibility between body growths, fertility with serum testosterone concentrations; and also indicate that circulating levels of testosterone may help on identification and selection of Guzerat bulls with major reproductive potential.

Keywords: andrology, Guzerat, phenotypic correlation, semen, testosterone, zebu.

1. INTRODUÇÃO

A seleção andrológica envolve um grande universo de características a ser analisadas e selecionadas, que vão desde os aspectos mais básicos, mas também fundamentais, como o exame clínico e da biometria testicular, passando também pela avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, classificação andrológica por pontos, chegando até mesmo aos parâmetros de avaliações funcionais e bioquímicas ligados à capacidade de fecundação espermática.

A avaliação da capacidade reprodutiva do touro é de fundamental importância para a eficiência reprodutiva do rebanho, uma vez que, em função da representatividade numérica na usual relação touro: vaca, eles são responsáveis pela cobertura de grande número de fêmeas, transmitindo suas características genéticas a um grande número de descendentes podendo, desta forma, interferir na fertilidade e qualidade do rebanho. Neste sentido, é necessário considerar alguns fatores ligados à reprodução como: nutrição, condição corporal, desenvolvimento testicular, produção e viabilidade espermática, libido e outros parâmetros que comprometem a fertilidade do reprodutor (Santos, 1996).

A endocrinologia da reprodução trata de bioquímica, fisiologia, farmacologia e biologia molecular dos hormônios e seus receptores. Os hormônios sintetizados e secretados pelas glândulas endócrinas são transportados pela circulação sanguínea para estimular, inibir ou interagir com a atividade funcional ou órgão-alvo específicos produzindo grande variabilidade de respostas fisiológicas (Hafez, 1995).

O estudo de níveis de testosterona no zebuino tem sido pouco enfatizado, entretanto, Post et al. (1987) descreveram que medidas de testosterona circulante podem ser úteis para melhorar a fertilidade de um rebanho de tal modo que a resposta da

testosterona em touros jovens pode ser um preditor efetivo da fertilidade, além de também ser favoravelmente relacionada com a idade à puberdade em tourinhos.

A testosterona é essencial à função reprodutiva dos machos, pois atua estimulando os estádios finais da espermatogênese, prolonga a vida útil dos espermatozoides no epidídimo e estimula o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, bem como as características sexuais secundárias; o comportamento sexual ou a libido do macho também são controladas pelos andrógenos (Hafez, 1995).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi o de descrever o perfil das concentrações séricas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá e buscar suas associações com parâmetros andrológicos e peso corporal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os hormônios da reprodução são derivados primariamente de quatro sistemas principais: várias áreas do hipotálamo; lobos anterior e posterior da hipófise; gônadas; útero e placenta. São também classificados em dois grupos, de acordo com seu modo de ação: hormônios primários que controlam os vários processos reprodutivos e hormônios metabólicos que influem indiretamente na reprodução (Hafez, 1995).

2.1. Síntese de Testosterona

A fonte primária dos esteróides (andrógenos, estrógenos e progesterona) é o colesterol, um esteróide de 27 carbonos sintetizado a partir de acetil-CoA no fígado e intestino, e transportado até as células esteroidogênicas pelas lipoproteínas, sendo então armazenados na forma de gotas de lipídeos (Hafez, 1995; Lehninger et al., 1995).

As células intersticiais ou de Leydig, localizadas nos testículos, secretam os

andrógenos, dos quais o mais importante é a testosterona e seu produto biologicamente mais ativo, a 5-dihidrotestosterona (DHT); tem-se, ainda, uma quantidade limitada desses andrógenos sendo produzida pelo córtex da adrenal (Lise et al., 1999; Gonzalez, 2002).

O depósito de colesterol existente nas gotas lipídicas do citoplasma das células de Leydig, irá originar os andrógenos, sendo o colesterol oriundo, principalmente, da própria célula e, em menor proporção, o colesterol plasmático. O colesterol armazenado em forma de éster é hidrolisado pela enzima colesterol-éster hidrolase, estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) (Gonzalez, 2002).

A biossíntese da testosterona é realizada no retículo endoplasmático da célula de Leydig (Amann e Schanbacher, 1983), e a conversão a DHT é realizada nos tecidos-alvos por ação da 5 α -redutase, que requer NADPH como coenzima. A afinidade do receptor androgênico é maior pela DHT do que pela testosterona (Lise et al., 1999).

A via de síntese dos andrógenos envolve a conversão de colesterol até testosterona; iniciando-se com a conversão do colesterol em pregnenolona, que ocorre na mitocôndria (Amann e Schanbacher, 1983). Esta alteração é realizada por enzimas do grupo dos citocromos P450, que tem função hidroxilase e liase. A enzima utiliza O₂ unindo um átomo de oxigênio a um carbono (C) para formar o grupo hidroxila (mediante monoxigenação) e formando água (H₂O), com o outro átomo de oxigênio e os hidrogênios fornecidos pela coenzima NADPH + H⁺. O citocromo P450 aplica grupos hidroxila nos C de número 20 e 22 da cadeia lateral do colesterol, para posteriormente romper a cadeia (liase) entre os carbonos hidroxilados (Gonzalez, 2002).

A pregnenolona entra posteriormente nos microssomos, e, a partir de então, duas vias

são possíveis para formar a androstenediona: a via da progesterona (Δ^4) e a via da dehidroepiandrosterona (DHEA) (Δ^5). Há considerável variação entre as espécies e o tecido quanto as vias que são utilizadas. No caso da via Δ^4 atua a enzima desidrogenase-isomerase que converte o grupo hidroxila do anel A em grupo ceto, ao passo que transfere a dupla ligação do C₅ para o C₄ (Δ^4) gerando progesterona (P₄). No caso da via Δ^5 atua o citocromo P450 com função hidroxilase no C17 α e função liase, rompendo a cadeia entre o C17 e o C20, para formar DHEA (Amann & Schanbacher, 1983; Payne & Youngblood, 1995; Stanbenfeld & Edqvist, 1996; Gonzalez, 2002).

No passo seguinte, as enzimas se alternam, de forma que na via Δ^4 o citocromo P450 atua sobre a progesterona para formar androstenediona, enquanto que na via Δ^5 a desidrogenase-isomerase atua sobre a DHEA para também formar a androstenediona. A androstenediona pode sofrer interconversão a testosterona mediante a 17 β -desidrogenase com participação de NAD⁺ (Gonzalez, 2002).

2.2. Controle Hormonal da Testosterona

Nos mamíferos, a secreção de testosterona é pulsátil e regulada por retroalimentação negativa (Amann e Schanbacher, 1983). Quando há deficiência de testosterona, ocorre estímulo do hipotálamo que, através da secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), estimula a hipófise a liberar hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), aumentando a síntese de testosterona. O excesso de testosterona suprime a secreção de ambas as gonadotrofinas, diminuindo a produção endógena do hormônio (Lise et al., 1999).

Entretanto, o controle mais importante da síntese de andrógenos no testículo é feito pelo LH, que se une ao seu receptor nas células de Leydig, sendo que cada célula

tem cerca de 20000 receptores. O receptor de LH está acoplado à enzima adenilciclase mediante um sistema guanosina trifosfato (GTP) estimulatório. A união do receptor a uma unidade de GTP ativa a adenilciclase, que sintetiza adenosina monofosfato cíclica (AMPc) a partir de adenosina trifosfato (ATP). O AMPc se une a subunidade regulatória de uma proteína-quinase para ativá-la. A única ação possível da proteína-quinase na célula de Leydig é a fosforilação da enzima colesterol-éster hidrolase que desta forma é ativada para liberar colesterol, o qual é direcionado para a mitocôndria através de microfilamentos. O aumento de colesterol causa estímulo da via esteroidogênica através da clivagem da cadeia lateral do colesterol (Gonzalez, 2002).

O AMPc é metabolizado por uma fosfodiesterase e aquele que não se une imediatamente à proteína-quinase é inativado, de forma que a duração da resposta ao LH pode ser controlado pela própria célula. O LH também provoca aumento na síntese de proteínas específicas que tem a ver com a atividade de clivagem do colesterol que se observa com a ação do LH (Stanbenfeld & Edqvist, 1996; Gonzalez, 2002).

Outros segundos mensageiros do LH, além do AMPc, estão envolvidos, entre eles o Ca^{2+} e os derivados de fosfatidil-inositol bifosfato. Já os andrógenos atuam sobre suas células-alvo por intermédio de receptores intracelulares, modificando a velocidade de transcrição de genes (Gonzalez, 2002).

A regulação hipotalâmica da secreção de andrógenos está determinada pela secreção de GnRH. Fatores externos como a luz e/ou estímulos olfatórios (feromônios) e visuais, podem aumentar a secreção de GnRH via sistema nervoso central, mediante neuro-receptores que incluem a dopamina, a norepinefrina e a serotonina. A função secretora das células de Leydig é estimulada

pela prolactina, favorecendo a síntese de receptores para LH e, possivelmente, melhorando a atividade enzimática da síntese de testosterona a partir do colesterol. O FSH também parece favorecer a presença de receptores para LH nas células de Leydig (Hafez, 1995; Stanbenfeld & Edqvist, 1996; Gonzalez, 2002).

O estresse ocasiona aumento da secreção de hormônio adeno-corticotrófico (ACTH), o qual inibe a secreção de LH no macho, e, portanto de testosterona, inibindo a espermatogênese e a libido. Os glicocorticóides secretados pela ação de ACTH também parecem ter ação inibitória direta sobre a secreção das gonadotropinas (Gonzalez, 2002).

Existe uma relação entre a atividade reprodutiva no macho e o funcionamento tireoidiano. Em machos hipotireoideos, seja por deficiência de iodo ou por ingestão de substâncias bociogênicas, é observado depressão da libido e da espermatogênese (Gonzalez, 2002).

Outros fatores que podem afetar a síntese de testosterona incluem os seguintes:

- GnRH hipotalâmico ou homólogo testicular que estimula a produção de testosterona nas células de Leydig. Este fator não atua mediante AMPc, sendo considerado a base da interação local entre as células de Sertoli e as células de Leydig;
- Prostaglandinas. A prostaglandina E_2 (PGE_2) estimula a síntese de testosterona nas células de Leydig, ao passo que prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) inibe a síntese de esteróides em resposta a LH;
- Fluxo sanguíneo. A taxa de secreção de testosterona esta relacionada diretamente com o fluxo sanguíneo da artéria espermática;
- Sistema nervoso. A adrenalina diminui a concentração de testosterona plasmática, talvez por diminuir o fluxo sanguíneo ao testículo. Por outro lado, a própria adrenalina estimula a secreção de

testosterona nos testículos, quando se considera constante o volume de sangue;

- Controle “*down regulation*”, considerado como controle da secreção de testosterona, mediante a diminuição do número de receptores para LH, quando ocorrem aumentos importantes desse hormônio. O excesso de LH causa internalização dos receptores. Existem dúvidas sobre a utilização desse mecanismo nas condições fisiológicas;

- Estrógenos. A síntese de testosterona parece ter também um controle parácrino pois os estrógenos sintetizados pelas células de Sertoli inibem a síntese de testosterona nas células de Leydig por inibir a enzima que cliva o colesterol, o citocromo P450 (Gonzalez, 2002).

2.3. Principais Ações dos Andrógenos

A testosterona não é uma substância ativa; na circulação age como pró-hormônio na formação de duas classes de esteróides: andrógenos

5- α -reduzidos (dihidrotestosterona), que são mediadores intracelulares da maioria das ações androgênicas, e estrógenos (estradiol), que potencializam alguns efeitos androgênicos, enquanto bloqueiam outros. A testosterona é convertida em vários outros metabólitos ativos como estradiol, androsterona, 3- α -hidroxi-5- β -androsta-17-ona e androstenediona. As substâncias ativas, inclusive metabólitos reduzidos (5- α -redutase), atravessam a membrana celular e ligam-se com alta especificidade e baixa afinidade a receptores citoplasmáticos para esteróides. O complexo hormônio-receptor é translocado para o núcleo e liga-se à cromatina, induzindo a transcrição do RNA e a produção de proteínas específicas e ocasionando seus efeitos (Lise et al., 1999).

As principais ações dos andrógenos nas características reprodutivas dos machos envolvem:

- Diferenciação sexual. A diferenciação da gônada por efeito do antígeno codificado

pelo gene *sry* (fator de determinação de testículo) causa o início de produção de testosterona, a qual promove a diferenciação dos dutos internos (vaso deferente, vesícula seminal, epidídimo) a partir dos dutos de Wolff. As células de Sertoli, por sua vez, produzem o hormônio anti-mülleriano (AMH) que inibe o desenvolvimento dos túbulos paramesonéfricos, os quais originam o útero e os ovidutos na fêmea. A DHT promove a diferenciação da uretra, a próstata e os genitais externos (Gonzalez, 2002);

- Espermatogênese;

- Desenvolvimento e manutenção dos órgãos sexuais secundários;

- Comportamento de combatividade e dominância no rebanho;

- Efeitos anabólicos e promotores do crescimento esquelético e muscular;

- Estímulo da libido, a ereção e a ejaculação;

- Outros efeitos metabólicos incluem a redistribuição da gordura corporal, a maior concentração de eritrócitos e a maior taxa metabólica (Hafez, 1995; Gonzalez, 2002).

Os níveis circulantes de testosterona em machos bovinos têm sido estudados em várias fases do desenvolvimento dos animais, com variações na metodologia e nos objetivos dos trabalhos (Sanwal et al., 1974; Bindon et al., 1976; Lunstra et al., 1978; Coser et al., 1981; Amann & Walker, 1983; Andersson, 1992; Aranguren-Méndez, 1995; Evans et al., 1996; Moura & Ericksson, 1997; Santos et al., 1997; Moura & Ericksson, 1998; Sanches et al., 1998; Moura et al., 2002; Jiménez-Severiano et al., 2003; Aguiar et al., 2006).

Correlações têm evidenciado associações favoráveis entre os níveis periféricos de testosterona, a fertilidade e a motilidade espermática. Post & Christensen (1976) constataram maiores taxas de fertilidade, verificadas pelo índice de prenhez de fêmeas em estação de monta de 35 dias, em touros com maiores concentrações de testosterona; já Andersson (1992) encontrou correlação positiva entre a concentração de testosterona

e a fertilidade de touros, avaliada pela taxa de não retorno; verificou, ainda, associação favorável entre a motilidade espermática e os níveis de testosterona.

As relações entre os níveis circulantes de testosterona e a qualidade seminal em touros foram estudadas por Thibier (1975) que observou aumento na concentração e motilidade espermática, com a progressão da idade, sem, no entanto verificar associação com a concentração de testosterona.

Aguiar et al. (2006) evidenciaram a existência de relação cronológica entre os níveis periféricos de gonadotrofinas e esteróides, a espermatogênese e o desenvolvimento testicular em touros Angus. Observaram ainda, que as variações nos níveis basais de testosterona e estradiol-17 β e a medida de peso testicular são indicadores da evolução do processo espermatogênico nos túbulos seminíferos.

Lunstra et al. (1978) não observaram associação entre as concentrações médias de testosterona e o peso corporal, a circunferência escrotal e a idade ao primeiro interesse sexual; no entanto verificaram que a correlação entre a média de testosterona e a idade a puberdade foi favorável (-0,51).

Barbosa (1987) trabalhando com touros das raças Nelore e Canchim, registrou correlações entre concentração plasmática de testosterona com volume do ejaculado e com circunferência escrotal nos touros Canchim, e entre a testosterona e capacidade de serviço nos touros Nelore.

Alguns trabalhos têm procurado correlacionar os níveis de testosterona com o comportamento sexual em touros. Blockey e Galloway (1978) afirmam que a testosterona é necessária à manutenção da capacidade de serviço em touros.

Foote et al (1976) trabalhando com 197 touros da raça Holandesa, em varias idades,

observaram efeito da época do ano, provavelmente devido ao fotoperíodo; sendo o nível de concentração de testosterona maior na primavera (8,0 ng/ml) que no inverno (5,7 ng/ml). Observaram ainda tendência de aumento nas concentrações de testosterona com o avanço da idade, e não encontraram relação entre a testosterona, a libido e a qualidade do sêmen.

De forma generalizada, baseado nos dados disponíveis na literatura, observa-se grande variabilidade nos padrões da concentração de testosterona em bovinos, devido a metodologia de avaliação, quanto a intervalo e frequência de coleta, raça e idade dos animais, utilização ou não de GnRH, condições nutricionais a que os touros estavam submetidos no período de avaliação, entre outros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Propriedade

O local da realização do experimento e as características gerais e edafoclimáticas da propriedade estão descritas no Capítulo 1.

3.2. Animais e Metodologia Experimental

Dentre os animais previamente avaliados andrologicamente e clinicamente normais (Capítulo 1), 24 touros com idades variando de 24 a 34 meses, foram selecionados ao acaso, para análise das concentrações séricas de testosterona.

As análises das concentrações séricas de testosterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando-se *kits* comerciais (Testosterona Total COAT-A-COUNT^{®***}).

***DPC – Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Califórnia, USA.

Para avaliação das concentrações séricas de testosterona, os animais foram submetidos a coletas de sangue, por punção da veia jugular, utilizando-se o sistema de coleta a vácuo, em tubos de vidro de cinco mililitros (vacutainer), sem anticoagulante. As coletas de sangue foram realizadas a cada duas horas, por um período de 12 horas (07:00, 09:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 e 19:00 horas).

Para a coleta de sangue, os animais foram divididos em dois grupos, com 12 animais cada, sendo as coletas iniciadas sempre pelo mesmo grupo, para que os intervalos de coleta se mantivessem dentro de uma mesma faixa de tempo.

Imediatamente após a coleta, a amostra de sangue era colocada em banho-maria a 4°C por aproximadamente, 30 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos. O soro sanguíneo, obtido após a centrifugação, era transferido para tubos criogênicos esterilizados, devidamente identificados, e colocados sob refrigeração a - 20 °C (Valle e Dode, 1991), para posterior armazenamento em nitrogênio líquido (- 196 °C), até o momento da análise.

A dosagem quantitativa das concentrações séricas de testosterona foi realizada em radioimunoensaio de fase sólida pelo método direto, cujo princípio baseia-se na competição entre antígenos dos padrões e das amostras com quantidade constante de antígeno marcado como traçador (¹²⁵I), para os sítios de ligação específicos dos anticorpos. A quantidade de antígeno não radioativo (testosterona) da amostra a se dosar, é inversamente proporcional a quantidade de antígeno marcado. O complexo antígeno anticorpo é precipitado para separar a forma ligada da forma livre, procedendo posteriormente à contagem em contador gama; com determinação de uma curva padrão e a obtenção dos resultados expressos em nano gramas por mililitro de soro sanguíneo.

Segue o procedimento para a dosagem sérica de testosterona e leitura em radioimunoensaio:

- descongelamento das amostras de soro sanguíneo, mantendo-as sob refrigeração;
 - pipetar 50 µl de cada amostra e de cada padrão nos tubos revestidos com anticorpos de testosterona;
 - adicionar um mililitro de testosterona total ¹²⁵I em todos os tubos;
 - homogeneizar em vortex;
 - incubar por três horas em banho-maria a 37°C;
 - remover todo o líquido dos tubos por aspiração, deixando os tubos invertidos por dois ou três minutos sobre papel absorvente para eliminação de gotas residuais;
 - leitura em contador gama por um minuto.
- Um sistema de espectrometria gama foi utilizado para determinação da testosterona circulante nas amostras (Rosa e Silva, 1999).

3.3. Análise dos Dados

Para análise dos dados, referentes aos níveis de testosterona, procedeu-se a transformação utilizando $Y = \log(X + 1)$, devido ao alto coeficiente de variação observado (Sampaio, 2002).

