

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO
PLASMA SEMINAL COM AFINIDADE À HEPARINA, EM TOURINHOS GIR
SELECIONADOS PARA A PRODUÇÃO DE LEITE**

JORGE ANDRÉ MATIAS MARTINS

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG
2010**

JORGE ANDRÉ MATIAS MARTINS

**DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO E ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO
PLASMA SEMINAL COM AFINIDADE À HEPARINA, EM TOURINHOS GIR
SELECIONADOS PARA A PRODUÇÃO DE LEITE**

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

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Co-Orientador: Prof. Venício José de Andrade
Co-Orientador: Prof. Marcelo Matos Santoro

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2010**

M386d Martins, Jorge André Matias, 1979-

Desenvolvimento reprodutivo e análise das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina, em tourinhos Gir selecionados para a produção de leite / Jorge André Matias Martins. – 2010.

70 p. : il.

Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho

Co-orientadores: Venício José de Andrade, Marcelo Matos Santoro

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

Inclui bibliografia

1. Gir (Zebu) – Reprodução – Teses. 2. Testículos – Medição – Teses. 3. Sêmen – Análise – Teses. 4. Heparina – Teses. 5. Leite – Produção. Teses. I. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. II. Andrade, Venício José de. III. Santoro, Marcelo Matos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 926

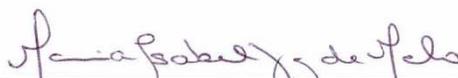
Tese defendida e aprovada em 09 de fevereiro de 2010, pela comissão examinadora constituída por:



Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Orientador



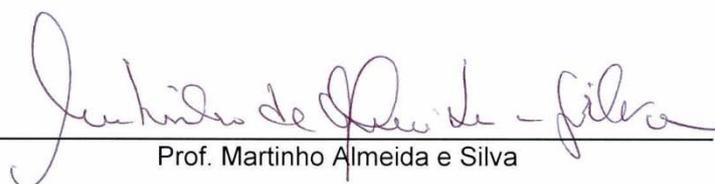
Prof. Arlindo de Alecar Araripe Noronha Moura



Profª. Maria Isabel Vaz de Melo



Prof. Alan Maia Borges



Prof. Martinho Almeida e Silva



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 55/2008**, relativo ao projeto intitulado "*Estudo proteômico do plasma seminal de tourinhos gir-leiteiro da pré-puberdade à maturidade sexual e suas correlações com a concentração sérica e seminal de testosterona, leptina, IGF-I e frutose*", que tem como responsável(is) **Venício José de Andrade**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 06/2008**.

Este certificado expira-se em **11/ 06/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 55/2008**, related to the project entitled "*Proteomic study of seminal plasma in dairy gyr bulls from prepuberty to sexual maturity and their correlations to seric and seminal concentrations of testosterone, leptin, IGF-I and fructose*", under the supervisors of **Venício José de Andrade**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 11, 2008**.

This certificate expires in **July 11, 2013**.

Belo Horizonte, 16 de Junho de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

À Bianca, minha namorada e futura esposa que, com carinho e paciência, esteve sempre ao meu lado, apoiando, compreendendo, compartilhando. Minha parceira, minha cúmplice, minha vida. Minha melhor amiga. Meu grande amor.

À minha mãe, Elizabete, ao meu pai, Raimundo, e às minhas irmãs Marcela e Renata, pelo carinho, apoio e constante incentivo que só uma família pode dar.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*.

Ao Prof. *Vicente Ribeiro do Vale Filho*, pela orientação, confiança, ensinamentos, amizade e compreensão. Serei sempre grato.

Ao Prof. *Venício José de Andrade* pela co-orientação, amizade, conhecimentos e grande auxílio.

Ao Prof. *Marcelo Matos Santoro* pela co-orientação, disponibilidade e inestimável colaboração nas idéias que conduziram a esta tese.

Aos Professores *Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura, Alan Maia Borges, Martinho de Almeida e Silva e Maria Isabel Vaz de Melo* pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. *Iran Borges* pelo apoio e pela amizade.

Aos Professores da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pelos ensinamentos e experiências transmitidos.

Agradecimento muito especial à toda minha família, pelo incondicional apoio.

Agradecimento especial aos proprietários das fazendas colaboradoras:

Senhores Rubens Resende Perez e Flávio Resende Perez, proprietários da Fazenda Brasília;

Senhor Gabriel Donato Andrade, proprietário da Fazenda Calciolândia;

Senhor Souto, Proprietário da Fazenda Agropastoril dos Poções;

Senhor Onofre Eustáquio Ribeiro, proprietário da Fazenda São Bento.

Sua colaboração foi essencial para a realização do presente trabalho

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pela colaboração e parceria.

Ao Dr. Marcos Brandão, Técnico da EPAMIG de Uberaba, pelo apoio, parceria e amizade.

Aos todos os funcionários da Fazenda Getúlio Vargas, pertencente à EPAMIG de Uberaba.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus bons amigos e “família de orientação”: Fernando, Lucas, Paulo, Pablo, Juliano, Zé Eduardo, Ticiano, Guilherme, Felipe Albano e Aníbal. Obrigado pela convivência e vossa amizade.

Aos bons amigos da Escola de Veterinária: Fabiana, Tiago “Minhoca”, Jair, Leo, Marcio, Débora, Luíza, Betina, Diego, Rafael, Telma, Rute, Rebeca, Custódio, Valéria, Guilermão, Lindomácia, Luciano “Mossoró”, Alexandre, Carlos Pancotti, Salete, Patrícia, Janaína,

Paulinha, Maria Paula. Agradeço também à memória de nossa querida amiga Leonília. Que Deus a ilumine.

Aos inesquecíveis amigos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB): Jamil, Jane, Thaís, Vinício, Jaqueline, Ângelo, Marina e Willian.

Ao grande 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.

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

Muito Obrigado.

“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana.”