Para observação do efeito do horário da coleta sobre as concentrações séricas de testosterona, fez-se comparação de médias usando-se o teste de SNK, com 5% de probabilidade. Buscou-se, ainda, o efeito das concentrações de testosterona sobre as características físicas e morfológicas do sêmen e classificação andrológica por pontos (CAP), comparando animais com concentrações de testosterona acima e abaixo da média geral do grupo, também pelo teste de SNK com 5% de probabilidade (Sampaio, 2002) utilizando-se recursos do pacote estatístico SAS (1996).

Foram também calculados os coeficientes de regressão da testosterona em função do horário da coleta, idade, peso corporal e circunferência escrotal, e ainda, o

coeficiente de regressão da concentração espermática em função da testosterona, por meio do pacote estatístico BioStat. Buscou-se, também, associações, através de correlações de Pearson e Spearman, entre os níveis séricos de testosterona e idade, peso corporal, circunferência escrotal, motilidade, vigor, turbilhonamento e concentração espermáticos, volume do sêmen, defeitos espermáticos maiores, menores e totais, consistência testicular e classificação andrológica por pontos, com recursos do SAS (1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, características físicas e morfológicas do sêmen e classificação andrológica por pontos (CAP) de touros jovens da raça Guzerá

Idade (meses)	Peso (Kg)	CE (cm)	Mot (%)	Vigor (0-5)	DM (%)	Dm (%)	DT (%)	Vol (ml)	Conc (x10 ⁶ sptz/ml)	CAP (0-100)
29,4 ± 3,2	464,1 ± 99,5	32,3 ± 2,7	60,2 ± 7,3	4,2 ± 0,7	7,5 ± 4,2	12,1 ± 5,5	19,6 ± 6,4	9,1 ± 1,5	284,5 ± 147,1	70,7 ± 15,1

OBS: Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Mot = motilidade espermática; Vigor = vigor espermático; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = defeitos espermáticos totais; Vol = volume de sêmen; Conc = concentração espermática; CAP = classificação andrológica por pontos.

As amplitudes de variações das secreções de testosterona no soro sangüíneo, determinadas por radioimunoensaio, oscilaram desde níveis inferiores a 0,02 ng/ml até 12,84 ng/ml. Estes valores são inferiores aos descritos por Barbosa (1987), e com limites de variação mais amplos que os descritos por Santos (1996), ambos em touros Nelore, mostrando a variabilidade deste hormônio em machos zebuínos. Barnabé et al. (1995) e Ohashi et al. (2007) citam valores inferiores em machos bubalinos, e afirmam que nestes animais a concentração de testosterona é comparativamente menor que em bovinos.

Na Tab. 1 são apresentadas as médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, circunferência escrotal, características seminais e CAP de touros jovens da raça Guzerá. Os dados são próximos daqueles descritos na literatura para touros Guzerá, na mesma faixa etária (Pinto et al., 1989; Torres Júnior, 2004; Torres-Júnior & Henry, 2005), se situando-se dentro do padrão descrito para touros zebuínos (Vale Filho, 1989; Fonseca et al., 1997); sugerindo que não ocorreu seleção prévia na escolha dos animais para a realização do trabalho, o que poderia influir nos resultados.

Não foram encontrados na literatura dados a respeito da concentração de testosterona em touros Guzerá.

A média encontrada na concentração sérica de testosterona foi de 1,36 ng/ml (Tab. 2), valor superior aos encontrados por Barbosa (1987) para touros Canchim (1,2 ng/ml) e Santos (1996) para Nelore (1,24 ng/ml); porém inferiores as encontradas por Barbosa (1987) para touros Nelore (3,1 ng/ml), Aguiar et al. (2006) para Angus e Coser et al. (1981) em zebus (2,52 ng/ml), com predominância de animais da raça Gir.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão da concentrações séricas de testosterona em touros jovens da raça Guzerá, em diferentes horários de coleta

Horários de coleta (ng/ml)							Geral
7h	9h	11h	13h	15h	17h	19h	
4,42 ± 3,65 ^a	2,29 ± 2,99 ^b	1,00 ± 1,12 ^c	0,55 ± 0,57 ^{cd}	0,41 ± 0,43 ^d	0,44 ± 0,69 ^d	0,36 ± 0,33 ^d	1,36 ± 1,12

Letras diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de SNK.

OBS: 7h = sete horas; 9h = nove horas; 11h = 11 horas; 13h = 13 horas; 15h = 15 horas; 17h = 17 horas; 19h = 19 horas.

Observaram-se diferenças ($p < 0,05$) entre horários de coleta, com concentração máxima de testosterona nos níveis séricos, às sete horas (4,42 ng/ml) e mínima às 19

horas (0,36 ng/ml), com estabilização na concentração sérica basal ocorrendo a partir das 13 horas (0,55 ng/ml) (Fig. 1).

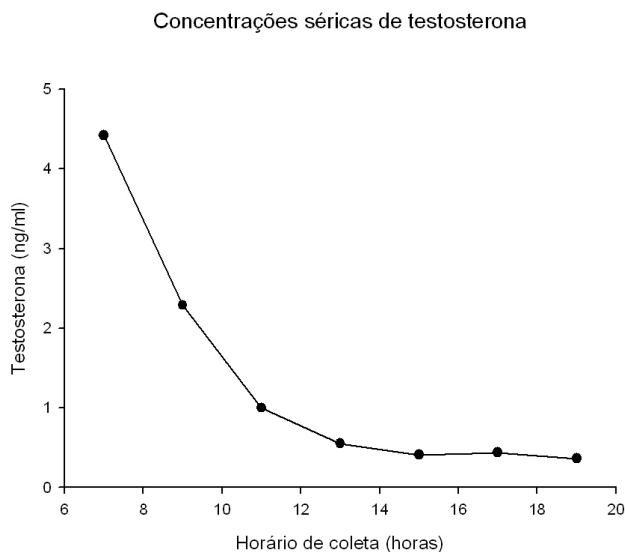


Figura 1 – Concentrações séricas médias de testosterona em touros da raça Guzerá, em diferentes horários de coleta.

Verificou-se diminuição nos níveis séricos de testosterona no transcorrer do dia, similar ao relatado por Aranguren-Méndez et al. (1995); sugerindo influência do período do dia na concentração periférica desse hormônio.

Apesar de terem sido observadas variações nas concentrações de testosterona, constatou-se apenas um pico hormonal às sete horas, semelhante ao relatado por Santos et al. (2000), que observou em touros Nelore, um pico às nove horas. Já Sanwal et al. (1974), trabalhando com touros da raça Norueguês Vermelho descreveram a ocorrência de três picos durante o dia, as seis, 12:00 e 22:00 horas, com redução significativa nos níveis periféricos entre os picos.

Barbosa (1987) descreve pico como toda secreção com valor igual ou superior a duas vezes a média registrada para o total das

coletas, relatando três picos em touros Nelore, com ocorrência às seis, 14 e 22 horas, diferentemente de Santos et al. (2000a), que não observaram picos de testosterona em touros Nelore.

No presente estudo, constatou-se 13 animais apresentando pico de testosterona às sete horas, cinco animais às nove horas, três animais às 11 horas e apenas um animal às 17 horas; nos demais horários de coleta não foram observados picos hormonais.

Barbosa (1987) descreve uma tendência de ocorrência de picos de testosterona a cada seis horas em touros Canchim, e a cada oito horas em touros Nelore. A metodologia e os horários de coleta utilizados no presente estudo não permitiram estabelecer tais picos (Fig. 1), podendo-se especular que em touros jovens Guzerá estes picos devem ocorrer a intervalos maiores.

A equação de regressão da concentração sérica de testosterona em função do horário de coleta ($\hat{Y} = 668,8117 * X^{-2,8922}$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,39$), apresentou efeito geométrico,

sugerindo que, das sete às 19 horas, houve redução gradativa nos níveis circulantes deste hormônio, com queda de $-0,184$ ng/ml a cada hora (Fig. 2).

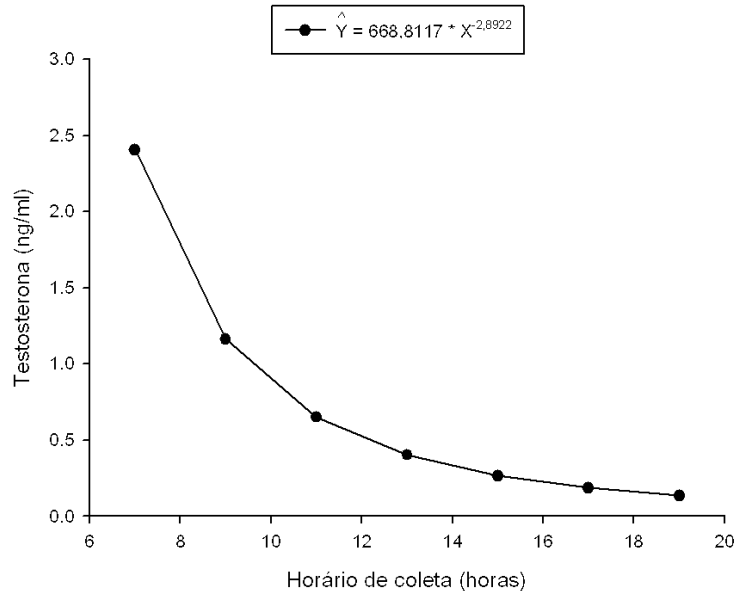


Figura 2 – Regressão das concentrações séricas de testosterona em função do horário de coleta, em touros da raça Guzerá.

Pode-se observar maior queda entre sete e oito horas ($-0,77$ ng/ml), com os níveis basais de testosterona tendendo a estabilização na concentração circulante, a partir das 13 horas, conforme sugerido na Tab. 1. A manutenção desses níveis é importante para a espermatogênese nos testículos, para a maturação dos espermatozoides nos epidídimos e para o desenvolvimento e funções dos órgãos sexuais acessórios masculinos (Guerra, 1990; González, 2002).

Considerando que os dados disponíveis na literatura apresentam diferentes padrões de avaliação da concentração de testosterona em bovinos, quanto a intervalo e frequência

de coleta, raça e idade dos animais, utilização ou não de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), métodos utilizados para análise e condições nutricionais a que os touros foram submetidos no período da coleta, pode-se conjecturar que as concentrações aqui obtidas estão dentro de uma faixa normal.

Observou-se diferença ($p < 0,05$) entre a idade nos animais com testosterona acima e abaixo da média (Tab. 3). Barbosa (1987) descreveu variação na concentração média de testosterona em touros Nelore (3,1 e 4,1 ng/ml) e Canchim (1,2 e 2,1 ng/ml) aos 27 e 39 meses de idade.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão da idade, peso corporal, características seminais e classificação andrológica por pontos (CAP) em touros jovens da raça Guzerá, com concentrações séricas de testosterona acima e abaixo da média (1,36 ± 1,12 ng/ml)

	Idade (meses)	Peso (Kg)	CE (cm)	Mot (%)	DM (%)	DT (%)	Vol (ml)	Conc (x10 ⁶ sptz/ml)	CAP (0-100)
> média	31,2 ± 1,9 ^a	525,0 ± 122,9 ^a	32,8 ± 3,2 ^a	61,0 ± 8,7 ^a	5,9 ± 2,7 ^a	16,9 ± 4,4 ^a	9,5 ± 1,6 ^a	357,7 ± 166,9 ^a	74,2 ± 15,9 ^a
	28,0 ± 3,2 ^b	420,5 ± 46,3 ^b	31,9 ± 2,1 ^a	59,6 ± 6,3 ^a	8,6 ± 4,7 ^a	21,5 ± 7,0 ^a	8,7 ± 1,3 ^a	218,5 ± 91,2 ^a	68,1 ± 14,4 ^a

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de SNK.

OBS: Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Mot = motilidade espermática; Vigor = vigor espermático; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = defeitos espermáticos totais; Vol = volume de sêmen; Conc = concentração espermática; CAP = classificação andrológica por pontos.

Avaliando o efeito da idade sobre a concentração de testosterona em touros da raça Holandesa, de quatro e seis anos de idade, Katongole (1971) verificou médias de 2,0 ± 0,15 e 23,91 ± 0,36 ng/ml, respectivamente, diferença essa altamente significativa. Oba (1985), em revisão de literatura, mencionou que o perfil de concentração de testosterona apresenta crescimento linear com o avanço da idade.

A equação de regressão da concentração sérica de testosterona em função da idade dos animais ($\hat{Y} = 0,00000012 * X^{4,8042}$, p<0,01, R² = 0,32), apresentou efeito geométrico, sugerindo aumento gradativo nos níveis circulantes deste hormônio, a medida em que os animais ficam mais velhos (Fig. 3).

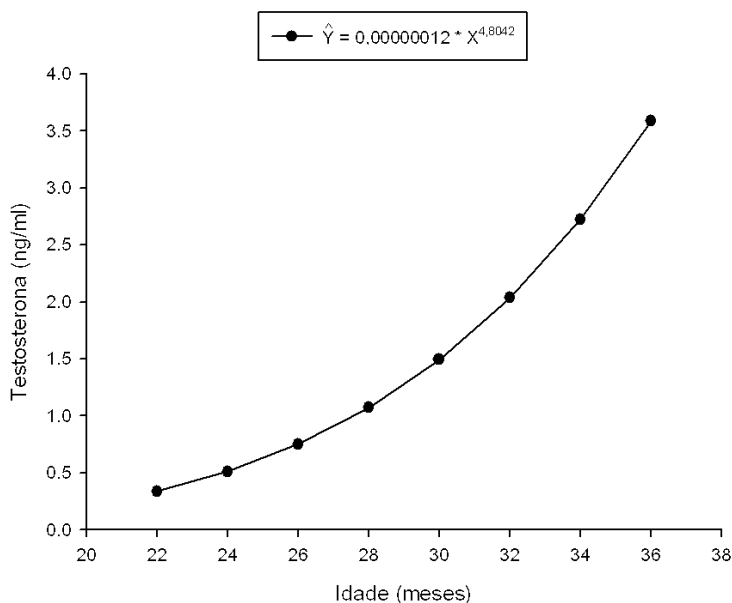


Figura 3 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função da idade, em touros jovens da raça Guzerá.

Constatou-se que, para cada mês a mais na idade de touros Guzerá de 24 a 34 meses,

ocorre acréscimo médio de 0,199 ng/ml nas concentrações séricas de testosterona; com o

aumento máximo na concentração ocorrendo entre o 33º e 34º mês (0,365 ng/ml).

Segundo Sanches et al. (1998) a concentração de testosterona aumenta com a idade, proporcionando um pico entre sete e oito meses (Sundby & Velle, 1980); com tendência a diminuir após este período, permanecendo estável até o início da puberdade, quando apresenta um novo aumento (Oba, 1985).

Renaville et al. (1983) e Moura & Ericksson (1997) sugeriram que o aparecimento precoce do perfil da testosterona poderia ser indicativo do desenvolvimento testicular, do

início da puberdade e da maturidade sexual dos machos; podendo, desta forma, selecionar precocemente os animais que entrarão na reprodução.

Constatou-se, ainda, correlação favorável (0,53) entre a idade e os níveis de testosterona nos tourinhos Guzerá (Tab. 4), reforçando a associação linear entre as duas características; confirmando as citações de Oba (1985). Entretanto, Devkota et al. (2008) citam baixa correlação entre a idade e as concentrações de testosterona em touros Holandês, na puberdade e pós-puberdade, 0,23 e 0,13, respectivamente.

Tabela 4 – Correlações de Pearson (paramétricas) e de Spearman (não paramétricas) entre concentrações séricas de testosterona e idade, peso corporal, circunferência escrotal, características físicas e morfológicas do sêmen e classificação andrológica por pontos em touros jovens da raça Guzerá

	Testosterona (ng/ml)
Idade (meses)	0,53 (0,0069)*
Peso corporal (Kg)	0,72 (<0,0001)
Circunferência escrotal (cm)	0,55 (0,0038)
Motilidade espermática (%)	0,32 (0,1283)
Volume seminal (ml)	0,56 (0,0042)
Concentração espermática (x10 ⁶ sptz/ml)	0,71 (0,0003)
Defeitos espermáticos maiores (%)	-0,32 (0,1251)
Defeitos espermáticos menores (%)	-0,10 (0,6323)
Total de defeitos espermáticos (%)	-0,30 (0,1542)
Consistência testicular (0-5)	0,40 (0,0515)
Vigor espermático (%)	0,30 (0,1433)
Turbilhonamento (0-5)	0,24 (0,2324)
Classificação andrológica por pontos (0-100)	0,46 (0,0260)

(*) = Nível de significância.

Verificou-se, também, diferença (p<0,05) entre peso corporal nos animais com concentrações de testosterona acima e abaixo da média geral (Tab. 3); tal diferença pode ser explicada pelo fato de a testosterona ser um hormônio anabólico, que atua no desenvolvimento esquelético e muscular dos animais (González, 2002).

A associação entre a concentração sérica de testosterona e peso corporal também foi verificada pela correlação simples entre as características (Tab. 4). Observou-se correlação favorável e de considerável magnitude (0,72) entre estas características, confirmando a ação de uma característica sobre a outra, nestes animais. Devkota et al. (2008) encontraram correlações de 0,21 e 0,20, entre o peso corporal e a testosterona

em touros Holandês, na puberdade e pós-puberdade, respectivamente.

A equação de regressão da concentração sérica de testosterona em função do peso corporal dos animais ($\hat{Y} = -2,4404 + 0,0082 * X$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,52$), apresentou efeito linear, sugerindo aumento

constante nos níveis circulantes deste hormônio, na medida em que os animais ficam mais pesados (Fig. 4). Os dados permitem afirmar que para cada quilograma a mais no peso corporal, de touros Guzerá de 24 a 34 meses, ocorre um acréscimo de 0,0082 ng/ml nas concentrações séricas de testosterona.

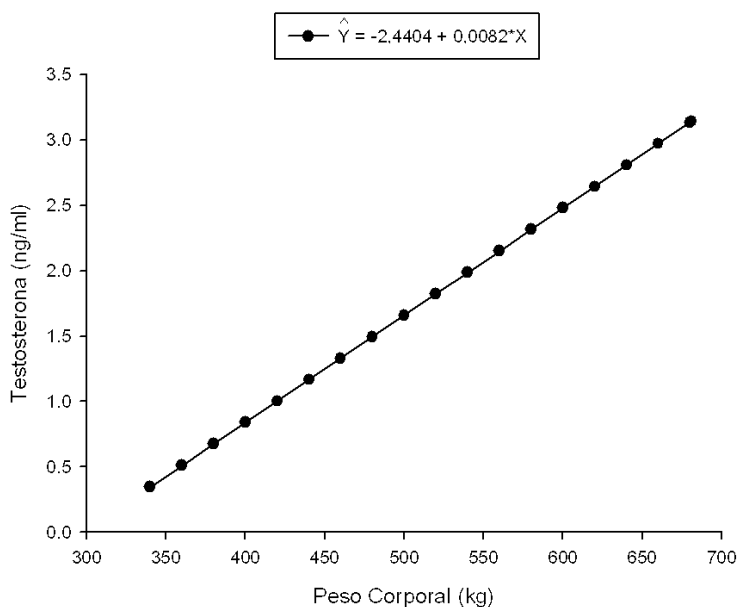


Figura 4 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função do peso corporal, em touros jovens da raça Guzerá.

Conforme já comentado anteriormente, a associação de peso corporal e testosterona pode ser explicada pelos efeitos anabólicos deste hormônio, onde destacam-se: o aumento da massa muscular, da concentração da hemoglobina, do hematócrito, da retenção de nitrogênio, da deposição de cálcio nos ossos e diminuição das reservas de gordura do corpo.

Dentre os mecanismos anabólicos desencadeados para aumento da massa muscular, incluem-se: aumento da síntese protéica via RNA mensageiro, balanço nitrogenado positivo, inibição dos efeitos catabólicos na massa muscular esquelética, estimulação da formação de osso, inibição

do catabolismo protéico e estímulo da eritropoiese.

Os efeitos anabólicos ocasionam retenção de nitrogênio, um constituinte básico da proteína, promovendo assim crescimento e desenvolvimento de massa muscular pela melhor utilização da proteína ingerida (Lise et al., 1999).

Outra forma de especular a associação entre a melhor condição corporal e as concentrações de testosterona pode ser encontrada nos resultados de Brito et al. (2007), que observaram que a melhoria na nutrição dos animais resultou em aumento nas concentrações de testosterona, que foi

associado com uma maior concentração de fator de crescimento semelhante a insulina - I (IGF - I), considerado importante mediador da ação metabólica e de estímulo ao crescimento, correlacionando-se positivamente com a taxa de ganho de peso vivo e eficiência alimentar (Stick et al., 1998; Cervieri et al., 2005).

Para a verificação da possível associação da concentração sérica de testosterona e da circunferência escrotal estabeleceram-se modelos de regressão (Fig. 5). Observou-se efeito linear ($\hat{Y} = -6,144 + 0,2319 * X$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,30$), sugerindo aumento constante na

concentração de testosterona com o aumento da CE, sem um limite máximo dentro da faixa etária avaliada. Os resultados mostram que, para cada centímetro a mais na CE nos touros Guzerá, ocorreu aumento de 0,2319 ng/ml na concentração sérica de testosterona.

Courot & Ortovant (1981) descreveram que o tamanho dos testículos está relacionado com as concentrações sanguíneas de FSH, LH e testosterona, encontrando efeito linear na relação entre o tamanho testicular e o nível circulante médio de LH e de testosterona.

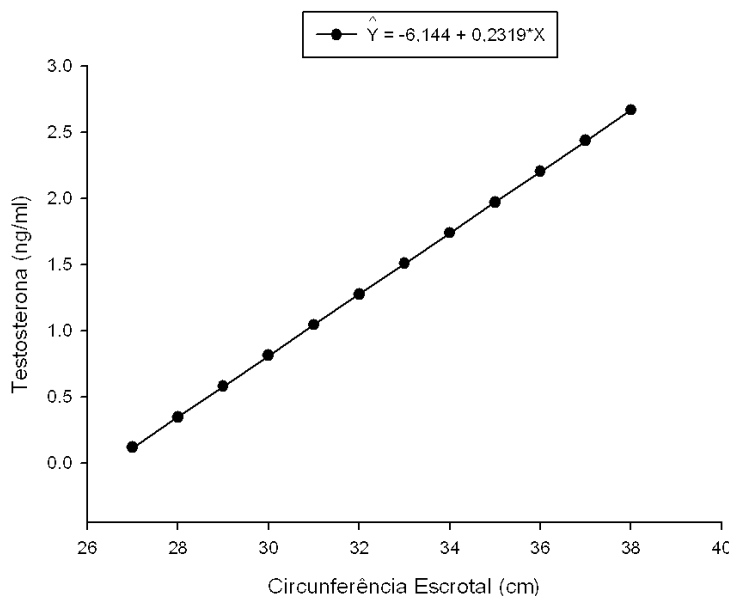


Figura 5 - Regressão das concentrações séricas de testosterona em função da circunferência escrotal, em touros jovens da raça Guzerá.

Barbosa (1987) não encontrou associação entre a concentração de testosterona e a CE em touros Canchim e Nelore, estimadas pela regressão linear. Evans et al. (1996) e Moura et al. (2002) observaram que, quando ocorre elevação na síntese de testosterona na pré- puberdade, há também aumento considerável no diâmetro dos túbulos seminíferos, devido à multiplicação das células germinativas e diferenciação das

células de Sertoli, com alteração no desenvolvimento das gônadas; fato este semelhante ao observado neste estudo para animais maduros sexualmente.

Os autores verificaram, ainda, que após a puberdade houve crescimento contínuo das medidas testiculares, e, como nesta fase não há mais proliferação das células de Sertoli este crescimento sugere aumento da

população de células germinativas no interior dos túbulos seminíferos. Como estas células são testosterona dependentes, o aumento na CE pode ser explicado desta forma.

Os achados de Brito et al. (2007) reforçam estes resultados mostrando que a melhoria nutricional precoce, resultou em maior peso testicular e produção de espermatozóides na maturidade, indicando que o aumento da secreção de LH e das concentrações de IGF-I e de testosterona durante os períodos de confinamento e peripuberal, foram associadas a uma maior proliferação e aumento da função de células testiculares.

A associação entre a concentração de testosterona e a CE é confirmada pela correlação entre as características (Tab. 4), que se apresentou favorável e de considerável magnitude (0,55).

Lunstra et al. (1978) encontrou valor semelhante em touros Hereford de sete a 13 meses de idade. Os autores descrevem ainda correlações entre 0,09 e 0,47 para touros de outras raças taurinas e seus cruzamentos. Sajjad et al. (2007) também descreveram correlação positiva entre testosterona e CE (0,41) em bubalinos e Aranguren-Méndez et al. (1995) encontraram correlação de 0,47 em tourinhos púberes 5/8 Holandês e 5/8 Pardo Suíço, o que confirma a andrógeno-dependência da CE.

Já Martin et al. (1994), estudando o efeito da nutrição no tamanho do testículo de

carneiros, verificaram que os efeitos da dieta no crescimento testicular também envolve mecanismos que são independentes das mudanças na secreção de gonadotropinas e, conseqüentemente, de esteróides gonadais.

Para a verificação da possível associação da concentração sérica de testosterona e a concentração espermática do sêmen, estabeleceram-se modelos de regressão (Fig. 6), sendo observado efeito linear ($\hat{Y} = 143,2567 + 92,703 * X$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,55$), sugerindo aumento constante na produção espermática com o aumento da concentração circulante de testosterona.

Os resultados mostram que, para cada 0,1 ng/ml a mais na concentração média de testosterona circulante em touros da raça Guzerá, de 24 a 34 meses de idade, ocorreu aumento de $9,29 \times 10^6$ espermatozóides/ml de sêmen, inferior aos descritos por Barbosa (1987), que relatou aumento de $29,44 \times 10^6$ espermatozóides/ml para touros da raça Nelore e de $149,11 \times 10^6$ espermatozóides/ml para touros da raça Canchim.

Amann (1983) e Amann & Schanbacher (1983) afirmam que a produção espermática diária aumenta por determinado tempo após a puberdade, podendo variar com a estação do ano, e entre animais de uma determinada raça ou espécie, devido a diferenças no tamanho dos testículos.

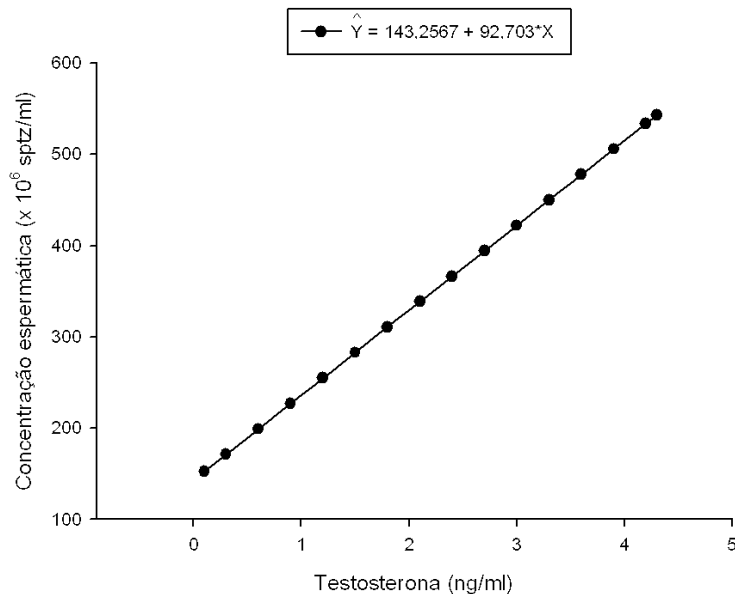


Figura 6 - Regressão da concentração espermática do sêmen em função da concentração sérica de testosterona, em touros jovens da raça Guzerá.

Verificou-se, também, correlação favorável e de considerável magnitude entre a concentração espermática e a concentração sérica de testosterona (0,71) nos animais avaliados (Tab. 4), reforçando ainda mais a associação entre estas características. Aranguren-Méndez et al. (1995) não encontraram associação entre essas características em animais mestiços.

A elevação nos níveis basais de testosterona é consequência da diferenciação das células de Leydig e está associada à proliferação das células germinativas, eventos essenciais para a puberdade (Amann & Schanbacher, 1983). O processo de multiplicação, meiose e diferenciação das células germinativas em estádios mais avançados de desenvolvimento está sincronizado com as mudanças morfológicas e a expressão gênica nas células de Sertoli e Leydig e as secreções hormonais.

As gonadotropinas (FSH e LH) controlam a proliferação e diferenciação das células de Sertoli e Leydig desde a fase pós-natal, de modo que os esteróides e fatores de

crescimento secretados por estas células têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas (Evans et al., 1996; Moura & Ericksson, 1997a; Moura & Ericksson, 1998; Anway et al., 2003; Walker, 2003; Aguiar et al., 2006).

As ações direta e indireta da testosterona na multiplicação e diferenciação das células germinativas, que irão originar os espermatozoides durante o processo da gametogênese, podem ser a explicação da associação deste hormônio com a concentração espermática nos touros já maduros sexualmente.

Courot & Ortavant (1981) verificaram, em carneiros, que a espermatogênese é sensível às variações nos níveis de hormônios circulantes, existindo correlação positiva entre o número, a renovação ou a eficiência da multiplicação das espermátogônias e as concentrações de LH no sangue periférico de carneiros adulto. Os autores verificaram, ainda, que a testosterona tem efeito no início do ciclo da espermatogênese e, quantitativamente, mantém a meiose e a

espermiogênese, mas a diferenciação das espermátides é dependente da informação armazenada no início da meiose e requer a ação da testosterona e de outros fatores.

As associações significativas encontradas entre testosterona e idade, peso corporal, circunferência escrotal e concentração espermática do sêmen, já foram discutidas anteriormente.

Observou-se associação favorável entre volume seminal e concentração de testosterona (0,56), em touros Guzerá (Tab. 4); Sajjad et al. (2007) observaram resultado semelhante em búfalos (0,34) com 14 anos de idade, sugerindo esta associação em diferentes fases da vida reprodutiva.

Estes dados podem ser explicados, em parte, pela associação encontrada entre a testosterona e a produção espermática, pela maior concentração de espermatozóides no ejaculado, e ainda pela ação direta da testosterona nas glândulas sexuais acessórias, com aumento no tamanho e função (Gonzalez, 2002); sendo estas glândulas responsáveis pela maior fração do ejaculado.

Constatou-se, ainda, correlação favorável entre os níveis séricos de testosterona e a consistência testicular (0,40), sugerindo que maiores concentrações circulantes de testosterona levariam ao aumento na tensão superficial dos testículos.

Vale Filho (1997), sugere associação entre a consistência testicular e a produção espermática normal em bovinos. Desta forma, os resultados encontrados neste estudo indicam que maiores concentrações sanguíneas de testosterona estão associadas, indiretamente, ao processo normal de gametogênese; fato reforçado pelas associações favoráveis deste hormônio com a concentração espermática, semelhantemente aos resultados de Aranguren-Méndez et al. (1995) que

descrevem a andrógeno-dependência de alguns eventos em tourinhos mestiços.

A associação favorável entre o índice de classificação andrológica (CAP) e os níveis periféricos de testosterona em touros Guzerá (0,46), pode ser explicada pelo fato da CE ser responsável por até 40% na pontuação máxima dos animais submetidos a este índice; tendo a CE alta associação com a testosterona neste estudo (Tab. 4).

Estes resultados sugerem que a seleção de touros baseada na CAP, levaria a seleção de animais com maiores concentrações séricas de testosterona; e ainda, a seleção indireta para maiores peso corporal, circunferência escrotal e concentração espermática no ejaculado, características estas indicativas, direta ou indiretamente, de fertilidade.

Não foram encontrados na literatura, dados referentes a associações entre concentrações de testosterona e consistência testicular e CAP, sobretudo em touros jovens da raça Guzerá.

A concentração circulante de testosterona não esteve correlacionada ($p>0,05$) com motilidade, vigor, turbilhonamento e defeitos espermáticos (maiores, menores e totais), confirmando os achados de literatura (Barbosa, 1987; Sajjad et al., 2007; Devkota et al., 2008).

Abdel Malak & Thibier (1985) concluíram que assim que os processos fisiológicos da espermatogênese são iniciados e controlados pelas secreções hormonais, as variações qualitativas e quantitativas do sêmen são independentes das flutuações espontâneas da testosterona, o que concorda parcialmente com os dados encontrados neste estudo.

5. CONCLUSÕES

A concentração circulante de testosterona sofre variações, mantendo níveis basais com o transcorrer do dia.

A concentração sérica de testosterona aumenta com a idade, peso corporal e circunferência escrotal, em touros jovens Guzerá.

A concentração sérica de testosterona se apresenta associada a características indicativas de melhor desempenho e fertilidade; com correlações favoráveis entre a testosterona e o peso corporal, a circunferência escrotal, a concentração espermática e o volume do sêmen.

A testosterona pode ser um parâmetro auxiliar na identificação e seleção de touros jovens da raça Guzerá, com maior potencial reprodutivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL MALAK, G.; THIBIER, M. Lack of between spontaneous fluctuations of FSH, LH and testosterone and semen output quality in young postpubertal bulls. *Zuchthygiene*, v.20, n.5, p.222-228, 1985.

AGUIAR, G.V.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.4, p.1629-1638, 2006 (Supl.).

AMANN, R.P. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.*, n.66, p.2606-2622, 1983.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.*, v.57, suppl. 2, p.380-403, 1983.

AMANN, R.P.; WALKER, O.A. Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.*, v.57, n.2, p.433-442, 1983.

ANDERSSON, M. Relationship between GnRH-induced testosterone máxima, sperm

motility and fertility in Ayrshire bulls. *Anim. Reproduc. Sci.*, v.27, p.107-111, 1992.

ANWAY, M.D.; LI, Y.; RAVINDRANATH, N. et al. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. *Journal of Andrology*, v.24, n.2, p.173-184, 2003.

ARAGUREN-MÉNDEZ, J.; MADRID-BURY, N.; GONZÁLEZ-STAGNARO, C. et al. Pubertad em toretes 5/8 Holstein y 5/8 Pardo suizo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, v.12, p.393-407, 1995.

BARBOSA, R.T. *Comportamento sexual, biometria testicular, aspectos do sêmen e níveis plasmáticos de testosterona, em touros Canchim e Nelore*. 1987. 135p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C.; OLIVEIRA, C.A. et al. Testosterone concentration in blood serum of buffalo bulls during 24 hours in winter and summer seasons. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.32, n.3, p.191-193, 1995.

BINDON, B.M.; HEWETSON, R.W.; POST, T.B. Plasma LH and testosterone in zebu crossbred bulls after exposure to estrous cow and injection of synthetic GnRH. *Theriogenology*, v.5, n.2, p.45-52, 1976.

BOLCKEY, M.A.; GALLOWAY, D.B. Hormonal control of serving capacity in bulls. *Theriogenology*, v.9, n.2, p.143-151, 1978.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; RAWLINGS, N.C. et al. Effect of improved nutrition during calthood on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular

- development in bulls. *Domestic Animal Endocrinology*, v.33, n.4, p.460-469, 2007.
- CERVIERI, R.C.; ARRIGONI, M.B.; CHARDULO, L.A.L. et al. Peso vivo final, ganho de peso, características de carcaça e concentrações plasmáticas de IGF-I e hormônios tireoideanos de bezerros mestiços Angus-Nelore recebendo somatotropina bovina recombinante (rbST) até a desmama. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.6, p.2009-2019, 2005.
- COSER, A.M.L.; FONSECA, V.O.; CHOW, L.A. Níveis de testosterona plasmática em touros zebus (*Bos indicus*) submetidos à degeneração testicular experimental. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.33, n.2, p.299-304, 1981.
- COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.30, p.47-60, 1981.
- DEVKOTA, B.; KOSEKI, T.; MATSUI, M. et al. Relationships among age, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and postpubertal Holstein bulls. *J. Vet. Med. Sci.*, v.70, n.1, p.119-121, 2008.
- EVANS, A.C.O.; PIERSON, R.A.; GARCIA, A. et al. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*, v.46, p.345-347, 1996.
- FONSECA, V.O.; SANTOS, N.R.; MALINSKI, P.R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.2, p.36-39, 1997.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Introdução a endocrinologia reprodutiva veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 87p.
- Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolvet.pdf>. Acesso em: 12/12/2007.
- GUERRA, M.O. Célula de Leydig: ultra-estrutura e síntese de testosterona. *Bol. Centro Biol. Reprod.*, v.9, p.21-33, 1990.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 6.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1995. 582p.
- JIMÉNEZ-SEVERIANO, H.; QUINTAL-FRANCO, J.; VEJA-MURILLO, V. et al. Season of the year influences testosterone secretion in bulls administered luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.1023-1029, 2003.
- KATONGOLE, C.B. Acompetitive protein – binding assay for testosterone in the plasma of bull and ram. *J. Endocrinol.*, v.51, n.2, 303-312, 1971.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 841p.
- LISE, M.L.Z.; GAMA E SILVA, T.S.; FERIGOLO, M. et al. O abuso de esteróides anabólicos-androgênicos em atletismo. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v.45, n.4, p.364-370, 1999.
- LUNSTRA, D.D.; FORD, J.J.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J. Anim. Sci.*, v.46, n.4, p.1054-1062, 1978.
- MARTIN, G.B.; TJONDRONEGORO, S.; BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.101, p.121-128, 1994.