Charles Darwin

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

“O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”

Albert Einstein

*“Existem dois tipos de pessoa: as que fazem o trabalho e as que recebem o crédito.
“Tente estar no primeiro grupo, tem menos competição aqui”.*

Indira Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
INTRODUÇÃO GERAL.....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
Puberdade em touros.....	19
Seleção de touros.....	21
Plasma Seminal.....	24
Proteínas do Plasma Seminal.....	25
<i>Proteínas Ligadoras ao Espermatozóide (Binder of Sperm Proteins – BSPs)</i>	26
Cromatografia Líquida de Proteínas.....	27
<i>Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular (CEM)</i>	28
<i>Cromatografia Líquida de Afinidade (CAf)</i>	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE TOURINHOS GIR SELECIONADOS PARA A PRODUÇÃO DE LEITE.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPÍTULO 2 – PROTEÍNAS SEMINAIS COM AFINIDADE À HEPARINA DURANTE DO DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE TOURINHOS GIR SELECIONADOS PARA A PRODUÇÃO DE LEITE.....	50
Resumo.....	50
Abstract.....	50
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÕES.....	65
PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÃO NA SELEÇÃO DE FUTUROS REPRODUTORES.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	Médias e respectivos desvios padrão da idade, peso vivo (PV) e perímetro escrotal (PE) na puberdade ($\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides e $\geq 10\%$ de motilidade espermática) e na maturidade sexual ($\geq 70\%$ de espermatozoides normais e $<15\%$ de DM) em tourinhos gir-leiteiro precoces e não-precoces.....	39
Tabela 2 -	Correlações de Pearson e Spearman entre os parâmetros estudados no desenvolvimento sexual de tourinhos Gir-leiteiro.....	46

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Médias (\pm desvios-padrão) da idade média e dos valores de proteínas totais e dos picos cromatográficos de afinidade à heparina do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiro precoces (PREC) e não-precoces (NPREC) avaliados desde 60 dias antes até 60 dias depois da puberdade.....	59
Tabela 2 -	Correlações de Pearson e Spearman entre os valores de proteínas seminais totais e com afinidade à heparina separadas por FPLC de afinidade e os diversos parâmetros reprodutivos estudados.....	64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Médias (\pm erros padrão) do peso vivo (PV) e do perímetro escrotal (PE) segundo a idade (figuras A e C) e a idade em relação à puberdade (figuras B e D) em tourinhos Gir precoces e não-precoces.....	41
Figura 2 -	Médias (\pm erros padrão) do volume do ejaculado (VE - A) e da concentração espermática (CONC - B) segundo a idade em tourinhos Gir precoces e não-precoces.....	43
Figura 3 -	Médias (\pm erros padrão) da motilidade espermática (MOT) e dos defeitos espermáticos maiores (DM) segundo a idade (A e C) e a idade em relação à puberdade (B e D) em tourinhos Gir precoces e não-precoces.....	45

CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Cromatogramas de exclusão molecular de proteínas do plasma seminal de tourinhos dois Gir-leiteiro coletado por dois métodos (com ou sem tampão Tris base 40mM).....	53
Figura 2 -	Experimento piloto (animal maduro) para padronização de separação das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina.....	55
Figura 3 -	Cromatogramas de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de um touro representante do grupo de animais precoces durante o seu desenvolvimento reprodutivo.....	57
Figura 4 -	Cromatogramas de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de um touro representante do grupo de animais não-precoces durante o seu desenvolvimento reprodutivo.....	58
Figura 5 -	Médias (\pm erros padrão) dos picos cromatográficos de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiro precoces e não-precoces.....	61
Figura 6 -	Médias (\pm erros padrão) dos picos cromatográficos de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiro precoces e não-precoces.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

aSFP = *Acidic Seminal Fluid Protein*
BSA = Albumina Sérica Bovina.
BSE = *Breeding Soundness Evaluation*
BSP = *Binder of Sperm Protein*
CAf = Cromatografia de Afinidade
cAMP = Adenosina Monofosfato Cíclica
CAP = Classificação Andrológica por Pontos
CEM = Cromatografia de Exclusão Molecular
CFR = Cromatografia de Fase Reversa
CIH = Cromatografia de Interação Hidrofóbica
CONC = Concentração Espermática
CTI = Cromatografia de Troca Iônica
DM = % Defeitos Espermáticos Maiores
Dm = % Defeitos Espermáticos Menores
DT = % Defeitos Espermáticos Totais
FAA = *Fertility Associated Antigen*
FMP = *Forward Motility Protein*
FPLC = Cromatografia Líquida de Desempenho Rápido
FSH = hormônio folículo estimulante
GAGs = Glicosaminoglicanos
GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GSA = Glândulas Sexuais Acessórias
HBP = *Heparin Binding Protein*
HDL = lipoproteínas de alta densidade
HPLC = Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
IGF-I = Fator de Crescimento Semelhante à Insulina - I
kDa = KiloDalton
LH = Hormônio Luteinizante
MOT = Motilidade Espermática
NDT = Nutrientes Digestíveis Totais
NORM = % de espermatozoides Normais
NPREC = Não-Precoces
P1-8 = Picos Cromatográficos de Afinidade à Heparina (P1 = s/afinidade; P2-8 = c/afinidade)
PB = Proteína Bruta
PC = Fosfatidilcolina
PCplasm = Fosfoatidilcolina Plasmogênio
PE = Perímetro Escrotal
pI = Ponto Isoelétrico
PM = Peso Molecular
PMSF = Fenil-Metil-Sulfonil-Fluorido
PREC = Precoces
PT = Proteína Total
PV = Peso Vivo
SPM = Esfingomiélin
TIMP-2 = Inibidor Tecidual de Metaloproteinases 2

VE = Volume do Ejaculado
Vi = Volume Interno da coluna
VIG = Vigor Espermático
Vo = Volume *Void*
Vt = Volume total da coluna.

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária brasileira até pouco tempo era caracterizada como atividade pioneira, através da expansão da fronteira agrícola, crescendo horizontalmente pela ocupação de terras novas e cultivadas ou de terras esgotadas pela exploração agrícola, sob um sistema extensivo de criação. Atualmente, com a limitação na expansão de novas fronteiras, a ocupação de novas áreas tende a ser substituída pelo aumento da produtividade em áreas já ocupadas, exigindo maior eficiência dos sistemas de produção.

Uma forma de atingir tal objetivo é pela exploração do potencial genético dos animais de interesse econômico que permite intensificar a produtividade, seja pelo incremento na taxa de conversão alimentar, nos ganhos de peso do nascimento à desmama, na precocidade da idade e peso ao abate, qualidade da carcaça, produção de leite, resistência às condições ambientais adversas, dentre outros, além de fatores relacionados à eficiência reprodutiva, como fertilidade e precocidade sexual de touros e vacas.