- MOURA, A.A.; ERICKSSON, B.H. Níveis hormonais durante a pré-puberdade como indicadores do desenvolvimento testicular em touros Angus. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: SBZ, 1997.
- MOURA, A.A.; ERICKSSON, B.H. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationship with testis size and number of Sertoli and germ cells in yearling beef bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.111, p.183-190, 1997a.
- MOURA, A.A.; ERICKSSON, B.H. Níveis hormonais e parâmetros testiculares de touros Angus com anormalidades no processo de espermatogênese. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. *Anais...* Botucatu: SBZ, 1998.
- MOURA, A.A.A.; RODRIGUES, G.C.; MARTINS FILHO, R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça Nelore. *R. Bras. Zootec.*, v.31, n.2, p.934-943, 2002 (suplemento).
- OBA, E. Teores hormonais no macho. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6, 1985, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1985.
- OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; CORDEIRO, M.S. et al. Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.3, p.299-306, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acesso em: 12/12/2007.
- PAYNE, A.H.; YOUNGBLOOD, D.L. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol. Reproduc.*, v.52, n.1, p.217-225, 1995.
- PINTO, P.A.; SILVA, P.R.; ALBUQUERQUE, L.G. et al. Avaliação da biometria testicular e capacidade de monta em bovinos das raças Guzerá e Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.13, n.3, p.151-156, 1989.
- POST, T.B.; CHRISTENSEN, H.R. Testosterone variability and fertility in bulls. *Theriogenology*, v.6, n.6, p. 615-616, 1976.
- POST, T.B.; CHRISTENSEN, H.R.; SEIFERT, G.W. Reproductive performance and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology*, v.27, p.317-328, 1987.
- RENAVILLE, R.; FABRY, J.; HALLEUX, V. et al. Testosterone plasma profile, as a function of age in young bulls from the bovine double-muscled Belgian White Blue Bred. A preliminar report. *Theriogenology*, v.19, p.159-167, 1983.
- ROSA E SILVA, A.A.M. Padronização e validação do método de radioimunoensaio para dosagem de testosterona no plasma, no testículo e no fluido seminal intersticial. *Ars Veterinária*, v.15, n.2, p.74-78, 1999.
- SAJJAD, M.; ALI, S.; ULLAH, N. et al. Blood serum testosterone level and its relationship with scrotal circumference and semen characteristics in nili-ravi buffalo bulls. *Pakistan Veterinary Journal*, v.27, n.2, p.63-66, 2007.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002. 265p.
- SANCHES, A.C.; LÔBO, R.B.; BEZERRA, L.A.F. et al. Variação da secreção de testosterona no desenvolvimento corporal e idade à puberdade em touros *Bos indicus*. In:

- REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. *Anais...* Botucatu: SBZ, 1998.
- SANTOS, M.D. *Perfil de testosterona e metabólitos lipídicos, circunferência escrotal e aspectos do sêmen de touros zebu alimentados com dois níveis de concentrado e lipídeos*. 1996. 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Efeitos de dois níveis de concentrado e lipídeos sobre o perfil de testosterona e metabólitos lipídicos de touros zebu. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: SBZ, 1997.
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Concentração sérica e efeito circadiano da testosterona em touros da raça Nelore. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. (CD-Rom).
- SANTOS, M.D.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Concentrações séricas de testosterona em touros zebu. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, n.3, p.738-744, 2000.
- SANWAL, P.C.; SUNDBY, A.; EDQVIST, L.E. Diurnal variation of peripheral plasma levels of testosterone in bulls measured by a rapid radioimmunoassay procedure. *Acta Vet. Scand.*, v.15, p.90-99, 1974.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002. 265p.
- SAS. *User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 1996.
- STANBENFELDT, G.H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Dukes - Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 1996. P.603-614.
- STICK, D.A.; DAVIS, M.E.; LOERCH, S.C. et al. Relationship between blood serum insulin-like growth factor I concentration and post weaning feed efficiency of crossbred cattle at three levels of dietary intake. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.498-505, 1998.
- SUNDBY, A.; VELLE, W. Plasma concentration of testosterone in young bulls in relation to age, rate of weight gain and stimulation with human chorionic gonadotrophin. *J. Endocrinol.*, v.86, p.465-469, 1980.
- THIBIER, M. Peripheral plasma testosterone concentrations in bulls around puberty. *J. Reprod. Fétil.*, v.42, n.3, p.567-569, 1975.
- TORRES JÚNIOR, J.R.S. *Desenvolvimento ponderal e sexual de machos da raça Guzzerá (Bos taurus indicus)*. 2004. 44p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; HENRY, M. Sexual development of Guzzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. *Anim. Reprod.*, v.2, n.2, p.114-121, 2005.
- VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino, para o Brasil. Análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, 1989, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, p.94-118, 1989.
- VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.3, p.7-13, 1997.

VALLE, E.R.; DODE, M.A.N. Efeito do tempo e da temperatura, entre a coleta e a centrifugação, na concentração de progesterona do soro e plasma de vacas Nelore. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.26, n.4, p.479-485, 1991.

WALKER, W.H. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, v.144, n.9, p.3719-3721, 2003.

CAPÍTULO 3

Perfil cromatográfico de proteínas do sêmen com afinidade a heparina, em touros jovens da raça Guzerá e suas associações com características andrológicas, congelamento do sêmen e índice de fertilidade

(Chromatographic profile of heparin binding proteins of semen from young Guzerat bulls and their associations with andrologic traits, semen freezing and fertility index)

Resumo

Avaliaram-se os perfis cromatográficos por gel filtração e afinidade a heparina de proteínas do plasma seminal e aderida à membrana espermática de 19 touros jovens da raça Guzerá e suas associações com parâmetros andrológicos, congelamento do sêmen e fertilidade. A concentração de proteínas totais no plasma seminal variou de 2,86 a 78,82 mg/ml, com média de $17,18 \pm 20,49$ mg/ml, com grande variabilidade entre os touros. Tais concentrações estão correlacionadas ($p < 0,05$) com peso corporal e níveis séricos de testosterona, mostrando a influência da condição nutricional, e a dependência por testosterona, na secreção dessas proteínas; bem como com a concentração espermática e volume seminal sugerindo que a maior parte das proteínas presente no plasma seminal tem como origem os testículos e as glândulas sexuais acessórias. O perfil por gel filtração das proteínas do plasma seminal apresentou oito diferentes frações, com alguns picos se correlacionando com a idade, peso corporal, circunferência escrotal, características físicas (motilidade e concentração espermáticos) e morfológicas (defeitos espermáticos maiores) e congelabilidade do sêmen (defeitos espermáticos maiores, menores e totais pós-congelamento). No plasma seminal foram identificados cinco picos de proteínas com afinidade a heparina, também testosterona dependentes, com alguns apresentando correlação com motilidade e concentração espermáticas. Dentre as proteínas aderidas à membrana foram identificados três picos de afinidade a heparina. Observaram-se associações desfavoráveis entre o pico dois e defeitos espermáticos maiores, menores e totais pós-congelamento, sugerindo que algumas proteínas presentes nesse pico agem desfavoravelmente sobre a membrana espermática no processo de criopreservação. Não foram encontradas diferenças entre as concentrações de proteínas do plasma seminal, as presentes no pico três (33,5 a 11,6 kDa) e as com afinidade a heparina, no índice de fertilidade dos touros, medido pela taxa de gestação após inseminação artificial. Conclui-se que as avaliações das concentrações de proteínas do sêmen de touros jovens da raça Guzerá mostraram-se favoravelmente associadas com algumas características seminais no momento da ejaculação, e, também, com algumas características pós-congelamento, podendo atuar como marcadores bioquímicos para seleção de touros objetivando altas fertilidades.

Palavras-chave: cromatografia, fertilidade, Guzerá, proteínas do sêmen, sêmen, zebu.

Abstract

Chromatographic profile of heparin binding proteins of semen from 19 young Guzerat bulls, and their associations with andrologic traits, semen freezing and fertility were evaluated. Total seminal plasma protein concentrations ranged from 2.86 to 78.82 mg/ml, average of 17.18 ± 20.49 mg/ml. The seminal plasma protein profile by gel filtration showed eight different fractions, being some of them correlated to age, body weight, scrotal circumference, physical (sperm motility and concentration) and morphologic (mojar sperm defects) characteristics and freezing of the semen (post-freezing major, minor and total sperms defects). These concentrations were correlated ($p < 0.05$) with body weight and testosterone serum levels, showing the influence of the nutritional condition, and the dependence for testosterone, in the secretion of those proteins; as well as with the sperm concentration and seminal volume suggesting that most of the proteins present in the seminal plasma has as origin the testicles and the accessory sex glands. Five different peaks of heparin binding proteins were identified in the seminal plasma. Among the proteins stuck to the membrane, three peaks of heparin binding proteins were identified. Unfavorable associations were observed between the peak two and post-freezing major, minor and total sperm defects, suggesting that some proteins present in that peak act unfavorable on the sperm membrane in the freezing process. No differences in concentrations of seminal plasma proteins, presents in peak three (33.5 to 11.6 kDa) and with affinity to heparin, in the index of fertility of the bulls, measured for the gestation rate after artificial insemination was found. One's can conclude that the evaluations of seminal proteins concentrations of Guzerat young bulls shows favorably association with some seminal traits in the moment of the ejaculation, and also, with some post-freezing characteristics, acting as biochemical markers for selection of bulls aiming at high fertility.

Keywords: chromatographic, fertility, Guzerat, semen, semen of proteins, zebu.

1. INTRODUÇÃO

Na seleção de reprodutores, além das características zootécnicas de desempenho, deve-se dar ênfase à saúde reprodutiva dos animais, com avaliações que mostrem a normalidade dos órgãos reprodutivos, a capacidade quantitativa e qualitativa da produção de espermatozoides aptos à fertilização, e a habilidade sexual, avaliada por testes comportamentais (Fonseca, 2000; Corrêa et al., 2006).

Devido a problemas de baixo desempenho em alguns touros utilizados a campo em monta natural, ou em processos de congelamento do sêmen, transferência de embrião e fertilização *in vitro*, e a tendência atual da busca de marcadores bioquímicos para alta fertilidade, que atuem em conjunto a avaliação andrológica de rotina na seleção de touros para alta fertilidade, pesquisas vêm sendo realizadas avaliando as atividades de proteínas presentes no plasma seminal e ligadas a membrana espermática no processo de fecundação (Bellin et al., 1998; Feliciano Silva, 1998; Ollero et al., 1998; Sprott et al., 2000; Camargo et al., 2002).

A fertilidade do espermatozoide é resultado de uma soma de fatores, que vão desde sua produção e transporte, até e maturação, em diversas regiões do trato reprodutivo masculino (Killian, 1992).

Para que o espermatozoide realize a fertilização, torna-se necessário que possua características mínimas essenciais, como: alta motilidade, habilidade para a capacitação, de expressão da reação acrossômica e de fusibilidade à zona pelúcida e oolema (Gordon, 1994; Hafez, 1995; Feliciano Silva, 1998).

Vários testes são utilizados para a avaliação da capacidade fecundante da célula espermática nos exames andrológicos de rotina; entretanto novos testes estão sendo desenvolvidos para melhorar a acurácia

desta predição, dentre eles a reação acrossômica induzida *in vitro*, ligação a zona pelúcida, integridade de membrana, teste hiposmótico, sondas fluorescentes, citometria de fluxo entre outros (Didion & Graves, 1986; Revell & Mrode, 1994; Feliciano Silva, 1998; Rodriguez-Martinez, 2003; Celeghini et al., 2004; Balduzzi & Galli, 2004).

Neste contexto, a avaliação do perfil de proteínas do sêmen de touros, tem aberto novas fronteiras como avaliação reprodutiva complementar (Fazeli et al., 2000; Ax et al., 2002).

Vários estudos têm mostrado a existência de proteínas do plasma seminal que são fundamentais para os processos biológicos da fecundação (Bellin et al., 1994; Killian et al., 1993; Manjunath et al., 1993).

As proteínas do sêmen dos animais são de origem testicular, epididimária e de glândulas sexuais acessórias, e tem como função básica, mas primordial ao processo de fecundação, a modulação da maturação espermática pós-testicular, auxiliar na capacitação e reação acrossômica e atuar no transporte espermático e processo de fertilização no trato reprodutivo feminino (Töpfer-Petersen et al., 1998; Dacheux & Dacheux, 2002).

O objetivo do presente estudo foi descrever o perfil de proteínas do plasma seminal, e daquelas aderidas a membrana espermática, em touros jovens da raça Guzerá, buscando associações com características andrológicas, congelamento do sêmen, níveis séricos de testosterona e fertilidade a campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Diversos testes complementares vêm sendo utilizados para prever a fertilidade de reprodutores, tendo-se em vista as altas correlações com o desempenho reprodutivo, além dos diferentes aspectos da qualidade

seminal mensurados em cada teste. Novas técnicas têm sido desenvolvidas e avaliadas juntamente com as análises de rotina e os testes complementares já utilizados para a avaliação andrológica, buscando maior compreensão de seus resultados (Lena, 1997; Martins et al., 2006).

Para identificação de touros de alta fertilidade torna-se necessário, além das avaliações andrológicas de rotina, a aplicação de técnicas mais sofisticadas relacionadas à qualidade funcional do espermatozóide, aos mecanismos fisiológicos envolvidos na fertilização e aos processos bioquímicos da fertilidade (Blottner et al. 1990).

2.1. Glicosaminoglicanos (GAGs) e Heparina

Os proteoglicanos, assim como outros componentes da matriz extracelular, influenciam a adesão, motilidade, proliferação, crescimento e diferenciação de muitas células (Ratner et al., 1985). Estes proteoglicanos da matriz extracelular tem como parte central os glicosaminoglicanos (GAGs), envolvidos também na fertilização na maioria das espécies. Em bovinos, os GAGs presentes no fluido do oviduto, implicam na capacitação e reação acrossomal do espermatozóide do touro (Parrish et al., 1988; Parrish et al., 1989; Ax & Lenz, 1987).

A capacitação espermática, que ocorre no trato reprodutivo feminino, sempre diante de altas concentrações de GAGs do fluido folicular ovariano ou de outras fontes, é pré-requisito para a reação acrossômica. A heparina é estruturalmente similar aos GAGs do fluido do oviduto, desempenhando também estímulo fisiológico semelhante para promover a capacitação do espermatozóide bovino (Parrish et al., 1989).

A ligação da heparina ao espermatozóide é saturável (receptor com pontos de ligação),

reversível e dependente do pH, temperatura e nível de Ca^{++} . A concentração de heparina necessária para a capacitação é semelhante ao requerido para saturar os pontos de ligação (Handrow et al., 1984; Miller et al., 1990).

A capacitação do espermatozóide bovino estimulada pelos GAGs, passa sem dúvida por um passo de maturação induzida pelo plasma seminal (Lee et al., 1985; Florman et al., 1988), visto que o plasma seminal aumenta os locais de ligação da heparina no espermatozóide epididimal (Lee et al., 1985), além de possuir proteínas ligadoras de heparina (*Heparin Binding Proteins* - HBP) (Miller et al., 1987). Conclui-se também através dos trabalhos acima citados, que tais proteínas são essenciais no processo de fecundação, com a sua presença ou ausência interferindo na fertilidade do touro.

2.2. Proteínas do Plasma Seminal e Membrana Espermática

O plasma seminal é o fluido no qual os espermatozoides estão suspensos na ejaculação (Jobim et al., 2002). Seu volume e composição são variáveis entre as diferentes espécies (Hafez, 1995), contendo proteínas que podem influenciar na fertilidade do macho (Ax et al., 1985; Miller et al., 1990; Bellin et al., 1994, 1998; Killian et al., 1993). Vários autores destacam o papel positivo do plasma seminal na capacitação do espermatozóide (Miller et al., 1990; Bellin et al., 1994; Chandonnet et al., 1999); além dos efeitos benéficos do plasma seminal na motilidade espermática (Bass et al., 1983).

Dentre um *pool* de proteínas presentes no sêmen, alguns grupos ou proteínas isoladas apresentam destaque neste processo.

Dentre estas proteínas estão as denominadas HBP (*Heparin Binding Proteins*) com peso molecular de 14 a 18 kDa, 21,5 kDa, 24 kDa e 30 kDa (Miller et al., 1990; Bellin et al.,

1994; McCauley et al., 1999). Em bovinos os glicosaminoglicanos (GAGs), e em especial a heparina, promovem a capacitação espermatozóide do touro, entretanto, a capacitação dos espermatozóides estimulada pelos GAGs, necessita de maturação induzida pelo plasma seminal, visto que proteínas presentes no plasma seminal e que se aderem a membrana, aumentam os locais de ligação da heparina no espermatozóide.

Neste grupo de proteínas denominadas HBP, têm-se a proteína de 30 kDa, denominada FAA (*Fertility Associated Protein*), descrita como possível marcador da fertilidade de touros (Bellin et al., 1994). Posteriormente, Bellin et al. (1998) citam a HBP de 30-31 kDa, como uma das de maior importância como marcador bioquímico para fertilidade.

Bellin et al. (1994) agruparam touros de corte apenas em função da presença ou ausência de proteínas ligadoras de heparina (HBP) na membrana espermática e fluido seminal. As amostras foram analisadas somente pela afinidade a heparina em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com cinco picos de proteínas detectados. Os autores relataram diferenças relevantes de até 17% nas taxas de fertilidade alcançadas pelos diferentes grupos de touros testados em função do perfil protéico, ao final do experimento.

Diante da sugestão da influência do plasma seminal na fertilidade do macho em várias espécies, e diferenças encontradas na fertilidade individual de touros de rebanhos leiteiros, Killian et al. (1993) também se propuseram a analisar as proteínas do plasma seminal de 35 touros Holandeses.

Os touros foram agrupados de acordo com a fertilidade alcançada em inseminações artificiais. Pela análise das bandas e densitometria feitas por eletroforese uni e bi-dimensional, são citadas duas proteína (55 kDa e 4,8 pI; 26 kDa e 6,4 pI) como mais

prevalentes em touros de alta fertilidade, e duas outras (16 kDa e 4,1pI; 16 kDa e 6,7 pI) predominantes em touros de baixa fertilidade.

Já Chapman et al. (1998) estudando a proteína de 26 kDa e 6,4 pI, descrita por Killian et al. (1993), demonstraram que esta proteína é 75% idêntica e 100% homologa a proteína tipo lipocalina prostaglandina-D-sintetase, sendo esta uma das proteínas mais prevalentes nos touros de alta fertilidade.

Killian et al. (1999) citam que as duas proteínas com maior prevalência nos touros de baixa fertilidade (16 kDa com 4,1 pI e 16 kDa com 6,7 pI), podem estar associadas com *Mycoplasma genitalium*.

Roncoletta (1999) estudando o perfil eletroforético das proteínas presentes no plasma seminal e na membrana do espermatozóide de touros zebuínos e taurinos, doadores de sêmen nos grupos de alta, boa, média e baixa congelabilidade, mostrou que touros zebuínos apresentam cerca de 20% a mais de proteínas totais do que os taurinos. Outro achado foi que as bandas 45, 24 e 10,8 kDa apresentaram valores de densitometria significativamente maiores nos grupos de alta e boa congelabilidade, enquanto que a proteína de 14,4 kDa apresentou maior valor nos de média e baixa. O autor também verificou resultados de densitometria significativamente diferentes para as bandas 95, 58, 54, 45 e 36 kDa entre os diferentes grupos.

Marques & Goulart (1995) analisando o perfil eletroforético de proteínas da membrana de espermatozóides de touros de raças zebuínas e européias observaram diferenças quantitativas nos indivíduos analisados. Em quatro touros houve variações de intensidade de proteínas de baixo peso molecular de 14 a 21 kDa, com prevalência das bandas 16 e 18 kDa. Três

touros apresentaram menor intensidade da banda de 30 kDa, e um da banda 32 kDa. Já outros dois touros apresentaram maior intensidade das bandas 45 e 40 kDa. Os autores ressaltaram a possibilidade da ausência de certas proteínas devido a sua incapacidade de ligação na membrana ou a sítios de ligação saturados, após a passagem do espermatozóide no epidídimo.

Outro grupo de proteínas presente no plasma seminal que possivelmente induzem alterações na membrana espermática, essenciais ao processo de capacitação, são as BSP (*Bovine Seminal Plasma*), que se subdividem em BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30kDa.

Manjunath & Sairam (1987) caracterizaram e purificaram a família de proteínas do plasma seminal, designadas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30 kDa. Este grupo de proteínas é secretado pelas vesículas seminais, tendo as BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 peso molecular entre 15 a 16,5 kDa e a BSP-30 kDa com peso molecular entre 28-30 kDa; estando todas elas agregadas a superfície do espermatozóide após a ejeção (Manjunath et al., 1993).

Alguns estudos também mostraram que estas proteínas se ligam a apolipoproteínas (apo) A-1, bem como a apoA-1 associada com lipoproteínas de alta densidade (HDL), calmodulin e heparina (Manjunath et al., 1993).

Já é comprovado também, a ligação destas proteínas BSPs com os fosfolípidoscolina, que compreendem os principais lipídeos da membrana espermática. Sugere-se assim que estes lipídeos são pontos de ligação das proteínas BSPs com a membrana espermática (Desnoyers & Manjunath, 1992).