Para a pecuária leiteira do Brasil, a raça Gir-leiteiro constitui-se em excelente opção para o aumento da produtividade, em razão, principalmente, do fato de ser a raça preferencial em cruzamentos com gado leiteiro europeu, por contribuir com produção, rusticidade, vigor e docilidade, características fundamentais para a produção econômica de leite (ABCGIL, 2007). Atualmente, essa raça passa por período de acelerado desenvolvimento, com crescente demanda por animais ou sêmen, tanto no Brasil, e em outros países tropicais, como atesta a marca de 803.411 doses de sêmen vendidas no ano de 2008 (ASBIA, 2010).

Apesar de suas características produtivas favoráveis, a raça Gir é uma das mais tardias dentre as raças zebuínas nacionais, mesmo em se tratando de animais geneticamente melhorados. Esses animais submetidos à condições de meio ambiente desfavoráveis, podem ter dificuldades em expressar as características ligadas à reprodução, podendo atrasar a puberdade e a maturidade sexual e, conseqüentemente, a identificação precoce desses genótipos na população (Guimarães et al., 1993; Dias et al., 2003; Vale Filho et al., 2003; Vale Filho et al., 2004).

O aumento da potencialidade genética é, em sua maior parte, atribuído aos touros, que, embora representem apenas 3 a 5% do rebanho, são responsáveis por acasalar várias fêmeas em uma estação de monta, gerando muitos descendentes por ano, que serão portadores de sua carga genética. Com o advento da inseminação artificial, um único touro selecionado pode gerar centenas de descendentes por ano e aumentar exponencialmente a sua contribuição para a composição dos futuros rebanhos. Esta grande pressão de seleção permite que as progênes de touros de alto valor genético constituam as próximas gerações dos rebanhos, melhorando a produtividade do sistema de criação como um todo. Em razão dessas circunstâncias, grande atenção deve ser dada ao manejo reprodutivo do touro, direcionando sua seleção para o incremento da produtividade global do sistema de criação.

A seleção de reprodutores bovinos é baseada na produtividade de sua progênie, ou seja, touros que dão origem a animais que produzam mais leite ou ganhem pesos mais rápido e com produção de carcaças de maiores rendimentos são os escolhidos para utilização na reprodução. Esse critério de seleção é adotado mundialmente, porém alguns touros testados e aprovados para características como o ganho de peso ou produção de leite, habilidade materna e

qualidade do úbere, dentre outras, podem apresentar inadequados índices de fertilidade a campo. Assim, o reduzido desempenho reprodutivo na bovinocultura pode causar grande impacto na viabilidade econômica de muitas propriedades, o que torna a avaliação precoce da fertilidade do touro fator importante para a produtividade e para a maior lucratividade dos sistemas de produção.

A avaliação clínica-andrológica com a colheita e análise do sêmen é a técnica mais utilizada para se prever a fertilidade de touros (Kennedy et al., 2002) e a utilização destes exames, mesmo em touros de raças zebuínas, a partir de um ano de idade, permite identificar reprodutores superiores cada vez mais jovens (Bruner et al., 1995; Oliveira et al., 2002; Vale Filho et al., 2004; Andrade et al., 2004), sendo essencial para se acelerar o ganho genético por geração (Fordyce et al., 2002), uma vez que as raças zebuínas atingem a puberdade e a maturação sexual mais tardiamente que as raças européias (Kennedy et al., 2002).

Contudo, constata-se que há variação na fertilidade de touros aprovados por meio dos exames andrológicos, o que sugere que outros fatores, possivelmente bioquímicos, estão envolvidos na expressão do potencial reprodutivo do reprodutor. Ao estudarem touros da raça Holandesa com histórico reprodutivo conhecido, Killian et al. (1993) observaram quatro proteínas relacionadas à fertilidade dos animais. Duas delas (26 kDa, pI 6,2 e 55 kDa, pI 4,5) ocorriam com maior frequência e quantidade em touros de alta fertilidade, enquanto as outras duas (16 kDa, pI 4,1 e 16 kDa, pI 6,7) foram observadas com maior frequência em touros de baixa fertilidade. Outras proteínas presentes no plasma seminal, oriundas das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo foram identificadas e correlacionadas aos índices de fertilidade de touros da raça Holandesa (Moura et al., 2006a; 2006b; 2007a; 2007b). Assim, é possível que marcadores seminais

para vários parâmetros reprodutivos possam também ser identificados na raça Gir-leiteiro.

Estas informações nortearam a realização desta pesquisa que teve como objetivos: (1) traçar o perfil andrológico dos tourinhos da raça Gir-leiteiro confinados e alimentados com um elevado plano nutricional, dos 13 aos 23 meses de idade (pré-puberdade à maturidade sexual), visando a identificação de animais precoces e não-precoces, assim como diferenças no desenvolvimento reprodutivo; (2) traçar o perfil cromatográfico das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina dos tourinhos Gir-leiteiro precoces e não-precoces, da pré-puberdade à maturidade sexual, identificar diferenças na sua secreção e correlacioná-las aos parâmetros reprodutivos.

REVISÃO DE LITERATURA

Puberdade em touros

A puberdade em mamíferos é o processo de aquisição da competência reprodutiva e o seu início depende da habilidade de neurônios hipotalâmicos específicos em produzir hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em quantidades suficientes para promoverem e suportarem a gametogênese (Senger, 2003). Para machos bovinos, uma definição prática e bem aceita internacionalmente para puberdade é o momento em que os animais passam a apresentar no seu ejaculado 50 milhões de espermatozoides, com, no mínimo, 10% de motilidade individual progressiva (Wolf et al., 1965). Essa fase é caracterizada pelo rápido aumento testicular, mudanças no modelo de secreção do hormônio luteinizante (LH), o que acarreta o gradual aumento da testosterona sanguínea e,

conseqüentemente, o início do processo espermatogênico (Amann e Schambacher, 1983).

O requisito fundamental para o estabelecimento da puberdade é a secreção de GnRH em frequências e quantidades apropriadas para estimularem a liberação de gonadotropinas pelo lobo cranial da hipófise. Essas gonadotropinas promoverão gametogênese, esteroidogênese e o desenvolvimento dos tecidos reprodutivos. O número de neurônios liberadores que secretam GnRH, sua distribuição e sua forma são previamente estabelecidos antes da puberdade, porém a sua funcionalidade aumenta com a puberdade (Senger, 2003).