A atuação das BSPs na capacitação espermática ocorre de várias formas; inicialmente, após a ejeção, as proteínas

BSP se ligam aos fosfolipídeos da cabeça dos espermatozoides, promovendo o controle da desestabilização da membrana espermática, e conseqüente decapacitação espermática, prevenindo reação acrossômica prematura, até o espermatozóide adentrar o trato reprodutivo feminino e se encontrar com os HDL (lipoproteínas de alta densidade) ou com a heparina. Num segundo momento, no trato reprodutivo feminino, as HDL interagem com as BSPs ligadas à membrana, e ainda as BSP's sequestram fosfolipídeos e colesterol da membrana espermática, desencadeando a permeabilidade da membrana, ativando as aberturas dos canais de Ca^{2+} e expondo os sítios de ligação a heparina, a maior permeabilidade da membrana e o influxo de cálcio ativam o mecanismo de fosfolipase A_2 e conseqüente reação acrossomal (Manjunath et al., 1993). Diante dessas possibilidades as proteínas BSPs, não teriam somente função decapacitante, mas poderiam eventualmente promover a capacitação do espermatozóide (Salvador, 2005).

Em pesquisas anteriores os autores concluíram que a mediação da capacitação espermática pode ser modulada tanto pela ligação com a heparina (Thérien et al., 1995), como pelas lipoproteínas de alta densidade (Thérien et al., 1997) na presença das proteínas BSPs, mas promovidas por diferentes mecanismos (Lane et al., 1999).

Outras proteína também ligadas ao processo de fertilização são: a lipocalina tipo prostaglandina-D-sintetase, que está relacionada a maturação, motilidade e alterações morfológicas do espermatozóide e sua interação com o óvulo (Gerena et al., 2000); a proteína ácida do plasma seminal (aSFP) com função decapacitante, na preservação da integridade acrossomal e na regulação da motilidade espermática e atividade mitocondrial (Schöneck et al., 1996); a osteopontina com função auxiliar na capacitação, pela facilidade de ligação ao

cálcio, no trato reprodutivo feminino interligando as membranas dos gametas, aumentando a afinidade entre elas e favorecendo a ligação de um maior número de espermatozoides na zona pelúcida (Rodríguez et al., 2000; Killian, 2004).

Desta forma, a avaliação do perfil de proteínas do sêmen vem se tornando uma importante ferramenta na predição da fertilidade dos reprodutores.

2.3. Relação da Fertilidade com as Proteínas do Sêmen

Poucas e iniciais pesquisas tem sido realizadas correlacionando o perfil protéico do sêmen com a fertilidade de touros, principalmente em animais zebuínos, mas o resultados iniciais tem vislumbrado um longo horizonte de utilização de tais proteínas como testes complementares aos exames de rotina e até mesmo como potenciais marcadores genéticos para alta fertilidade.

Porém, avaliando a associação das concentrações de proteínas totais do sêmen com a fertilidade, Roncoletta et al. (2004) relataram associação desfavorável (-0,34, $p < 0,05$), ou seja, a maior concentração de proteínas totais do sêmen esteve associada com a baixa fertilidade.

Bellin et al. (1994) procuraram determinar a relação entre o grupo das HBP (proteínas com afinidade a heparina) com a fertilidade de touros de corte das raças Red Angus, Santa Gertrudes e Gelbvieh. As proteínas foram identificadas por cromatografia (HPLC), em coluna com afinidade a heparina, sendo que nos lotes com fertilidade testada, a diferença foi de até 17% para os touros com HPB na membrana espermática e não detectáveis no fluido seminal.

Alguns anos mais tarde, Bellin et al. (1998) demonstraram que a identificação das

proteínas no sêmen de touros, principalmente as de 30 kDa ligadas a heparina denominadas “*fertility associated antigen*” (FAA), juntamente com as de 24 e 21,5 kDa, podem ser usadas como indicadores da fertilidade de touros, aparentemente normais. Os autores registraram até nove pontos percentuais de diferença na taxa de fertilidade entre os grupos, em favor dos touros com FAA, acasalados a campo com relação touro:vaca de 1:25.

Killian et al. (1993) analisaram o perfil protéico do plasma seminal de 35 touros europeus, com taxa de não retorno conhecida, identificando algumas proteínas relacionadas com a fertilidade. O resultado do modelo de regressão feito a partir da densitometria das bandas de peso molecular, das quatro proteínas identificadas foi linear e favoravelmente correlacionada (0,89).

Alguns resultados mostram também que a predição da fertilidade através da análise das proteínas do sêmen poderia ser feita em touros jovens. Usando um modelo múltiplo de regressão linear, Killian et al. (2000) acharam correlações favoráveis de 0,75 entre touros jovens e adultos, e de 0,90 comparando touros de seis meses e um ano de idade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Dentre os animais previamente avaliados andrologicamente e clinicamente normais (Capítulo 1), 19 touros com idades variando de 24 a 34 meses, foram selecionados aleatoriamente, para análise do perfil de proteínas do sêmen.

Foram avaliados os perfis protéicos do plasma seminal e das proteínas aderidas à membrana espermática com afinidade a heparina, utilizando-se dos procedimentos bioquímicos de purificação e análise de proteínas, estabelecendo-se o perfil cromatográfico destas proteínas bem com

suas correlações com os demais parâmetros andrológicos, de congelação do sêmen e concentrações séricas de testosterona. Avaliou-se ainda, o efeito das proteínas na fertilidade dos reprodutores, através da inseminação artificial de fêmeas.

3.1. Coleta e Armazenamento do Sêmen para Análise

O sêmen após ser coletado por eletroejaculação, foi imediatamente resfriado e transferido, para um laboratório de campo. Para cada touro foi coletada uma alíquota de um ml de sêmen para as análises. No laboratório, a congelação da amostra foi efetuada, após diluição em uma solução tampão (ST) (Tris base 40mM, CaCl₂ 2mM, Azida Sódica 0,01%, Pepstatina A 1µM, PMSF 1mM) com inibidores de protease na proporção de 1:1, com envasamento em tubos criogênicos estéreis e congelação da amostra em nitrogênio líquido (Bellin et al., 1994).

3.2. Análises Bioquímicas

O material após descongelação foi diluído em ST (1:3) e centrifugado a 1200g por 15 minutos a 4°C, para retirada do plasma seminal e separação dos espermatozoides das amostras (Bellin et al., 1994).

O material (pellet) contendo os espermatozoides foi incubado com três ml de ST contendo Triton X-100 0,1% por um período de uma hora a 4°C. Posteriormente o material foi centrifugado em ultracentrífuga a 50.000g por 30 minutos a 4°C, para retirada das proteínas aderidas à membrana espermática. Logo após foram congeladas em freezer para posteriores análises cromatográficas (Miller et al., 1990; Bellin et al., 1994).

Do plasma seminal foi retirada uma alíquota para dosagem de proteínas totais (PT) segundo a metodologia de Lowry et al.

(1951) e imediatamente congelado em freezer para posterior processamento.

As amostras de proteínas do plasma seminal foram submetidas inicialmente a uma coluna de Superose-12, em sistema de cromatografia líquida de performance rápida (FPLC), para verificação das diferentes frações ou picos de proteínas presente no material analisado. As áreas dos picos, correspondente às representações gráficas do total de proteínas presentes, foram registradas pelo programa do FPLC e analisadas comparativamente entre touros. Para verificação da estimativa dos pesos moleculares em cada pico ou fração distinta de proteína, foi feita a calibração da coluna com seis diferentes proteínas de pesos moleculares crescente. De acordo com a regressão logarítmica do valor do peso molecular das proteínas em função do tempo de retenção na coluna foi realizado o cálculo aproximado dos pesos moleculares das proteínas de cada pico.

Com base na faixa de peso molecular mais descrita na literatura (entre 10 e 60 kDa), optou-se pela utilização do material do pico ou fração três de proteínas do plasma seminal (entre 25 a 31 minutos de retenção, que correspondem as proteínas de 33 a 11 kDa) para ser aplicado em uma coluna de afinidade a heparina (Sigma), para análises destas e localização das com maior grau de afinidade.

Após aplicação das amostras na coluna de afinidade era feita uma programação no FPLC, onde o material era lavado por 20 minutos até a eliminação de todas as proteínas sem afinidade a heparina. Somente após a leitura óptica (280 nm) retornar a linha de base, o gradiente de NaCl (de 0 a 1,5 Molar) era iniciado, com fluxo de 0,5 ml/minuto e tempo de gradiente de 150 minutos. A sensibilidade de leitura do sistema foi de 0,2.

Em função do gradiente de NaCl as proteínas aderidas à coluna pelo seu grau de afinidade, foram separadas, em uma escala, da menor até a de maior grau de afinidade à heparina.

Posteriormente as frações de cada pico de afinidade a heparina das proteínas do plasma seminal foram dosadas pelo método sugerido por Bradford (1976), para comparação entre os touros.

O material com proteínas de membrana com afinidade a heparina isolado, foi submetido diretamente a coluna de afinidade a heparina (Sigma), devido a sua menor concentração protéica, tendo a partir daí o mesmo processamento das proteínas do plasma seminal, porém com sensibilidade leitura do FPLC de 0,02.

A quantidade de proteínas de membrana com afinidade a heparina encontrada foi pequena, impossibilitando as dosagens de cada fração. Diante disto procedeu-se o cálculo das áreas gráficas dos picos dessas proteínas, como um critério de comparação entre os touros. Este cálculo foi realizado pelas comparações entre o peso do papel delimitado pela área do pico com o peso do papel de área conhecida.

3.3. Teste de Fertilidade

Para verificação dos efeitos das proteínas do plasma seminal sobre a fertilidade, os touros tiveram o sêmen coletado por eletroejaculação, e somente aqueles com motilidade igual ou superior a 60% e vigor igual ou superior a quatro tiveram o sêmen congelado e posteriormente submetidos a teste de fertilidade a campo.

Para a congelação, após as análises dos aspectos físicos foi tomada uma alíquota do sêmen para diluição e envasamento em palhetas de 0,5 ml com diluidor lactose-gema (Nagase & Niwa, 1964) (74% de solução de lactose a 11%; 6,0% de glicerina;

20% de gema de ovo e 10 mg/ml de estreptomicina e 1×10^3 UI/ml de penicilina potássica), de acordo com Abreu (2002 – comunicação pessoal). Após diluição, o sêmen foi resfriado permanecendo em equilíbrio por um período de sete horas a 5°C. Posteriormente, as palhetas permaneceram por 15 minutos em vapor de nitrogênio (-80°C), com imersão imediata, após este período, em nitrogênio líquido (-196°C).

De acordo com a disponibilidade do sêmen coletado, foi congelado para cada touro, um número variável de 20 a 25 doses, do mesmo ejaculado, com concentração de aproximadamente 80×10^6 espermatozoides na palheta.

Os critérios para utilização do sêmen pós-descongelação foram os recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). O sêmen foi considerado aprovado desde que tivesse motilidade e viabilidade $\geq 30\%$ com vigor igual ou superior a três; aqueles touros que não atingiram estes parâmetros foram classificados como reprovados pós-descongelação. Doze touros apresentaram sêmen dentro dos padrões recomendados, sendo sete, escolhidos aleatoriamente, submetidos ao teste de fertilidade.

Para os testes de fertilidade a campo foram utilizadas 73 fêmeas múltiparas, azebuadas, num total de 10 a 12 fêmeas por touro, todas criadas nas mesmas condições de manejo extensivo, com suplementação mineral *ad libitum* durante o ano todo, em boas condições reprodutivas, adequadas condições corporais e ciclando naturalmente.

As inseminações foram realizadas ao acaso, ou seja, na medida em que apresentavam os sinais característicos de estro, observados duas vezes ao dia, não tendo escolha do touro ou da vaca. O período de realização do teste foi de 01/02/2008 a 20/04/2008. A taxa de prenhez foi aferida por palpação

transretal com auxílio de aparelho de ultrasonografia.

3.4. Análise dos Dados

Os resultados obtidos com as áreas dos picos cromatográficos da gel filtração e as áreas dos picos de afinidade a heparina foram analisados de forma descritiva utilizando-se dos recursos computacionais do pacote estatístico SAS (1996).

As associações entre os perfis protéicos do sêmen dos touros com os parâmetros reprodutivos, congelação do sêmen e níveis séricos de testosterona foram avaliadas por correlações simples entre os dados (SAS, 1996).

As associações das concentrações de proteínas do plasma seminal, das proteínas do pico três (33,5 a 11,6 kDa) e das proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina, foram realizadas pela comparação dos grupos de acordo com o grau de fertilidade (alta - $\geq 60\%$ e baixa - $< 60\%$). A taxa de fertilidade foi comparada pelo método do qui-quadrado; já as médias das concentrações de proteínas do plasma seminal, do pico três e as proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o método dos quadrados mínimos do procedimento GLM do SAS (1996).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais no plasma seminal variou de 2,86 a 78,82 mg/ml, com média de $17,18 \pm 20,49$ mg/ml, com grande variabilidade entre os touros;

assim como observado em touros da raça Nelore (Assunção et al., 2003; Romitto, 2003; Salvador, 2005) e da raça Gir (Folhadella, 2008).

Comparando-se a variação encontrada nos resultados de proteína total do plasma seminal dos animais da raça Guzerá, com animais da raça Nelore (Romitto, 2003; Salvador, 2005) e Simental (Romitto, 2003), criados em manejo extensivo e com os resultados descritos por Roncoletta (2003) em touros doadores de sêmen, em centrais de coleta de sêmen, observa-se que a variabilidade nas concentrações das proteínas do plasma seminal é maior para touros criados a pasto. Pode-se sugerir que tal fato se deva ao efeito do manejo nutricional, geralmente mais satisfatório e controlado em centrais de coleta de sêmen. Salvador (2005) sugeriu ainda, que a maior concentração de proteínas totais no plasma seminal descrito por Roncoletta (2005), pode ser explicada pelo fato do autor ter trabalhado com touros adultos.

Registrou-se correlação favorável e significativa (0,46) entre a concentração de proteínas do plasma seminal e o peso corporal nos animais estudados (Tab. 1), sugerindo que a condição nutricional é fator que influencia diretamente as proteínas do plasma seminal. Desta forma, pode-se especular que o aumento na concentração nas proteínas do plasma seminal, tenha como origem o maior aporte de aminoácidos aos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, pelo aumento desses aminoácidos circulantes na corrente sanguínea em animais com melhor condição nutricional (González, 2000).

Tabela 1 – Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós-congelação, em touros da raça Guzerá

	PPS
Idade (meses)	0,27 (0,2523)*
Peso corporal (Kg)	0,46 (0,0462)
Circunferência escrotal (cm)	0,34 (0,1505)
Motilidade espermática (%)	0,33 (0,1627)
Concentração espermática (x 10 ⁶ spz/ml)	0,65 (0,0025)
Volume seminal (ml)	0,58 (0,0108)
Defeitos espermático maiores (%)	-0,25 (0,2989)
Defeitos espermáticos menores (%)	-0,18 (0,4563)
Total de defeitos espermáticos (%)	-0,31 (0,1964)
Motilidade espermática pós-congelação (%)	0,08 (0,7245)
Defeitos espermático maiores pós-congelação (%)	-0,22 (0,3582)
Defeitos espermáticos menores pós-congelação (%)	-0,22 (0,3637)
Total de defeitos espermáticos pós-congelação (%)	-0,30 (0,2078)
Testosterona (ng/ml)	0,70 (0,0008)

OBS: * = nível de significância. PPS = proteínas do plasma seminal.

Correlações favoráveis e significativas entre a concentração de proteínas do plasma seminal, o volume ejaculado (0,58) e a concentração espermática (0,65), foram registradas. Esses dados indicam que parte dessas proteínas tem origem nas glândulas sexuais acessórias, uma vez que estas são responsáveis pela maior fração do ejaculado, e nos testículos, já que o aumento na concentração espermática levaria ao aumento das proteínas do sêmen.

A associação com a concentração espermática sugere que as proteínas de origem testicular sejam sintetizadas por células que participam do processo espermato gênico, uma vez que o aumento na produção de espermatozoides e, conseqüentemente na concentração espermática, levaria ao aumento da concentração de proteínas totais do plasma seminal. Pode-se sugerir ainda, uma ação ou efeito comum e sinérgico entre a produção espermática e a síntese de proteínas do plasma seminal.

Estes dados indicam que as proteínas do plasma seminal não têm como origem apenas as glândulas sexuais acessórias, mas também os testículos e os epidídimos, conforme já sugerido por (Töpfer-Petersen et al., 1998; Sullivan, 1999; Yeung, 1999; Dacheux & Dacheux, 2002).

Encontrou-se ainda, associação altamente favorável e significativa entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a concentração sérica de testosterona (0,70) em touros jovens da raça Guzerá, similar ao descrito por Nass et al. (1990) que observaram que a síntese de algumas proteínas do plasma seminal de ratos, produzidas pelas glândulas acessórias, responde à concentração de testosterona circulante, já que tiveram seus níveis restabelecidos em ratos castrados tratados com propionato de testosterona.

A concentração de proteínas totais do sêmen não esteve associada a nenhuma outra característica reprodutiva avaliada, e ainda, as características seminais pós-congelação, semelhante ao encontrado por outros autores

(Assunção et al., 2003; Chacur et al., 2003; Salvador, 2005; Martins et al., 2006; Folhadella, 2008), porém divergindo de outros (Moustafa & Mézáros, 1980; Wolfe et al., 1993; Jobim et al., 2002; Roncoletta, 1999; Roncoletta, 2003; Folhadella, 2008) que registraram associações com a congelabilidade e a fertilidade do sêmen.

Os resultados das análises da concentração de proteínas totais do plasma seminal realizadas neste estudo apresentaram pouca relação com características do sêmen *in natura*, e ausência de associação com características seminais pós-congelação, indicativas de fertilidade. Martins et al. (2006) sugerem que a presença de várias substâncias protéicas no plasma seminal, com funções no metabolismo espermático, torna necessário mais estudos para identificação, caracterização e quantificação dessas substâncias.

Tabela 2 - Variação do tempo (minutos) de retenção em coluna de Superose 12 e suas estimativas de pesos moleculares, em oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros Guzerá

Picos	Máximo		Mínimo	
	Tempo	kDa	Tempo	kDa
1	13	3045,09	16	731,85
2	16	731,85	22	76,79
3	25	33,54	31	11,63
4	34	9,23	37	8,95
5	37	8,95	43	-
6	43	-	46	-
7	49	-	52	-
8	52	-	55	-

Os resultados encontram-se dentro dos valores descritos por Mann & Mann (1981), que observaram que as diferentes proteínas presentes no plasma seminal se encontram distribuídas entre quatro e dez diferentes frações, variando individualmente entre touros.

4.1. Perfil por gel filtração de proteínas do plasma seminal

Para análise do perfil por gel filtração de proteínas do plasma seminal, foram avaliadas as áreas dos picos cromatográficos, utilizando um total de 10 touros.

O perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal apresentou oito diferentes picos, na cromatografia de gel filtração em coluna de Superose-12, com variação do tempo de retenção e estimativas de pesos moleculares para cada pico, como descrito na Tab. 2. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Salvador (2005) para touros Nelore, e ainda, aos nove picos descritos por Folhadella (2008) para touros da raça Gir, sugerindo semelhança nos touros zebuínos.

As estimativas dos pesos moleculares foram obtidas por regressão linear entre pesos moleculares conhecidos de seis proteínas aplicadas à coluna de gel filtração e seus tempos de retenção, com variação de peso molecular entre 200 a 6,5 kDa. O pico um, e os picos seis, sete e oito apresentaram pesos moleculares estimados fora da curva padrão (Tab. 2), não apresentando, portanto, valores

confiáveis para este tipo de análise bioquímica, fato este também descrito por Salvador (2005).

Apesar de alguns dos picos obtidos por cromatografia do plasma seminal estarem fora da faixa de abrangência da regressão, bem como da faixa de separação da coluna, que é de até 200 kDa, os mesmos foram

incluídos na Tab. 2 para efeito de comparação entre os touros, salientando-se que para estes picos as faixas de pesos moleculares estimados não apresentaram exatidão numérica adequada.

A Fig. 1 ilustra o perfil padrão de registro das áreas das frações e picos da cromatografia de gel filtração.