Ocorre aumento linear nas concentrações séricas de LH e de testosterona com o avanço da idade próxima à puberdade (Lunstra et al., 1978). O aumento nas concentrações de LH estimula a produção e secreção de testosterona pelas células de Leydig, presentes no tecido intersticial do testículo (Ashdown e Hafez, 1995; Junqueira e Carneiro, 1999, Senger, 2003) e rápidos aumentos no tamanho dos testículos e de estruturas sexuais acessórias (epidídimos e glândulas sexuais acessórias) podem ser observados neste período (Rawlings et al, 2008).

Na puberdade, os testículos crescem de forma mais rápida num modelo aproximadamente linear (Pimentel et al., 1984). Esse crescimento mais acelerado coincide com o período de ascensão da curva sigmóide de crescimento testicular, com uma fase inicial mais lenta, havendo um período de aumento mais acentuado que ocorre com a puberdade, seguido de uma desaceleração por volta da maturidade sexual (Bergman et al., 1998). O aumento mais acelerado do testículo se deve ao crescimento das estruturas histológicas testiculares observadas na puberdade. Em machos *Bos taurus taurus*, o diâmetro dos túbulos seminíferos aumenta gradualmente

até 20-25 semanas de idade, e mais rapidamente, a partir dessa idade. O aumento no diâmetro e no comprimento dos túbulos seminíferos é o maior responsável pelo aumento no tamanho dos testículos até 32 semanas de idade, contudo o comprimento dos túbulos continua a aumentar depois dessa idade (Rawlings et al, 2008)

Há considerável melhoria na qualidade seminal com o avanço da puberdade. Com o crescimento do tecido testicular (Rawlings et al, 2008) ocorre aprimoramento no processo espermatogênico, levando ao aumento da produção de espermatozóides com menor percentual defeitos espermáticos (Brito et al., 2004; Torres-Júnior e Henry, 2005).

O aumento da secreção de testosterona pelas células de Leydig, em decorrência do aumento das concentrações periféricas de LH, estimula o desenvolvimento de estruturas sexuais acessórias (epidídimos e glândulas sexuais acessórias) (Rawlings et al, 2008). No epidídimo ocorre a maturação espermática, que é o conjunto de alterações morfológicas e metabólicas que ocorrem no espermatozóide durante o trânsito epididimário, logo após a sua formação no testículo, que aumentam o poder fecundante do mesmo (Cornwall e von Horsten, 2007). Tais alterações incluem, não só a condensação final do núcleo, modificação na forma do acrossoma, alterações na constituição lipídica e protéica da membrana plasmática e na migração da gota citoplasmática proximal para a porção distal da peça intermediária, como também a aquisição da competência para a motilidade espermática progressiva (Barth e Oko, 1989).

Componentes do plasma seminal também exercem influência sobre a motilidade espermática. A frutose e o ácido cítrico são alguns dos principais metabólitos secretados pelas glândulas sexuais acessórias, e utilizados como fonte de energia para a fisiologia espermática. Rawlings et al.

(2008) afirmaram que os conteúdos de frutose e de ácido cítrico presentes no plasma seminal de touros europeus aumentam significativamente após os cinco meses de idade (pré-puberdade), influenciando, também, no aumento da motilidade espermática. Elementos protéicos do plasma seminal também exercem influência na motilidade espermática. Uma glicoproteína presente no plasma seminal, denominada proteína da motilidade espermática progressiva (Forward Motility Protein – FMP), é capaz de induzir, na presença de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), a motilidade progressiva em espermatozoides de touros oriundos da cabeça do epidídimo (Acott e Hoskins, 1978). Os autores verificaram que tal proteína foi encontrada em maior quantidade no epidídimo, sugerindo que este compartimento seja o seu sítio de produção e secreção, e ainda que ela modifique o metabolismo do espermatozoide durante a maturação espermática.

Do ponto de vista do melhoramento genético e de manejo reprodutivo de um rebanho bovino, a puberdade precoce é mais importante, principalmente no macho (Senger, 2003). Animais com potencial genético para atingir a puberdade com menores idades poderiam ser utilizados mais cedo nas atividades reprodutivas como em estações de monta e na rotina de coleta de sêmen para criopreservação em centrais de inseminação. A idade em que os animais atingem a puberdade tem efeito direto sobre a idade em que os mesmos poderiam ser amostrados para testes de progênie, disponibilizando mais cedo informações sobre os atributos genéticos de sua progênie e finalmente acelerando o ganho genético do rebanho (Jiménez-Severiano, 2002).

Seleção de touros

O potencial genético dos animais domésticos permite intensificar a produtividade de um rebanho, seja este potencial para alta conversão alimentar, ganho de peso precoce, peso ao nascimento e à desmama, idade e peso ao abate, qualidade da carcaça, resistência às condições ambientais, além de fatores relacionados à eficiência reprodutiva, como fertilidade e precocidade sexual de touros e vacas.

Considerando que os touros respondem por 3-5% de um rebanho (Molina et al., 2000), e que o touro utilizado à campo é responsável por metade do material genético de 20 a 50 bezerros produzidos/ano, maior ênfase deve ser dada na sua avaliação (Foote et al., 2003). Desta forma, fica evidente a necessidade de se estabelecerem critérios de seleção para a melhoria da fertilidade da raça, utilizando, não somente pressão de seleção genética para alta produção zootécnica, como também a qualidade seminal dos touros.

Em razão da importância do touro para um sistema de criação de bovinos, um exame clínico-andrológico criterioso, assim como os testes de libido e capacidade de serviço devem ser realizados a fim de se selecionarem animais mais aptos à reprodução, visando maximizar a eficiência reprodutiva e obter elevados índices de prenhez (acima de 70%) nos primeiros 21 dias de estação de monta. Estas avaliações no touro devem ser conduzidas de modo a possibilitar tempo suficiente para a substituição e adaptação dos touros com problemas. A sequência de atividades, descritas a seguir, é uma compilação literária (Vale-filho 1988; Barth e Oko, 1989.; Vale Filho, 1989; Vale Filho, 1994; Johnson, 1997; Vale Filho, 1997; CBRA, 1998; Valle et al, 1998; Vale Filho, 2001) sobre o exame andrológico para a seleção

de touros visando a máxima eficiência reprodutiva

O exame clínico-andrológico compreende quatro etapas: a identificação do animal, o exame clínico, o espermiograma e as avaliações do comportamento sexual.