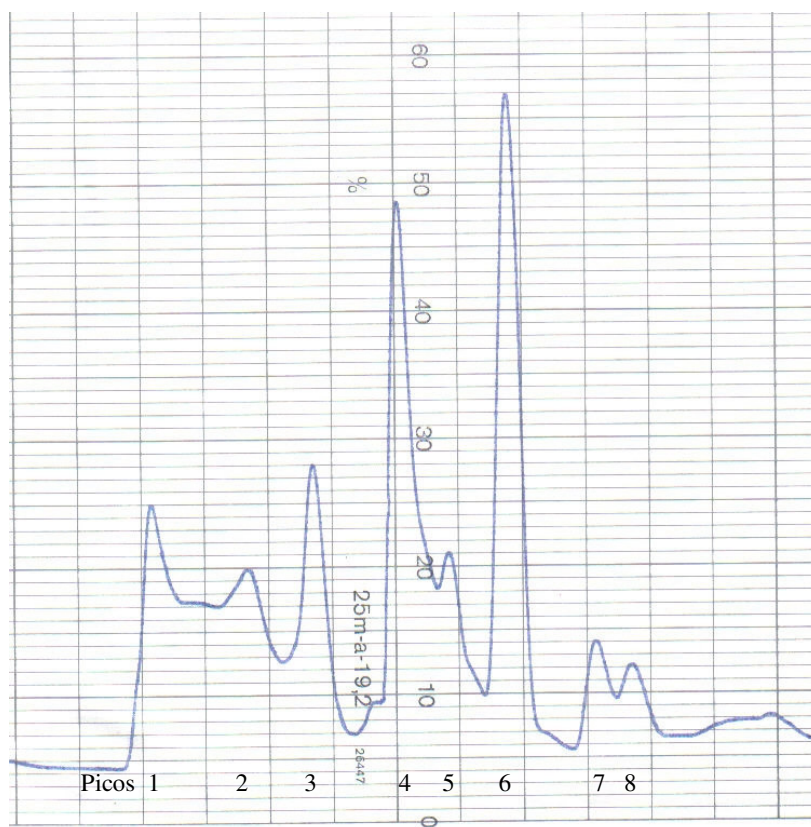


Figura 1 - Perfil padrão de picos cromatográficos de proteínas do plasma seminal, por gel filtração em coluna de Superose – 12, de touros jovens da raça Guzerá.

Para cada pico descrito foram observadas altas variabilidades entre touros, tanto na frequência quanto nas suas respectivas áreas cromatográficas, as quais estimam a

concentração das proteínas do plasma seminal, contidas nestes picos. Na Tab. 3 são apresentadas às análises descritivas da variabilidade dos picos.

Tabela 3 - Valores mínimos, máximos e médios das áreas dos oito picos cromatográficos identificados no plasma seminal de touros jovens Guzerá, e suas respectivas frequências

Picos	Valores médios das áreas (%) dos picos cromatográficos				
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Frequência (%)
1	5,22	31,68	15,31	8,82	10 (100%)
2	0,00	25,14	14,83	7,81	06 (60%)
3	0,00	25,84	13,41	8,28	08 (80%)
4	0,00	37,95	16,40	12,68	07 (70%)
5	0,00	13,96	4,54	5,32	05 (50%)
6	4,55	14,36	9,08	3,45	10 (100%)
7	0,00	3,11	2,47	0,69	04 (40%)
8	0,00	1,82	1,17	0,62	03 (30%)

Observa-se que as maiores médias de áreas foram registradas para os picos um, dois e quatro, indicando que estes representam a maior fração de proteínas do plasma seminal, ou seja, a maioria das proteínas presentes no plasma seminal dos touros da raça Guzerá se encontrava dentro destas faixas de pesos moleculares (Tab. 2); semelhante aos descritos por Salvador (2005) para touros Nelore, e por Folhadela (2008) para touros Gir.

Os picos um e seis foram os mais frequentes, estando presentes em todos os touros avaliados. O pico três em 80% dos animais; o pico quatro em 70%, o pico dois em 60% e os picos cinco, sete e oito foram detectados em 50% ou menos dos animais avaliados. Dos 10 touros avaliados, três apresentaram todos os oito picos relacionados, dois animais apresentavam seis picos, do total de oito localizados; e cinco animais apresentaram perfil cromatográfico distinto em relação aos demais, apresentando apenas cinco ou menos picos dentre os oito identificados, com diferenças também em relação às médias de concentração de proteínas totais no plasma seminal.

Observou-se associação favorável entre a concentração de proteínas do plasma seminal e o pico quatro (0,92), e tendência a correlações favoráveis com os picos dois (0,74, $p < 0,0906$) e três (0,69, $p < 0,0568$), indicando que o aumento nas concentrações totais de proteínas do plasma seminal leva a aumento na concentração de proteínas nesses picos; já a tendência de associação desfavorável com o pico oito (-0,99, $p < 0,0525$) (Tab. 4), sugere relação inversa, com a concentração de proteínas totais do plasma seminal.

Constataram-se também correlações favoráveis entre alguns dos picos encontrados (Tab. 4). O pico um esteve altamente correlacionado com o pico cinco (0,98), estando o pico cinco altamente associado com o pico seis (0,94). Verificou-se ainda tendência de associação entre os pico cinco e sete (0,98, $p < 0,0978$); as altas correlações entre os picos sugerem que as proteínas presentes nesses picos apresentam origem comum.

Tabela 4 – Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e os diferentes picos de identificação

	PPS	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
P1	-0,34 (0,3297)*	-	-	-	-	-	-	-
P2	0,74 (0,0906)	-030 (0,5601)	-	-	-	-	-	-
P3	0,69 (0,0568)	0,08 (0,8405)	0,52 (0,2827)	-	-	-	-	-
P4	0,92 (0,0033)	-0,56 (0,1821)	0,45 (0,3630)	0,53 (0,2210)	-	-	-	-
P5	0,59 (0,2877)	0,98 (0,0029)	-0,19 (0,8051)	-0,75 (0,2488)	-0,17 (0,8265)	-	-	-
P6	-0,24 (0,5000)	0,50 (0,1363)	-0,03 (0,9468)	-0,21 (0,6162)	-0,29 (0,5139)	0,94 (0,0158)	-	-
P7	0,45 (0,5412)	-0,66 (0,3300)	0,52 (0,4733)	-0,87 (0,1256)	0,49 (0,5059)	0,98 (0,0978)	-0,45 (0,5473)	-
P8	-0,99 (0,0525)	0,91 (0,2721)	0,31 (0,7960)	-0,92 (0,2396)	-0,66 (0,5395)	0,84 (0,3607)	0,35 (0,7719)	0,91 (0,2628)

OBS: * = nível de significância. PPS = proteínas do plasma seminal; P (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) = picos de proteínas do plasma seminal de touros por gel filtração.

Para verificação da possível associação entre os diferentes picos de proteínas presentes no plasma seminal dos touros, e as características andrológicas, peso corporal, idade, concentrações séricas de testosterona e características seminais pós-congelação, calcularam-se as correlações simples entre as características (Tab. 5).

A CE esteve correlacionada ($p < 0,05$) somente com o pico oito do plasma seminal (0,99), ou seja, quanto maior a CE, maiores foram às concentrações protéicas neste pico; a alta associação observada sugere que as proteínas presentes nesse pico têm como origem principal os testículos.

Observaram-se correlações favoráveis entre o pico quatro e idade (0,93), e peso corporal (0,88) dos animais sugerindo que à medida que os animais se tornam mais maduros, com conseqüente maturação dos órgãos sexuais, ocorre aumento na produção das proteínas presentes nesse pico. Observou-se, influência da condição corporal nessas proteínas, semelhante ao comentado anteriormente para a concentração total de proteínas do plasma seminal.

A correlação favorável e de alta magnitude entre o pico dois e o total de defeitos espermáticos maiores (-0,91), mostra que as

proteínas presentes neste pico, estão diretamente associadas à morfologia espermática, e que o aumento na concentração dessas proteínas está sinergicamente associada à redução dos defeitos espermáticos; sugerindo que esse pico possui proteínas que podem atuar como marcadores para morfologia espermática. Pode-se especular uma possível participação dessas proteínas no processo de espermiogênese, e/ou de maturação espermática epididimária, atuando de forma direta nos espermatozoides até a ejaculação.

Já as correlações favoráveis e de considerável magnitude entre os picos três e quatro e o volume de sêmen, 0,72 e 0,84, respectivamente; e entre o pico quatro e a concentração espermática (0,94), sugerem que estes picos de proteínas do plasma seminal estariam ligados a ejaculação. Ou seja, a produção de plasma seminal pelas glândulas acessórias, e a produção espermática pelos testículos, sendo constituídos de proteínas com origem nas glândulas sexuais acessórias, como proteínas de origem testicular e/ou epididimária, como as descritas por Dacheux & Dacheux (2002).

A alta correlação entre o pico quatro e a concentração sérica de testosterona (0,88) reforça estes achados, já que esse hormônio

atua de forma direta na função dos órgãos sexuais do macho (Hafez, 1995; González, 2002).

Tabela 5 – Correlações de Pearson entre as áreas do picos de proteínas do plasma seminal e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós-congelamento, em touros da raça Guzará

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Idade	-0,19 (0,5806)	0,54 (0,2678)	0,13 (0,7517)	0,93 (0,0017)	0,38 (0,5200)	0,24 (0,4876)	0,44 (0,5536)	-0,59 (0,5958)
Peso corporal	0,16 (0,6569)	0,18 (0,7303)	0,39 (0,3321)	0,88 (0,0089)	0,56 (0,3252)	0,46 (0,1735)	0,11 (0,8888)	-0,59 (0,5987)
CE	0,43 (0,2088)	0,31 (0,5428)	0,42 (0,2960)	0,41 (0,3504)	0,50 (0,3806)	0,04 (0,9076)	0,40 (0,5915)	0,99 (0,0477)
Motil	0,00 (0,9806)	0,28 (0,5830)	0,70 (0,0510)	0,15 (0,7320)	-0,38 (0,5182)	0,03 (0,9203)	-0,91 (0,0822)	-0,83 (0,3748)
Conc	0,09 (0,8024)	0,50 (0,3120)	0,68 (0,0606)	0,94 (0,0016)	0,06 (0,9144)	0,00 (0,9897)	0,24 (0,7503)	-0,94 (0,2135)
Vol	0,11 (0,7470)	0,76 (0,0759)	0,72 (0,0400)	0,84 (0,0157)	0,15 (0,8069)	0,19 (0,5882)	0,79 (0,2049)	-0,06 (0,9586)
DM	0,13 (0,7052)	-0,91 (0,0115)	-0,41 (0,3077)	-0,46 (0,2973)	-0,17 (0,7804)	0,04 (0,9086)	-0,90 (0,0932)	-0,89 (0,2919)
Dm	0,43 (0,2146)	0,03 (0,9510)	0,40 (0,3150)	-0,51 (0,2419)	0,19 (0,7558)	0,24 (0,4886)	-0,89 (0,1042)	-0,17 (0,8870)
DT	0,44 (0,1945)	-0,19 (0,7143)	0,23 (0,5757)	-0,58 (0,1687)	0,11 (0,8552)	0,24 (0,4963)	-0,91 (0,0880)	-0,30 (0,7994)
MotPos	0,31 (0,3804)	-0,08 (0,8779)	-0,01 (0,9632)	0,17 (0,7030)	0,38 (0,5182)	0,50 (0,1358)	0,21 (0,7852)	0,83 (0,3748)
DMPos	-0,62 (0,0547)	-0,10 (0,8386)	-0,55 (0,1496)	0,00 (0,9957)	-0,71 (0,1744)	-0,18 (0,6111)	0,75 (0,2465)	-0,30 (0,8041)
DmPos	-0,62 (0,0538)	-0,10 (0,8511)	-0,55 (0,1579)	0,00 (0,9960)	-0,71 (0,2041)	-0,18 (0,6227)	0,75 (0,3266)	-0,30 (0,9999)
DTPos	-0,62 (0,0547)	-0,47 (0,3463)	-0,77 (0,0237)	-0,10 (0,8278)	-0,68 (0,1984)	-0,37 (0,2837)	0,69 (0,3038)	-0,06 (0,9586)
Testost	0,08 (0,8179)	0,38 (0,4472)	0,69 (0,0562)	0,88 (0,0075)	0,06 (0,9216)	0,12 (0,7394)	0,02 (0,9730)	0,97 (0,1331)

OBS: * = nível de significância. PPS = proteínas do plasma seminal; P (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) = picos de proteínas do plasma seminal de touros por gel filtração; Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Motil = motilidade espermática; Concent = concentração espermática; Vol = volume do ejaculado; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = total de defeitos espermáticos; MotPos = motilidade espermática pós-congelamento; DMPos = defeitos espermáticos maiores pós-congelamento; DmPos = defeitos espermáticos menores pós-congelamento; DTPos = total de defeitos espermáticos pós-congelamento; Testos = concentração sérica de testosterona.

Registrou-se correlação favorável entre a concentração de proteínas do pico três e o total de defeitos espermáticos pós-congelamento (-0,77), sugerindo que o aumento na concentração dessas proteínas no plasma seminal de touros, levou a maior proteção espermática nos animais que tiveram sêmen congelado.

Nesse pico encontram-se proteínas de baixo peso molecular (Tab. 2), como as FAA (Bellin et al., 1994) e as BSPs (*Bovine seminal plasma proteins*) (Manjunath e Sairam, 1987), que são proteínas ligadoras de heparina e estão associadas a fertilidade do sêmen. De acordo com Thérien et al.

(1998, 1999) e Gasset et al. (2000), as BSPs possuem papel atuante no processo de criopreservação, por promover o efluxo de colesterol e fosfolípidos, causando a instabilidade da membrana, interferindo assim, na permeabilidade da membrana espermática, a qual é crucial para a sobrevivência celular durante os processos de congelamento.

Jobim et al. (2004) verificaram que a presença de proteínas de baixo peso molecular pode ser considerada marcadora de sêmen com alta qualidade a congelamento. De acordo com Garcia & Graham (1987), apesar de estudos demonstrarem que a

retirada de proteínas de baixo peso molecular (>12-14 kDa) é benéfica ao processo de congelação, nesta faixa de peso molecular existem proteínas de grande importância.

4.2. Proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina

As proteínas localizadas entre o tempo de retenção de 25 a 31 minutos na coluna de Superose-12, identificado como pico três na Tab. 2, foram homogeneizadas e aplicadas em coluna de afinidade a heparina (Sigma) para localização dos *pools* de proteínas de interesse específico.

A área do terceiro pico de proteínas, onde estão as proteínas descritas como FAA (Bellin et al., 1994, 1998; McCauley et al., 1999; Sprott et al., 2000; Liberda et al., 2002) e outras proteínas associadas a fertilidade (Ax & Lenz, 1987; Manjunath & Sairam, 1987; Seidah et al., 1987; Killian et al., 1993; Killian et al., 1999; Killian et al., 2000; Gerena et al., 1998; Mattos et al., 2004), representou em média $13,41 \pm 8,28\%$ do total de proteínas do plasma seminal, com variação de 4,16 a 25,84%, nos animais que apresentaram este pico.

Cabe ressaltar que as principais famílias protéicas associadas à fertilidade, já descritas na literatura, são proteínas com peso molecular entre 12 a 30 kDa (Einspaneir et al., 1991; Einspaneir et al., 1994; Bellin et al., 1994; Cancel et al., 1997; Desnoyers & Manjunath, 1992; Manjunath et al., 1993; Manjunath et al., 2002; Calvete et al., 1994; Calvete et al., 1995; Thérien et al., 1997). Torna-se necessário reforçar as pesquisas para melhor identificação dessas proteínas.

Após a lavagem do material do *pool* de proteínas do terceiro pico, objetivando retirar as proteínas sem afinidade a heparina, foram identificados cinco diferentes picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade a heparina. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Bellin et al. (1994), Salvador (2005) e Folhadella (2008), que também descreveram a presença de cinco picos de afinidade a heparina, para o plasma seminal de touros europeus e zebuínos.

Na Tab. 6, são apresentados os graus de afinidade, em função das concentrações de NaCl (0 a 1,5 M), bem como a frequência de ocorrência dos picos.

Tabela 6 - Descrição dos picos cromatográficos de acordo com o grau de afinidade a heparina, em função das concentrações de NaCl (0 a 1,5 M) das proteínas do plasma seminal de touros Guzerá

Picos	Grau de afinidade*	Frequência N (%)
1	10% (NaCl 0,150 M)	18 (94,73%)
2	13% (NaCl 0,195 M)	18 (94,73%)
3	23% (NaCl 0,345 M)	18 (94,73%)
4	29% (NaCl 0,435 M)	17 (89,47%)
5	33% (NaCl 0,495 M)	16 (84,21%)

*Definido pela concentração de NaCl em que ocorreu a eluição das proteínas (maiores concentrações, maior grau de afinidade).

Salvador (2005) descreveu em touros Nelore, nos cinco diferentes picos de proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina, 16 bandas de proteínas com pesos

moleculares distintos, sendo as mais intensas as de peso molecular 14, 18, 20, 21, 28, 29 e 34 kDa, ou seja, aquelas que se

apresentaram em maior concentração nos respectivos picos.

Folhadella (2008) em touros Gir, encontrou além das bandas protéicas descritas anteriormente, as bandas de 13, 16 e 30 kDa, mostrando semelhança no perfil protéico do

plasma seminal nas diferentes raças zebuínas.

Na Tab. 7 são apresentados os dados descritivos das concentrações de proteínas (mg/ml) nos cinco picos de afinidade a heparina.

Tabela 7 - Médias e desvios-padrão das concentrações (mg/ml) das proteínas do plasma seminal, com afinidade a heparina, nos cinco picos identificados e suas frequências

Pico	Mín.	Máx.	Média ± DP
1	0	0,163	0,049 ± 0,050
2	0	0,404	0,061 ± 0,093
3	0	0,659	0,091 ± 0,147
4	0	0,149	0,044 ± 0,052
5	0	0,156	0,042 ± 0,046

Para os cinco picos identificados, registrou-se grande variabilidade dos resultados, observada pelo alto desvio padrão da média, explicada em parte pelo perfil protéico diferenciado entre os animais, uma vez que todas as análises bioquímicas foram rigorosamente padronizadas.

Os resultados mostram a necessidade de estudos criteriosos envolvendo bioquímica do plasma seminal e dos espermatozoides, uma vez que mesmo diante de um grupo homogêneo de animais, como ocorreu no presente estudo, a variabilidade entre os touros manteve-se alta.

As proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina representaram 9,53% do total de proteínas avaliadas no pico três, valor inferior ao descrito por Arangasamy et al. (2005) e Folhadella (2008); e 1,68% do total de proteínas encontradas no plasma seminal, sendo este resultado superior aos registrados pelos mesmos autores.

Os picos um, dois e três, estiveram presentes em 94,7% dos animais avaliados, o pico quatro em 89,4% e o pico cinco em 84,2% dos touros; e representaram aproximadamente 17,1; 21,3; 31,6; 15,4 e 14,6% do total de proteínas com afinidade a heparina presentes no plasma seminal dos touros Guzerá.

As médias da concentração dos cinco picos variaram de 0,0421 a 0,0913 mg/ml de plasma seminal, com o terceiro pico contendo a maior fração das proteínas com afinidade a heparina, semelhante ao encontrado por Folhadella (2008) para touros da raça Gir.

Os picos dois e três, de afinidade a heparina, apresentaram correlações significativas com a concentração total de proteínas do plasma seminal, 0,57 e 0,63, respectivamente (Tab. 8), indicando que o aumento na concentração de proteínas no plasma seminal, acarretou aumento na concentração de proteínas nesses picos.