A identificação deve basear-se nos dados do registro genealógico, quando houver, e, em não havendo, obter-se o máximo de informações possíveis, como procedência, idade, paternidade, etc.

No exame clínico devem ser considerados: **1) histórico e anamnese**, que devem relatar sucintamente ocorrências relevantes sobre os animais e o rebanho ao qual pertencem (desempenho em estações de monta anteriores, estado sanitário, alimentação fornecida, etc.); **2) condições gerais**, onde devem ser avaliados, especialmente, o peso vivo e cobertura muscular relativos à raça e idade do animal, além dos sistemas respiratório, circulatório, digestivo e locomotor; e **3) sistema genital**, envolvendo especificamente a inspeção e palpação dos:

- Cordões espermáticos: devem ser verificadas as condições de distensão, inexistência de cistos ou formações varicocélicas e processos inflamatórios;
- Escroto: devem ser verificadas a espessura e integridade da pele, presença de lesões irritativas ou não;
- Testículos: devem ser inicialmente visualizados e considerados com relação à sua simetria e proporcionalidade ao peso corporal e idade do animal, para depois serem aferidos quanto ao comprimento e largura individuais e o perímetro escrotal. Deve-se ressaltar, também, consistência e elasticidade, que devem ser avaliadas individualmente num escore de 1 a 5 e para as quais deve ser considerado o aspecto de

homogeneidade ou não. Outras circunstâncias também devem ser relatadas, como mobilidade, posicionamento, sensibilidade, etc.

- Epidídimos: as três porções (cabeça, corpo e cauda) devem ser examinadas e verificadas suas proporções relativas aos respectivos testículos. Na cabeça, verificar o volume, a sensibilidade a presença ou não de granulomas, processos inflamatórios, etc. Atenção especial deve ser dada à cauda do epidídimo, com relação ao seu delineamento, simetria e consistência. Seu volume pronunciado e sua simetria são indícios de que a produção espermática nesse animal está adequada.
- Prepúcio: devem ser observados o tamanho e a forma relativos à espécie (considerando eventuais excessos), o óstio prepucial e nele a presença de alterações, como o prolapso da mucosa prepucial.
- Pênis: deve ser verificado o deslizamento dentro do prepúcio ou a existência de alguma alteração como bifido, infantil, torções, fraturas, papilomas, etc;
- Genitália interna: as glândulas vesiculares, ampolas dos ductos deferentes, próstata e glândulas bulbouretrais, devem ser examinadas por palpação quanto aos aspectos de lobulação (vesículas), consistência e simetria, tamanho, sensibilidade, aderências e reação a estímulos de contato. Ao toque das glândulas vesiculares há exposição do pênis, enquanto que das ampolas dos ductos deferentes há retração do testículo correspondente seguida de ejaculação, após persistência de massagem.

No espermiograma devem ser observadas, e correlacionadas aos exames anteriores, as

características físicas e morfológicas do sêmen. As características físicas devem ser avaliadas logo após a coleta (por vagina artificial, eletroejaculação ou massagem das ampolas dos ductos deferentes) e fornecem indícios da qualidade do sêmen, embasados nos padrões médios da espécie. Os aspectos mais relevantes são os de turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração, os quais são avaliados mais comumente por meio da microscopia. O turbilhonamento deve ser avaliado por meio de gota de sêmen em lâmina sem lamínula sob aumento de 100 vezes a 37°C, verificando o movimento de massa na borda da gota, adotando uma escala de 0 a 5. Já a motilidade e o vigor são observados em gota sob lamínula em um aumento de 100 a 400 vezes a 37°C. A motilidade é avaliada como o percentual de espermatozóides progressivamente móveis, e o vigor dessa movimentação é avaliado numa escala de 0 a 5. A concentração espermática pode ser estimada utilizando-se a câmara de Neubauer, podendo-se utilizar a diluição de 1:200, 1:100 ou 1:50 em solução de formol-salino-tampinado. O número de espermatozóides contados na câmara é multiplicado pela constante referente à diluição utilizada, obtendo-se, assim, a estimativa da concentração espermática, expressa em milhões de espermatozóides por mL ($\times 10^6$ spz/mL).

As características morfológicas devem ser avaliadas pela a preparação úmida, que consiste na turvação de 0,5mL de formol-salino com algumas gotas de sêmen. Esta solução turvada é utilizada para a montagem em lâmina e lamínula, justapostas o suficiente para a formação de apenas uma camada de células, que podem ser avaliadas em microscopia de contraste de fase em um aumento de 1000 vezes com auxílio de óleo de imersão. Na avaliação são identificados defeitos na forma do espermatozóide, divididos em maiores (defeitos de acrossoma, gota citoplasmática proximal, “pouch formation”, pseudo-gota, defeitos de peça intermediária e cauda fortemente

enrolada ou dobrada, subdesenvolvidos, cabeça isolada patológica, delgado na base, piriforme pequeno anormal, contorno anormal e formas teratológicas) e menores (acrossoma desprendido, gota citoplasmática distal, cauda dobrada com gota presa, cauda enrolada, cabeça isolada normal, cabeça delgada, pequena normal, gigante, curta, larga e com inserções abaxial, retro-abaxial ou oblíqua).

Vale Filho (1988) adaptou um método de classificação de reprodutores taurinos, o Breeding Soundness Evaluation (BSE) para o touro zebuino, denominando-o Classificação Andrológica por Pontos (CAP) que pontua os animais de acordo com os dados do perímetro escrotal, aspectos físicos (motilidade e vigor) e morfológicos (defeitos maiores e menores) do sêmen, considerando a idade do animal, numa escala que varia de 0 a 100 pontos, sendo considerados aprovados andrologicamente os animais que atingem acima de 60 pontos, devendo ser clinicamente normais quanto aos órgãos genitais e ao sêmen. Este método oferece uma padronização na seleção de animais aptos à reprodução para uma estação de monta específica, e deverá ser repetido anualmente.

Os testes comportamentais também são importantes na seleção dos reprodutores, dentre os quais se destacam os testes de libido, definidos como a vontade e a avidez do touro à monta e ao serviço completo, e de capacidade de serviço, que é a habilidade de realizar, com sucesso, a monta. A escolha de touros com melhores classificações em ambos os testes, pode resultar num maior número de vacas cobertas logo no início da estação de monta, o que melhoraria a eficiência reprodutiva.

Assim, a estruturação de um sistema de seleção de reprodutores deve ser realizada antes do início da estação de monta, e deve-se basear nos atributos genéticos de interesse para a criação (no caso de gado de corte em

sistema extensivo o ganho de peso, qualidade de carcaça, desmama precoce), assim como nos atributos reprodutivos, como os parâmetros andrológicos e comportamentais do touro para um maior sucesso, refletindo no maior número de fêmeas gestantes nos primeiros dois meses de estação de monta.

Atualmente, além dos parâmetros descritos acima, fatores bioquímicos presentes no plasma seminal se mostram como importantes marcadores de fertilidade que podem vir a complementar a avaliação andrológica para a seleção de reprodutores visando a máxima eficiência reprodutiva

Plasma seminal

O plasma seminal é uma complexa mistura de secreções originadas no testículo, no epidídimo e nas glândulas sexuais acessórias (Manjunath et al., 1993). Serve como veículo para o espermatozóide ejaculado e contém fatores que influenciam a capacidade de fertilização do mesmo (Calvete et al., 1996).

Os espermatozóides recém produzidos na espermatogênese, ao deixarem o testículo e entrarem na porção proximal do epidídimo (cabeça), são incapazes de fertilizar um oócito em condições naturais. O gameta muda do estado não fértil para o estado fértil durante o trânsito epididimário em um processo denominado maturação espermática (Amann et al., 1993). No entanto, além dos importantes atributos adquiridos na maturação espermática, as funções espermáticas também são moduladas pelas secreções das glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2007a).

Durante a ejaculação do touro, os espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo, juntamente com o fluido daquela porção epididimária, se misturam ao fluido

das glândulas sexuais acessórias, compondo, assim o sêmen total. O plasma seminal altera as membranas espermáticas e influencia a fertilidade do espermatozóide. (Way et al., 2000).

Henault et al. (1995) verificaram que espermatozóides da cauda do epidídimo, quando incubados com o fluido das glândulas sexuais acessórias, foram mais eficientes em penetrar em oócitos livres de zona pelúcida do que aqueles espermatozóides da cauda do epidídimo que não foram incubados com aquele fluido. Os mesmos autores observaram ainda que os espermatozóides da cauda do epidídimo de touros com fertilidade acima da média, quando incubados com seus respectivos fluidos das glândulas sexuais acessórias, foram mais eficientes em penetrar oócitos livres de zona pelúcida do que os touros com fertilidade abaixo da média. Também houve melhora significativa nas taxas de penetração de espermatozóides da cauda do epidídimo de touros sub-férteis incubados com o fluido das glândulas acessórias de touros com fertilidade acima da média.

Além de modificar a fertilidade do espermatozóide da cauda do epidídimo, o plasma seminal também modifica a fertilidade do espermatozóide ejaculado. Henault e Killian (1996) verificaram que espermatozóides ejaculados de touros de alta fertilidade incubados com o plasma seminal de touros de alta fertilidade tiveram maiores taxas de penetração em oócitos livres de zona pelúcida que quando incubados com plasma seminal de touros de baixa fertilidade. Já os espermatozóides de touros de baixa fertilidade quando incubados com plasma seminal de touros de alta fertilidade aumentaram a taxa de penetração nos oócitos em relação aos incubados com plasma seminal de baixa fertilidade.

Além dos vários efeitos benéficos do plasma seminal sobre a função espermática, também são relatados alguns efeitos deletérios

daquele fluido sobre o espermatozóide. Way et al. (2000) demonstraram *in vitro* que a viabilidade dos espermatozóides epididimários diminui após a incubação com fluido das glândulas sexuais acessórias e que a capacitação induzida pela heparina nos espermatozóides epididimários foi mais rápida e se manteve por períodos mais prolongados do que nas células incubadas com as secreções das glândulas acessórias. No entanto, os autores discutem que, *in vivo*, o contato dos espermatozóides com o plasma seminal é muito breve, ocorrendo apenas no momento da ejaculação no trato genital feminino, onde é rapidamente diluído pelas secreções daquele compartimento, além de o muco cervical funcionar como barreira para o plasma seminal, permitindo somente a passagem do espermatozóide. Essas informações sugerem que alguns fatores decapacitantes poderiam prevenir contra uma capacitação precoce, longe do sítio de fecundação, o que diminuiria as chances de uma fertilização bem-sucedida.

Dentre os vários fatores presentes no plasma seminal, as proteínas ali presentes exercem variadas funções, alterando as membranas e o metabolismo dos espermatozóides e conferindo proteção contra efeitos oxidativos e imunológicos do trato genital feminino, aumentando, conseqüentemente, o potencial fertilizante dos gametas

Proteínas do plasma seminal

As proteínas do sêmen nos animais domésticos podem ser de origem testicular, epididimária ou produzidas pelas glândulas sexuais acessórias, podendo permanecer no fluido seminal ou ainda se ligarem à membrana espermática durante a ejaculação com atividades biológicas diversas relacionadas à fecundação (Salvador, 2005).

Os principais grupos de proteínas no sêmen, para a maioria das espécies, relatadas por

Mann e Mann (1981) foram as ligadas ao cálcio, ao zinco, as lactoferrinas, as transferrinas, os hormônios protéicos, as enzimas proteolíticas e lipolíticas, as nucleases, as nucleotidases, as nucleosidades, as fosfatases, as glicosidases, as sulfidril oxidases e as glicoproteínas, além de outros peptídeos, aminoácidos e bases nitrogenadas. Várias proteínas seminais já foram identificadas, descritas e associadas à fertilidade do macho em várias espécies, com estruturas e propriedades bastante variadas. Outras, no entanto com funções relacionadas à reprodução continuam ainda desconhecidas.

Killian et al. (1993), em um estudo realizado com 35 touros da raça Holandesa com histórico reprodutivo conhecido, observaram quatro proteínas relacionadas à fertilidade dos animais. Duas delas (26 kDa, pI 6,2; 55 kDa, pI 4,5) ocorriam com grande frequência e densidade em touros comprovados de alta fertilidade enquanto as outras duas (16 kDa, pI 4,1; 16 kDa, pI 6,7) foram observadas com maior frequência em touros com baixa fertilidade. Mais tarde, as proteínas de 55 e 26 kDa, relacionadas à alta fertilidade foram identificadas, respectivamente, como Osteopontina (Cancel et al., 1997) e Prostaglandina D sintetase (Gerena et al., 1998).