Tabela 8 – Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e os diferentes picos com afinidade a heparina do plasma seminal e da membrana espermática

	PPS	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
PH1	0,00 (0,9852)	0,42 (0,2170)	0,60 (0,2073)	0,55 (0,1561)	0,54 (0,2108)	0,76 (0,1071)	0,31 (0,3737)	0,03 (0,9640)	-0,76 (0,4443)
PH2	0,57 (0,0108)	-0,34 (0,3271)	0,53 (0,2753)	0,58 (0,1309)	0,47 (0,2849)	-0,43 (0,4693)	-0,33 (0,3501)	-0,15 (0,8435)	-0,82 (0,3877)
PH3	0,63 (0,0035)	-0,30 (0,3915)	0,47 (0,3419)	0,59 (0,1206)	0,46 (0,2944)	-0,42 (0,4723)	-0,35 (0,3209)	-0,19 (0,8022)	-0,83 (0,3750)
PH4	-0,30 (0,1970)	0,72 (0,0177)	0,00 (0,9857)	-0,35 (0,3834)	-0,44 (0,3135)	0,97 (0,0045)	0,49 (0,1475)	0,14 (0,8594)	0,11 (0,9257)
PH5	-0,26 (0,2722)	0,67 (0,0338)	0,34 (0,4994)	-0,06 (0,8729)	-0,69 (0,0824)	0,76 (0,1328)	0,37 (0,2793)	0,03 (0,9621)	0,55 (0,6267)
MH1	-0,09 (0,8278)	0,24 (0,5967)	0,24 (0,6876)	0,24 (0,5976)	-0,34 (0,5082)	0,76 (0,4466)	0,44 (0,3217)	0,17 (0,8255)	0,99 (0,0859)
MH2	-0,13 (0,8230)	-0,70 (0,2905)	0,60 (0,5882)	-0,81 (0,1884)	0,81 (0,3977)	-	-0,51 (0,4807)	-	-
MH3	-0,81 (0,3889)	-	-	-	-	-	-	-	-

OBS: * = nível de significância. PPS = proteínas do plasma seminal; P (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) = picos de proteínas do plasma seminal de touros por gel filtração; PH (1, 2, 3, 4, 5) = picos de proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina; MH (1, 2, 3) = picos de proteínas aderidas a membrana espermática com afinidade a heparina.

Os picos quatro e cinco, de afinidade a heparina, apresentaram associação com o pico um do plasma seminal, 0,72 e 0,67, respectivamente; e o pico quatro, de afinidade a heparina, apresentou associação com o pico cinco (0,97), sugerindo que estas frações são responsáveis pela maior parte de proteínas presentes nesses picos de afinidade a heparina.

Alguns picos de afinidade a heparina, apresentaram associações entre si. O pico um se correlacionou com os picos dois, quatro e cinco, respectivamente, 0,46; 0,92 e 0,74; o pico dois se associou ao pico três

(0,97) e o pico quatro se associou ao pico cinco (0,81) de acordo com a Tab. 9.

Estes resultados indicam que parte das proteínas com afinidade a heparina presente nesses picos têm com origem o mesmo órgão secretor. Entretanto, a ausência de correlações desses picos com idade e peso corporal sugere que a secreção das proteínas com afinidade a heparina, presente nesses picos, sofre pouca influência de alterações fisiológicas do organismo animal decorrentes do avanço da idade, ou de alterações da condição nutricional, pelo menos na faixa etária avaliada.

Tabela 9 – Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas com afinidade a heparina, do plasma seminal e da membrana espermática, em touros jovens da raça Guzerá

	PH1	PH2	PH3	PH4	PH5	MH1	MH2
PH2	0,46 (0,0446)	-	-	-	-	-	-
PH3	0,36 (0,1258)	0,97 (<0,0001)	-	-	-	-	-
PH4	0,92 (<0,0001)	0,15 (0,5368)	0,03 (0,8723)	-	-	-	-
PH5	0,74 (0,0002)	0,26 (0,2719)	0,10 (0,6737)	0,81 (<0,0001)	-	-	-
MH1	-0,31 (0,4546)	-0,38 (0,3491)	-0,41 (0,3118)	-0,22 (0,6006)	0,11 (0,7863)	-	-
MH2	0,91 (0,0301)	0,92 (0,0257)	0,90 (0,0333)	0,86 (0,0595)	0,81 (0,0894)	-0,34 (0,5673)	-
MH3	0,82 (0,3792)	0,94 (0,2092)	0,85 (0,3416)	0,64 (0,5499)	0,69 (0,5087)	0,96 (0,1725)	0,90 (0,2729)

OBS: * = nível de significância. PH (1, 2, 3, 4, 5) = picos de proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina; MH (1, 2, 3) = picos de proteínas aderidas a membrana espermática com afinidade a heparina.

Para verificação da possível associação entre os diferentes picos de proteínas com afinidade a heparina, presentes no plasma seminal dos touros, e as características andrológicas, peso corporal, idade,

concentrações séricas de testosterona e características seminais pós-congelação, realizou-se correlações simples entre as características (Tab. 10).

Tabela 10 – Correlações de Pearson entre as concentrações de proteínas do plasma seminal e da membrana espermática, com afinidade a heparina e idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e características seminais pré e pós-congelação, em touros da raça Guzerá

	PH1	PH2	PH3	PH4	PH5	MH1	MH2	MH3
Idade	0,41 (0,0781)	0,27 (0,2466)	0,20 (0,3977)	0,26 (0,2642)	0,17 (0,4673)	-0,26 (0,5310)	0,36 (0,5464)	0,65 (0,5485)
Peso corporal	0,41 (0,0791)	0,20 (0,4000)	0,25 (0,2949)	0,26 (0,2766)	0,00 (0,9822)	-0,19 (0,6379)	-0,14 (0,8204)	0,55 (0,6221)
CE	0,41 (0,0778)	0,30 (0,1987)	0,41 (0,0766)	0,31 (0,1920)	0,09 (0,6939)	-0,62 (0,0948)	0,34 (0,5699)	0,15 (0,8997)
Motil	0,04 (0,8415)	0,42 (0,0683)	0,49 (0,0318)	-0,12 (0,5963)	-0,02 (0,9076)	0,08 (0,8489)	-0,71 (0,1764)	0,09 (0,9385)
Concent	0,39 (0,0964)	0,47 (0,0388)	0,54 (0,0164)	0,18 (0,4601)	-0,07 (0,7532)	-0,29 (0,4709)	-0,44 (0,4525)	-0,86 (0,3391)
Vol	0,26 (0,2874)	0,22 (0,3749)	0,26 (0,2908)	0,11 (0,6594)	-0,02 (0,9252)	0,22 (0,5893)	0,53 (0,3492)	0,81 (0,3948)
DM	0,00 (0,9687)	-0,12 (0,6105)	-0,09 (0,7106)	0,11 (0,6409)	0,20 (0,3938)	-0,22 (0,5984)	0,70 (0,1841)	0,93 (0,2249)
Dm	0,05 (0,8081)	0,09 (0,7081)	0,04 (0,8621)	0,13 (0,5843)	0,23 (0,386)	0,49 (0,2082)	-0,48 (0,4111)	0,14 (0,9071)
DT	0,04 (0,8655)	0,00 (0,9753)	-0,02 (0,9187)	0,18 (0,4551)	0,32 (0,1789)	0,23 (0,5739)	0,06 (0,9151)	0,69 (0,5077)
MotPos	0,00 (0,9689)	-0,08 (0,7206)	-0,10 (0,6627)	-0,05 (0,8379)	-0,08 (0,7170)	0,21 (0,6029)	-0,81 (0,0935)	-0,68 (0,5159)
DMPos	0,16 (0,4870)	0,07 (0,7562)	0,00 (0,9921)	0,22 (0,3455)	0,34 (0,1541)	-0,17 (0,6724)	0,89 (0,0399)	0,81 (0,3948)
DmPos	0,17 (0,4927)	0,07 (0,7598)	0,00 (0,9922)	0,22 (0,3509)	0,34 (0,1564)	-0,17 (0,6866)	0,89 (0,0404)	0,81 (0,9999)
DTPos	0,11 (0,6472)	-0,01 (0,9652)	-0,07 (0,7488)	0,20 (0,3936)	0,37 (0,1088)	-0,16 (0,6979)	0,86 (0,0555)	0,81 (0,3948)
Testos	0,12 (0,6147)	0,41 (0,0735)	0,52 (0,0216)	0,14 (0,5404)	0,39 (0,0911)	0,38 (0,3456)	0,33 (0,5857)	0,46 (0,6915)

OBS: * = nível de significância. PH (1, 2, 3, 4, 5) = picos de proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina; MH (1, 2, 3) = picos de proteínas aderidas a membrana espermática com afinidade a heparina; Peso = peso corporal; CE = circunferência escrotal; Motil = motilidade espermática; Concent = concentração espermática; Vol = volume do ejaculado; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = total de defeitos espermáticos; MotPos = motilidade espermática pós-congelação; DMPos = defeitos espermáticos maiores pós-congelação; DmPos = defeitos espermáticos menores pós-congelação; DTPos = total de defeitos espermáticos pós-congelação; Testos = concentração sérica de testosterona.

Observou-se tendência de associação favorável entre o pico um de afinidade a heparina e a circunferência escrotal (0,41, $p < 0,0778$), sugerindo que parte das proteínas presentes nesse pico é de origem testicular.

Verificou-se ainda correlação favorável entre o pico três e a concentração sérica de testosterona (0,52), indicando dependência na secreção das proteínas presentes nesse pico pelos níveis séricos de testosterona, como sugerido por Nass et al. (1999) para

alguns picos de proteínas produzidos nas glândulas vesiculares de ratos.

Os autores afirmaram que as proteínas ligadoras de heparina das glândulas sexuais acessórias são testosterona dependentes, com a testosterona podendo modular este efeito na transcrição dessas proteínas. Entretanto, a síntese de algumas dessas proteínas podem ser mais responsivas que outras, fato também observado nesse trabalho.

Observaram-se correlações favoráveis entre os picos dois e três, e a concentração espermática do sêmen, 0,47 e 0,54, respectivamente; e entre o pico três e a motilidade espermática (0,49). Estes resultados sugerem que as proteínas dos picos dois e três são secretadas, principalmente, pelos testículos, e ainda, que as proteínas presentes no pico três agem no metabolismo espermático, essencial a motilidade dos espermatozoides.

Estes resultados sugerem que as proteínas do plasma seminal, com afinidade a heparina, apresentam associações com características reprodutivas indicativas de fertilidade.

4.3. Proteínas com afinidade a heparina aderidas à membrana espermática

Em função das baixas concentrações de proteínas aderidas à membrana espermática, as análises ficaram restritas às comparações das áreas dos picos e da área total das proteínas com afinidade a heparina obtidas pela cromatografia.

Diferentemente dos resultados anteriores com as proteínas do plasma seminal, onde os picos foram bem distintos na comparação entre os animais, para a cromatografia de afinidade a heparina das proteínas aderidas a membrana, os mesmos não permitiram adequada definição de suas áreas individuais, dificultando as comparações entre os touros, o que pode ser observado na Fig. 2. Face ao ocorrido optou-se também pela análise comparativa das áreas totais de proteínas com afinidade a heparina.

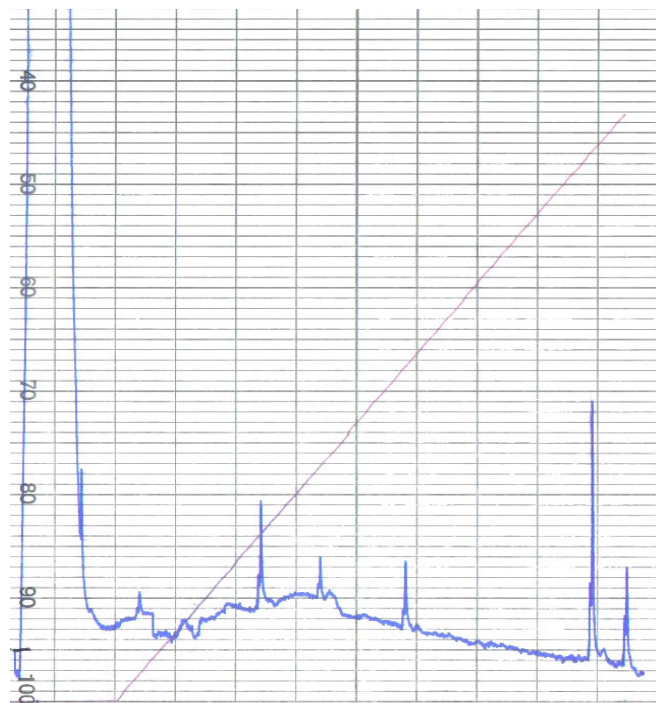


Figura 2 - Perfil padrão de picos cromatográficos de proteínas com afinidade a heparina, aderidas à membrana espermática, em touros jovens da raça Guzerá.

As análises descritivas das áreas dos picos e dos totais de proteínas com afinidade a

heparina na cromatografia são apresentadas na Tab. 11.

Tabela 11 - Estatística descritiva da área total (%) e dos picos cromatográficos das proteínas aderidas a membrana espermática, com afinidade a heparina

Picos	Mín.	Máx.	Média ± DP
Área total	0	48,71	29,62 ± 12,74
1	0	27,09	17,52 ± 6,01
2	0	13,70	10,23 ± 2,33
3	0	18,42	15,18 ± 3,44

Como nas análises com as proteínas do plasma seminal, observou-se grande variação entre as áreas totais e dos picos cromatográficos de afinidade heparina entre os touros avaliados.

As proteínas aderidas à coluna de afinidade a heparina foram eluídas por um gradiente de NaCl, sendo divididas em três frações, segundo o grau de afinidade a heparina.

De forma geral, as proteínas com afinidade a heparina da membrana plasmática dos

espermatozoides, correspondem a menos de 1% das proteínas totais (Bellin et al., 1994; Bellin et al., 1998), o que torna mais difícil o seu isolamento, purificação e identificação (Folhadella, 2008).

Na Tab. 12 é apresentada uma descrição mais detalhada dos três picos de afinidade registrados no material de proteínas aderidas a membrana, durante a corrida cromatográfica.

Tabela 12- Descrição do grau de afinidade a heparina e da frequência de aparecimento das proteínas aderidas a membrana espermática, com afinidade a heparina, para os três picos registrados

Picos	Grau de afinidade*	Frequência
1 (fração 10 a 12)	24% (0,36M NaCl)	8 (42,10%)
2 (fração 16 a 18)	34% (0,51M NaCl)	5 (26,31%)
3 (fração 20 a 22)	40% (0,60M NaCl)	3 (15,78%)

*Definido pela concentração de NaCl em que ocorreu a eluição das proteínas (maiores concentrações, maior grau de afinidade).

Salvador (2005) descreveu em touros Nelore, nos três diferentes picos de proteínas com afinidade a heparina, aderidas a membrana espermática, sete bandas de proteínas com pesos moleculares distintos, sendo as mais frequentes as proteínas de 28 e 56 kDa, localizadas em 81% dos touros, seguidas pela de 14 kDa em 62%, as de 15 e 18 kDa em 50% dos animais. As proteínas de 21 e 24 kDa foram localizadas em apenas um (6,25%) dos touros avaliados. Folhadella (2008), em touros Gir, encontrou nove bandas proteicas com afinidade a heparina na membrana espermática, sendo as bandas de 14 e 15 kDa as com maior concentração, reforçando a semelhança entre as raças zebuínas.

Na busca por associações, realizaram-se análises de correlações entre as variáveis área total e os três picos de proteínas aderidas à membrana espermática com afinidade a heparina, com características reprodutivas (CE, defeitos espermáticos maiores e totais, motilidade e concentração espermáticas, volume do sêmen), características seminais pós-congelação, proteínas do plasma seminal, idade, peso corporal e níveis séricos de testosterona.

Não foram observadas associações ($p > 0,05$) entre a concentração de proteínas do plasma seminal e a concentração daquelas com afinidade a heparina da membrana espermática, nos três picos encontrados

(Tab. 8), sugerindo que não há influência do total de proteínas do plasma seminal, nas proteínas aderidas a membrana dos espermatozoides, provavelmente pela baixa concentração das proteínas encontradas nas membranas.

Observou-se, no entanto, associação favorável e significativa ($p < 0,05$) entre o pico dois de proteínas da membrana espermática, e os picos um (0,91), dois (0,92) e três (0,90) do plasma seminal, todos com afinidade a heparina, e ainda, tendências de associações com os picos quatro (0,86, $p < 0,595$) e cinco (0,81, $p < 0,0894$) do plasma seminal, também com afinidade a heparina (Tab. 9). As altas associações observadas sugerem que as proteínas com afinidade a heparina da membrana dos espermatozoides, presentes no pico dois, têm como origem as proteínas do plasma seminal, indicando que estas se aderem à superfície espermática no momento da ejaculação. Pode-se ainda especular, que ao invés dessas proteínas de membrana ser parte das proteínas solúveis no plasma seminal, elas tenham como fonte secretora o mesmo órgão sexual.

A concentração de proteínas da membrana, presentes no pico dois, apresentou correlação desfavorável e de considerável magnitude com os defeitos espermáticos maiores (0,89) e menores (0,89) pós-congelamento, e tendência a associação desfavorável (0,86, $p < 0,0555$) com o total de defeitos espermáticos pós-congelamento (Tab. 10); indicando que essas proteínas com afinidade a heparina, presentes no pico dois, agem desfavoravelmente sobre a membrana espermática no processo de criopreservação. A ausência de associação desse pico com os defeitos espermáticos pré-congelamento, e ainda, tendência de associação desfavorável deste pico com a motilidade espermática pós-congelamento (-0,81, $p < 0,0935$) (Tab. 10), reforçam as observações descritas anteriormente.

Sullivan (2004) descreve uma proteína epididimária (P25b, proteína de 25 kDa) como um potencial marcador da fertilidade de touros, por possuir correlação positiva com perda de fertilidade durante o processo de criopreservação.

Estes dados corroboram, em parte, os dados de Jobim et al. (2002) que verificaram que uma maior concentração de proteínas totais do sêmen reduziu a motilidade pós-descongelamento. Os autores sugerem que as proteínas promovem aumento na permeabilidade da membrana espermática, o que torna os espermatozoides mais vulneráveis ao choque térmico e a injúria celular.

Já Barrios et al. (2000), afirmaram que algumas proteínas presentes no plasma seminal podem auxiliar ou prejudicar a manutenção da atividade e integridade da membrana dos espermatozoides submetidos a choque térmico. E ainda, que algumas frações proteicas de baixo peso molecular podem ser prejudiciais à célula espermática durante os processos de criopreservação, e para a motilidade espermática, sendo o efeito concentração dependente (Al-Somai et al., 1994).

Apesar de o plasma seminal ter sido considerado prejudicial para os espermatozoides, sabe-se atualmente, que em sua composição há substâncias essenciais para a viabilidade espermática (Claus, 1990; Graham, 1994; Waberski, 1997).

Estudos têm mostrado diferenças no padrão de proteínas do plasma seminal em touros com alta e baixa congelabilidade (Jobim et al., 2002; Jobim et al., 2003; Jobim et al., 2004; Roncoletta et al., 1997; Roncoletta et al., 1999); e que algumas proteínas das glândulas sexuais acessórias tem forte influência na motilidade espermática (Schoneck et al., 1996; Bao et al., 2004).

A ausência de associações entre os picos de proteínas aderidas a membrana espermática, e características como CE, idade, peso corporal, concentrações séricas de testosterona e outras medidas de concentração de proteínas do plasma seminal, mostram que a concentração dessas proteínas sofre pouca influência da alteração desses fatores, provavelmente pela baixa concentração exigida para saturação dos sítios de ligação dessas proteínas na membrana espermática.