A proteína ácida do plasma seminal (acidic Seminal Fluid Protein - aSFP), secretada pelas glândulas vesiculares atua como fator decapacitante, preservador da integridade acrossômica e mitocondrial e reguladora da motilidade espermática (Einspanier et al., 1991).

Outros estudos têm mostrado a existência de proteínas do plasma seminal que se prendem à membrana espermática, facilitando a ligação com a heparina e outros glicosaminoglicanos que estimulam a capacitação dos espermatozóides (Salvador, 2005). Alguns estudos evidenciaram este papel regulatório das proteínas ligadoras de

heparina (Heparin-Binding Proteins – HBP) sobre a capacitação do espermatozóide bovino (Miller et al., 1990; Bellin et al., 1994; 1996). Bellin et al. (1998) registraram, dentre os grupos de HBPs, que a de 30-31 kDa tem maior importância por ser um marcador bioquímico para a fertilidade, sendo denominada “Antígeno Associado à Aertilidade” (*Fertility Associated Antigen* – FAA).

Proteínas Ligadoras ao Espermatozóide (Binder of Sperm Proteins – BSPs)

As BSPs são proteínas ácidas e de cadeia polipeptídica simples, também conhecidas como “*major proteins*”, representando aproximadamente 30% do total de proteínas do plasma seminal (Manjunath e Sairam, 1987) e 86% das proteínas do fluido das glândulas sexuais acessórias (Moura et al., 2007a) de bovinos. Atualmente são conhecidos quatro tipos de BSPs: A₁, A₂, A₃ e 30kDa. Estas proteínas são produzidas pela glândula vesicular e se ligam ao espermatozóide durante a ejaculação (Manjunath et al., 1993)

As BSP-A₁ e BSP-A₂ são normalmente encontradas como agregados em processos de separação e purificação de proteínas, sendo, muitas vezes consideradas como o complexo BSP-A₁/A₂. Possuem um peso molecular aproximado de 16,5 e 16,0 kDa, respectivamente, e composição idêntica de aminoácidos (Manjunath e Sairam, 1987), que, por sua vez, é idêntica à da proteína PDC-109 presente no plasma seminal bovino (Manjunath e Sairam, 1987; Scheit et al., 1988). São glicoproteínas que diferem apenas pela quantidade de carboidratos, tendo a BSP-A₁ maiores quantidades (3,6-6,0%) que a BSP-A₂ (1,2-2,0%; Manjunath e Sairam, 1987), o que pode explicar o maior peso molecular da primeira.

A BSP-A₃ possui uma composição de aminoácidos diferente do complexo BSP-

A₁/A₂, principalmente nos aminoácidos de caráter básico ácido glutâmico, prolina, valina, metionina, leucina e isoleucina. Também difere por não ser uma glicoproteína, o que reflete no seu menor peso molecular (15,0 kDa; Manjunath e Sairam, 1987). Sua completa seqüência de aminoácidos mostra que é composta por 115 aminoácidos e a análise de sua estrutura primária revela um elevado grau de homologia também com a PDC-109, indicando que ambas podem ser oriundas do mesmo gene ancestral (Seidah et al., 1987).

A BSP 30 kDa é a proteína mais glicosilada da família das BSPs o que pode explicar o seu maior peso molecular (28 – 30 kDa) em relação às outras. Análises do conteúdo de carboidratos da molécula mostram que a mesma possui 11 mol de galactosamina, 9 mol de galactose e 11mol de ácido siálico por mol de proteína, todos glicosilando o resíduo de treonina (Calvete et al., 1996).

As BSPs se ligam à fosfatidilcolina (PC), fosfatidilcolina plasmogênio (PC plasm) e esfingomiélin (SPM). Tais fosfolipídios correspondem à 60% do total presente na membrana espermática indicando, portanto, que tais proteínas se ligam à membrana do espermatozóide no momento da ejaculação. Souza et al. (2008) verificaram, através de ensaios de imunocitoquímica, que o complexo BSP A₁/A₂ se liga à peça intermediária e aos segmentos pós-equatorial e equatorial do acrossoma de espermatozóides ejaculados. Os autores verificaram ainda que a BSP 30kDa se liga mais intensamente na peça intermediária do que nos segmentos equatorial e pós-equatorial do acrossoma., confirmando a ligação dessas proteínas durante a ejaculação.

As BSPs participam dos eventos da capacitação espermática. Lipoproteínas de alta densidade (HDL) e glicosaminoglicanos (GAGs) são componentes comumente encontrados nos fluidos foliculares e do

oviduto e induzem a capacitação espermática. Estudos indicam que as BSPs potenciam a capacitação induzida por heparina (Thérien et al., 1995) e por HDL (Thérien et al., 1997). Espermatozóides da cauda do epidídimo expostos às BSPs seguido da incubação com heparina ou HDL mostraram maiores taxas de reação acrossômica após a adição de lisofosfatidilcolina quando comparado com o a heparina ou o HDL (Manjunath e Thérien, 2002).

Moreau e Manjunath (2000) verificaram que as BSPs, isoladamente, também foram capazes de estimular o efluxo de colesterol dos espermatozóides da cauda do epidídimo de maneira dependente da dose e do tempo de exposição. Entretanto, Desnoyer e Manjunath (1992) verificaram que as BSPs não se ligam ao colesterol, pressupondo que sua remoção seja acompanhada pela remoção de fosfolípidios como a apolipoproteína. A HDL também estimula o efluxo de colesterol da membrana espermática de maneira dose-dependente, contudo, quando associada às BSPs, tal efluxo é maior.

Com base nessas informações, Manjunath e Thérien (2002) propuseram a seguinte participação das BSPs nas modificações lipídicas da membrana do espermatozóide durante a capacitação. Durante a ejaculação, os espermatozóides da cauda do epidídimo são misturados às secreções das glândulas sexuais acessórias. Neste momento, as BSPs se ligam aos espermatozóides através de sua interação com o radical colina dos fosfolípidios de membrana e estimulam um primeiro efluxo de colesterol. Durante os próximos 10-20 minutos o espermatozóide atravessa o muco cervical, deixando para trás grande parte do plasma seminal. A ligação das BSPs juntamente com o efluxo de colesterol, pode induzir uma reorganização da membrana. Além disso, a ligação das BSPs aos fosfolípidios pode impedir a livre movimentação destes,

estabilizando a membrana. Ao prosseguir viagem pelo aparelho reprodutor feminino, os espermatozóides revestidos pelas BSPs entram em contato com a HDL, estimulando um segundo efluxo de colesterol, que pode diminuir a razão colesterol/fosfolípidios, reorganizando ou desestabilizando a membrana plasmática e disparando um sinal (ainda desconhecido) para rotas de transdução que regulariam a expressão de receptores da zona pelúcida. A adesão desses receptores à zona pelúcida iniciaria a reação acrossômica. Como as BSPs também interagem com a heparina, a ligação dessas proteínas ao espermatozóide aumenta o número de sítio de ligação do glicosaminoglicano na superfície do espermatozóide. Assim, a heparina se liga a estes sítios e induz a capacitação.