4.4. Proteínas do sêmen e fertilidade a campo

Para verificar o efeito da concentração de proteínas do sêmen em touros jovens da raça Guzerá, na fertilidade do sêmen, realizou-se a inseminação artificial em fêmeas azebuadas, separando os animais em touros com alta ($\geq 60\%$ prenhez) e baixa ($< 60\%$ prenhez) fertilidade (Tab. 13).

Tabela 13 – Médias e desvios-padrão da concentração de proteínas do sêmen de touros jovens da raça Guzerá, conforme o índice de fertilidade

Grupo	Taxa de Prenhez (%)	ProtPlasm* (mg/ml)	ProtPico 3* (mg/ml)	ProtPlasm AHe* (mg/ml)
Alta	65,8 ± 7,9 ^a	14,00 ± 19,12	2,43 ± 3,18	0,08 ± 0,05
Baixa	43,8 ± 11,1 ^b	12,13 ± 5,56	2,67 ± 2,35	0,05 ± 0,05

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de qui-quadrado. *Não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

OBS: ProtPlasm = proteínas do plasma seminal; ProtPico 3 = proteínas seminais do pico três; ProtPlasm AHe = proteínas do plasma seminal com afinidade a heparina.

Não foram verificadas diferenças ($p > 0,05$) nas concentrações de proteínas do plasma seminal de touros Guzerá, conforme a taxa de prenhez.

A taxa de prenhez variou de 60 a 76,9%, nos animais de alta fertilidade; e de 33,3 a 55,5%, nos animais de baixa fertilidade. Estes resultados são similares aos relatados por Sprott et al. (2000) que observaram que as taxas de gestação variaram de 2,8 a 69,9% entre fêmeas inseminadas por touros negativos para a proteína de 30kDa (FAA) e entre 22,1 e 91,3 entre fêmeas inseminadas por touros positivos para a mesma proteína.

No entanto, divergem dos resultados encontrados por Roncoletta (2003), que registrou diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos de alta, média e baixa fertilidade. O autor verificou que os animais de melhor desempenho reprodutivo apresentaram menor concentração de proteínas do plasma seminal, reforçada pela mediana correlação significativa e negativa (-0,34), entre o percentual de prenhez obtida a campo e a

concentração de proteína total do sêmen, em touros Nelore adultos.

Folhadella (2008) observou associação favorável entre a concentração de proteínas totais do plasma seminal e a taxa de blastocistos (0,85), e ainda, associações entre o pico cinco do plasma seminal com afinidade a heparina, com a taxa de clivagem (0,88) e a produção de blastocistos (0,96) em teste de fertilidade *in vitro*, com touros da raça Gir, alegando que as associações do pico cinco poderiam ser devido a provável presença da FAA (30 kDa) neste pico.

Diferentemente do relatado por Roncoletta (2003) para fertilização a campo, Folhadella (2008) observou que o aumento na concentração de proteínas totais do plasma seminal de touros, aumentou a produção de blastocistos *in vitro*.

A ausência de diferença entre os grupos de proteínas nos animais de alta e baixa fertilidade encontradas neste estudo, pode

ser devido a alta variabilidade entre as concentrações de proteínas nos grupos avaliados; e ainda, ao fato de ter trabalhado com grupos de proteínas e não com proteínas específicas, que segundo a literatura estariam ligadas a fertilidade dos animais (Killian et al., 1993; Manjunath et al., 1993; Bellin et al., 1994).

5. CONCLUSÕES

Os perfis de proteínas do plasma seminal e da membrana espermática mostram grande variabilidade individual.

A concentração de proteínas do plasma seminal sofre influência da idade e da condição corporal dos animais, em touros Guzerá.

As proteínas do plasma seminal apresentam associações favoráveis com algumas características seminais, e ainda com características seminais pós-congelação que sugerem ação dessas proteínas no metabolismo espermático e no processo de criopreservação.

As concentrações de proteínas totais do plasma seminal e daquelas com afinidade a heparina, em touros jovens da raça Guzerá, são testosterona dependentes.

Um pico cromatográfico de proteínas com afinidade a heparina aderidas a membrana espermática, foi prejudicial aos espermatozoides durante a criopreservação.

A concentração total de proteínas do plasma seminal não influenciaram os índices de fertilidade em touros jovens da raça Guzerá.

Novos estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos das proteínas do sêmen na fisiologia dos espermatozoides durante o processo de fecundação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; MOLAN, P.C. et al. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. *Mol. Reprod. Dev.*, v.39, p.328-336, 1994).

ARANGASAMY, A; SINGH, L.P.; AHMED, N. et al. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.90, p.243-254, 2005.

ASSUNÇÃO, T.I.; FONTES, W.; SOUZA, M.V. et al. Perfil de proteínas do plasma seminal de touros Nelore e sua relação com a fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.2, p.187-188, 2003.

AX, R.L.; DICKSON, K.; LENZ, W. Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to non return rates of dairy bulls. *J. Dairy Sci.*, v.68, p.387-390, 1985.

AX, R.L.; LENZ, R.W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. *J. Dairy Sci.*, v.70, p.1477-86, 1987.

AX, R.L.; HAWKINS, S.K.; DENISE, T. R. et al. New developments in managing the bull. In: FIELDS, M.J.; SAND, R.S.; YELICH, J.V. *Factors affecting calf crop: Biotechnology of reproduction*. Flórida: CRC Press, 2002. P.287-296.

BAO, S.; MILLER, D.J.; MA, Z. et al. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J. Biol. Chem.*, v.279, p.38194-38200, 2004.

BALDUZZI, D.; GALLI, A. The flow cytometry in the assessment of sperm viability. In: INTERNATIONAL

- CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. *Abstracts...* Belo Horizonte: CBRA, 2004. P.533.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M. et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1531-1537, 2000.
- BASS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.68, p.275-280, 1983.
- 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. *J. Anim. Sci.*, v.72, p.2441-8, 1994.
- BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. et al. Fertility-associated antigen on Bull Sperm indicates fertility potential. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.2032-2039, 1998.
- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. *Theriogenology*, v.34, n.3, p.619-628, 1990.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.102, p.327, 1976.
- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B. et al. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, v.52, p.863-873, 1999.
- CALVETE, J.J.; RAIDÁ, M.; SANZ, L. et al. Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. *FEBS Letters*, n.350, p.203-206, 1994.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ENBLIN, M. et al. Sperm surface proteins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 3, 1995, Mariense. *Proceedings...* Mariense: 1995. P.101-105.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozóides na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.37, n.5, p.709-715, 2002.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G. Osteopontin is the 55 kDa fertility-associated protein in holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1293-1301, 1997.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrossomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. *Abstracts...* Belo Horizonte: CBRA, 2004. P.511.
- CHACUR, M.G.M.; RABESQUINE, M.M.; PARRA, J.A.G. et al. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal, correlação com o quadro espermático. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.2, p.185-186, 2003.
- CHANDONNET, L.; ROBERTS, K.D.; CHAPDELAINÉ, A. et al. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.*, v.26, p.313-318, 1990.

- CHAPMAN, D.A. et al. Identification of a fertility associated protein in bulls seminal plasma as lipocain type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.*, v.58, p.826-833, 1998.
- CLAUS, R. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl., v.40, p.117-131, 1990.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- CORRÊA, A.B.; VALE FILHO, V.R.; CORRÊA, G.S.S. et al. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.5, p.823-830, 2006.
- DACHEUX, J.L.; DACHEUX, F. Protein secretion in the epididymis. In: DACHEUX, J.; DACHEUX, F.; ROBAIRE, B. *The epididymis: from molecules in clinical practice*. New York: Plenum, 2002. P.151-168.
- DESNOYERS L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.10149-10155, 1992.
- DIDION, B.A.; GRAVES, C.N. *In vivo* capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J. Anim. Sci.*, v.62, p.1209-1213, 1986.
- ENSPANIER, R.; EINSPANER, A.; WEMPE, F. et al. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.179, n.2, p.1006-1010, 1991.
- EINSPANIER, R.; KRAUSE, I.; TOPFER-PETERSEN, E. et al. Bovine seminal plasma aSFP; localization of disulfide bridges and detection of three isoelectric forms. *FEBS Letters*, n.344, p.61-64, 1994.
- FAZELI, A.; MOORE, A.; HOLT, W.N. British andrology society workshop; sperm interactions with epithelia and their products. *Hum. Fertil.*, v.3, p.166-171, 2000.
- FELICIANO SILVA, A.E.D. *Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p.
- FLORMAN, H.M.; FIRST, N.L. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucidae in vitro. *Dev. Biol.*, v.128, p.453-463, 1988.
- FOLHADELLA, I.M. *Perfil protéico do semen e fertilidade em touros da raça Gir*. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FONSECA, V.O. O touro no contexto da eficiência reprodutiva do rebanho. *Informe Agropecuário*, v.21, n.205, p.48-63, 2000.
- GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Criobiology*, v.24, p.446-454, 1987.
- GASSET, M.; MAGDALENO, L.; CALVETE, J.J. Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.374, p.241-247, 2000.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y. et al. Identification of a fertility associated

- protein in bulls seminal plasma as lipocain-type prostaglandin D synthase. *Biol. Reprod.*, v.58, p.826-833, 1998.
- GERENA, R.L.; EGUCHI, N.; URADE, Y. et al. Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the adult murine testis and epididymis. *J. Androl.*, v.21, p.848-854, 2000.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O. et al. *Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 108p.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Introdução a endocrinologia reprodutiva veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 87p. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/endocrino/endocrinolvet.pdf>. Acesso em: 12/12/2007.
- GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. 2.ed. Oxford: Oxford University, 1994. 576p.
- GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, v.41, p.1151-1162, 1994.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 6.ed. São Paulo: Manole Ltda, 1995. 582p.
- HANDROW, R.R.; BOEHM, S.K.; LENZ, R.W. et al. Specific binding of the glycosaminoglycan ³H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J. Androl.*, v.5, p.51-63, 1984.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Albumina e osteopontina – proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do semen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, n.4, p.296-305, 2002.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do semen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, n.1, p.21-30, 2003.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v.61, p.255-266, 2004.
- KILLIAN, G.J. Fertility factors in seminal plasma. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION & REPRODUCTION, 14, 1992, Pennsylvania. *Proceedings...* Pennsylvania, 1992. P.02-07.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; CANCEL, A.M. et al. Male factors affecting sperm fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.2, p.83-85, 1999.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; CANCEL, A.M. et al. Protein markers for fertility in seminal plasma. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14, Stockholm. *Abstracts...* Stockholm, v.2, 2000.
- KILLIAN, G.J.; Evidence for the role of oviduct secretions in sperm functions, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.141-153, 2004.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. *Nature*, v.277, p.680-685, 1970.
- LANE, M.E., THÉRIEN, I., MOREAU, R. et al. Heparin and high density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.*, v.60, p.169-175, 1999.
- LEE, C.N.; HANDROW, R.R.; LENZ, R.W. et al. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrossoma reaction in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res.*, v.12, p.345-55, 1985.
- LENA, M. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, v.48, p.523-530, 1997.
- LIBERDA, J.; RYSLAVA, H.; JELINKOVA, P. et al. Affinity chromatography of bull seminal proteins on mannan-sepharose. *J. Chromat. B.*, v.780, p.231-239, 2002.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARS, A.L. et al. Proteins measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
- MANN, T.; MANN, C.L. *Male reproductive function and semen*. New York: Springer-Verlag, 1981.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M.R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem. J.*, v.241, p.685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; BAILLARGEON, L. et al. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *J. Reprod. Fertil.*, v.97, p.75-81, 1993.
- MARTINS, L.F.; PEREIRA, M.C.; GUILMARÃES, J.D. et al. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.4, p.1653-1659, 2006 (supl.)
- MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M; OBERST, E.R. et al. BSP A1/A2 a seminal plasma marker of high semen freezability. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro. *Abstracts...* Porto Seguro: CBRA, v.2, p.462, 2004.
- MARQUES, V.A.; GOULART, L.R. Perfil eletroforético de proteínas da membrana dos espermatozoides de raças européias e zebuínas. . In: SYMPOSIUM: O NELORE DO SÉCULO XXI, 3, 1995, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: 1995.
- MCCAULEY, T.C.; ZHANG, H.; BELLIN, M.E. et al. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. *Mol. Reprod. Dev.*, v.54, p.145-153, 1999.
- MILLER, D.J.; FIRST, N.L.; AX, R.L. Isolation and characterization of seminal fluid proteins that bind heparin. In: MAHESH, V.B.; DHINDSA, D.S.; ANDERSON, E.; KALRA, S.P. Regulation of Ovarian and Testicular Function. *Adv. Exp. Med. Bio.*, v.219, p.597-601. 1987.
- MILLER, D.J.; WINER, A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.*, v.42, p.899-915, 1990.
- MOUSTAFA, A.R.; MÉZÁROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing- and – thawing. *Acta Vet. Acad. Scient. Hung.*, v.28, p.403-408, 1980.

- NAGASE, H; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION & ARTIFICIAL INSEMINATION, 5, 1964, Trento. *Proceedings...* Trento, v.4, p.410-415, 1964.
- NASS, S.J.; MILLER, D.J.; WINER, M.A. et al. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Molecular Reproduction and Development*, v.25, p.237-246, 1990.
- OLLERO, M.; BESCOS, O.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. et al. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*, v.49, p.547-555, 1998.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, W. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, v.38, p.1171-1180, 1988.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; HANDROW, R.H. et al. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, v.40, p.1020-1025, 1989.
- RATNER, N.; BUNGE, R.P.; GLASER, L. A neuronal cell surface heparan sulfate proteoglycan is required for dorsal root ganglion neuron stimulation of Schwann cell proliferation. *J. Cell. Biol.*, v.101, p.744-754, 1985.
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.36, p.77-86, 1994.
- RODRIGUEZ, C.M.; JONATHAN, R.D.; KILLIAN, G.J. Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. *J. Androl.*, v.21, p.414-420, 2000.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility; still utopia? *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, p.312-318, 2003.
- ROMITTO, G.C. *Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte*. 2003, 192p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. *ARS Veterinária*, v.13, n.2, p.135-140, 1997.
- RONCOLETTA, M. *Perfil em "SDS - page" das proteínas de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a congelabilidade do sêmen de touros*. 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, n.2, p.82-86, 1999.
- RONCOLETTA, M. *Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal, relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros*. 2003. 104p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- RONCOLLETA, M.; MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H. et al. Sperm membrane

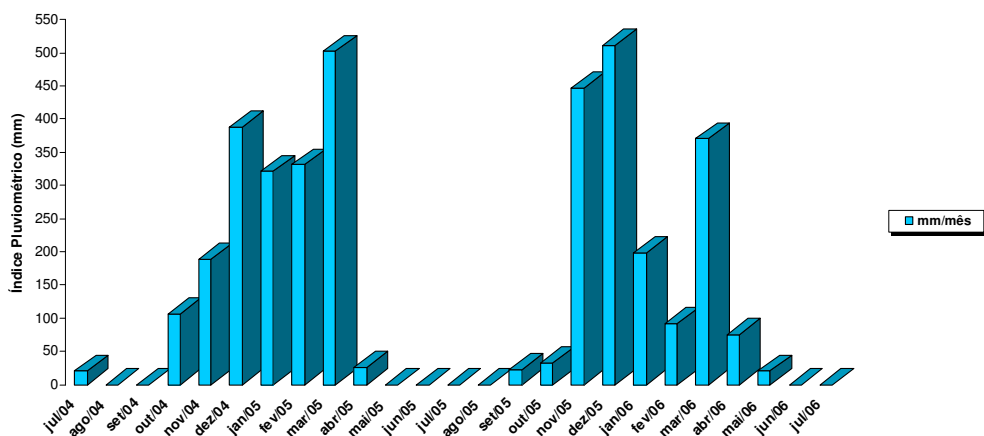
- and seminal plasma 2 D protein profiles and their relation with bull's fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro. *Abstracts...* Porto Seguro: CBRA, v.1, 2004. P.187.
- SALVADOR, D.F. *Perfis cromatográfico e eletroforético de proteínas com afinidade a heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelação de sêmen e reação acrossômica induzida*. 2005. 56p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2002. 265p.
- SEIDAH, N.G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J. et al. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma: homology to PDC-109 and the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem. J.*, v.243, p.195-203, 1987.
- SAS. *User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 1996.
- SCHONECK, C.; BRAUN, J.; EINSPIANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, v.45, p.633-642, 1996.
- SPROTT, L.R.; HARRIS M.D.; FORREST, D.W. et al. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility - associated antigen. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.795-798, 2000.
- SULLIVAN, R. Epididymal proteins necessary for sperm function: Sperm interactions with epithelia and their products. In: ADVANCED TOPICS IN ANDROLOGY, 1999, *Proceedings...* P.14.
- SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.341-347, 2004.
- THERIEN, I., BLEAU, G., MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.*, v.52, p.1372-1379, 1995.
- THERIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1080-1088, 1997.
- THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, v.59, p.768-776, 1998.
- THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipids-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, v.61, p.590-598, 1999.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P.F. et al. Spermadhesins: a new protein family; facts, hypotheses and perspectives. *Andrology*, v.30, p.217-224, 1998.
- WARBERSKI, D. Effects of semen components on ovulation and fertilization. *J. Reprod. Fétil.*, Suppl., v.52, p.105-109, 1997.
- 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.

YEUNG, C.H. The CD52-like epididymal secretory glycoprotein on sperm; sperm interactions with epithelia and their

products. In: ADVANCED TOPICS IN ANDROLOGY, 1999, *Proceedings...* P.15.

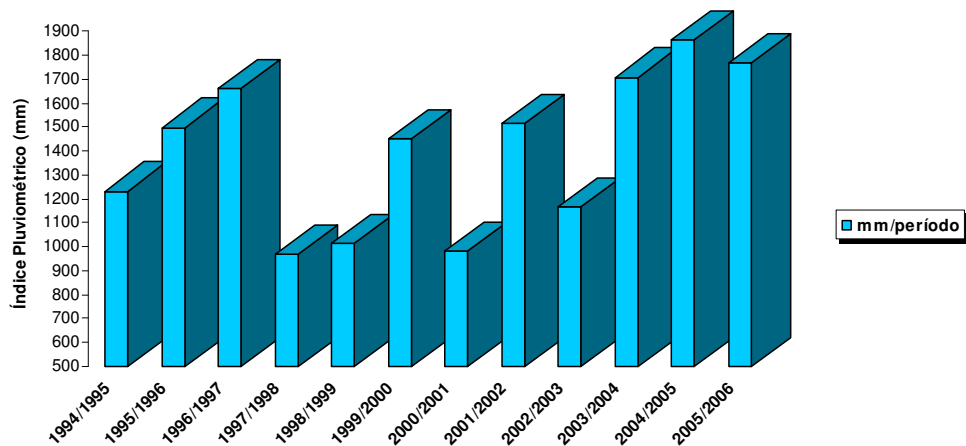
ANEXOS

Acompanhamento Meteorológico



Anexo 1- Índice pluviométrico (mm) mensal observado na sede da Fazenda Palestina, município de Unaí – MG, nas estações dos anos 2004/2005 e 2005/2006.

Acompanhamento Meteorológico



Anexo 2 – Índice pluviométrico (mm) observado na sede da Fazenda Palestina, município de Unaí – MG, nos dez anos anteriores ao período experimental.

Anexo 3 – Composição química de alimentos fornecidos aos animais, no período seco da estação 2005/2006

Análises	Resultado na MS (%)	
	Silagem de Milho	Concentrado
Matéria Seca	16,92	89,81
Proteína Bruta	4,83	22,41
FDN	87,16	16,51
FDA	51,30	-
NDT	52,92	-
Extrato Etéreo	3,51	8,38
Minerais	2,87	7,60
Cálcio	0,16	2,05
Fósforo	0,02	0,89