Como o plasma seminal é uma mistura complexa de fluidos oriundos de diferentes porções do trato reprodutivo masculino, pesquisas sobre caracterização, identificação e função de suas proteínas são igualmente complexas. Para realizar estudos sobre esse assunto com maior precisão, métodos eficazes de separação de proteínas são indispensáveis e, dentre eles, cita-se a cromatografia líquida.

Cromatografia Líquida de Proteínas

A cromatografia é um método físico-químico de separação de moléculas baseado na distribuição diferenciada de solutos entre uma fase móvel e uma fase estacionária (Niessen, 2006). Na cromatografia líquida a fase móvel é o líquido (eluente) que percorre a coluna cromatográfica, e a fase estacionária é a resina que preenche a coluna e está suspensa no meio líquido (Silva Júnior, 2004). Pode ser subdividida segundo a velocidade em que o eluente passa pela coluna em cromatografia clássica, cromatografia acelerada e cromatografia

supercrítica (Degani et al., 1998; Niessen, 2006).

Na cromatografia clássica a velocidade em que o eluente passa pela coluna cromatográfica é dependente da gravidade, sendo, portanto, um processo lento. Velocidades da ordem de 10 a 40 cm/h são comuns nesse tipo de cromatografia. As partículas da fase estacionária são grandes, apresentando dezenas de micrômetros, sendo, portanto, necessárias colunas com alturas significativas para se obter resoluções cromatográficas razoavelmente satisfatórias (Silva Júnior, 2004).

No processo acelerado, ou de alta eficiência, são utilizadas fases estacionárias com partículas menores (5 – 15 μ m), mais uniformes e resistentes, sendo necessário o emprego de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel a velocidades em torno de 50 a 300 cm/h. Os dois métodos mais conhecidos e empregados de cromatografia dentro desta classificação são as de desempenho rápido (Fast Performance Liquid Chromatography – FPLC) e de alto desempenho (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). A diferença entre estes dois métodos é a velocidade em que a fase móvel é bombeada pela coluna, sendo necessárias, na HPLC, colunas preparadas em estruturas metálicas para suportar a pressão da fase móvel (Degani et al. 1998; Silva Júnior, 2004).

A cromatografia supercrítica é o método mais moderno de cromatografia. A resolução independe da velocidade em que o eluente passa pela coluna. Velocidades na ordem de 300 a 4000 cm/h podem ser empregadas em colunas de dimensões reduzidas. A melhora na confecção das partículas da resina permitiu esse avanço tecnológico, desde que as mesmas, de dimensões de alguns micrômetros, apresentassem poros de 400 a 800nm, não oferecendo resistência à passagem do

eluente (Degani et al. 1998; Silva Júnior, 2004).

Independentemente do método cromatográfico utilizado, a cromatografia ainda pode ser dividida com base na característica físico-química das moléculas que se tenha interesse em separar. São elas; cromatografia de exclusão molecular (CEM) ou gel-filtração; cromatografia de afinidade (CAf); cromatografia de troca iônica (CTI); cromatografia de interação hidrofóbica (CIH); cromatografia de fase reversa (CFR) (Welling e Welling-Wester, 1989). No presente estudos foram utilizadas as cromatografias de exclusão molecular e de afinidade por heparina.

Cromatografia líquida de exclusão molecular (CEM)

A separação por este tipo de cromatografia depende da diferença no tamanho, mais precisamente, do volume hidrodinâmico das proteínas em uma amostra. As moléculas maiores não entram nos poros das partículas da coluna e são eluídas (excluídas da coluna) no volume localizado fora das partículas (*void* – V_o). Já as moléculas menores penetram diferencialmente nos poros (volume dentro da partícula: V_i) da resina da coluna, percorrendo o trajeto mais demorado até sua eluição. O volume total acessível (V_t) é o somatório dos volumes fora (V_o) e dentro (V_i) da partícula (Welling e Welling-Wester, 1989; Silva Júnior, 2004).

As proteínas são eluídas de forma isocrática na CEM, ou seja, não há a necessidade do uso de mais do que uma fase móvel durante a separação (Gel..., 2007). Em uma CEM ideal, há uma relação linear entre o logaritmo do peso molecular (PM) e o volume de eluição (V_e) de uma proteína. Portanto, este tipo de cromatografia permite não só a purificação de uma determinada proteína, como também a determinação de

seu peso molecular. Curvas de calibração fornecem informações sobre a faixa de pesos moleculares que pode ser coberta pela coluna. Assim, quanto menor a inclinação da curva de calibração, melhor será a separação entre proteínas de diferentes pesos moleculares (Welling e Welling-Wester, 1989).

Cromatografia líquida de afinidade (CAf)

A separação de proteínas por cromatografia de afinidade baseia-se na interação específica (afinidade) e reversiva entre ligantes imobilizados na coluna e sua proteína alvo. Essa afinidade resulta de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, forças de van der Waals e/ou pontes de hidrogênio (Affinity..., 2007; Azarkan et al., 2007).

Diferentemente da cromatografia de exclusão molecular, a CAf é um procedimento que envolve a separação de proteínas de forma não isocrática, isto é, são necessários dois tipos diferentes de fase móvel. A primeira delas (solução A) deve fornecer o ambiente ideal para a ligação das proteínas alvo aos ligantes específicos da coluna e ainda a eluição das proteínas sem afinidade àquele ligante. A segunda fase móvel (solução B) deve alterar o ambiente anterior promovido pela solução A. Tais modificações podem ser mudanças no pH, na força iônica ou na polaridade do meio, ou poderá, ainda, promover a competição com alguma substância pelo sítios de ligação da coluna. Essas alterações no meio de eluição desfazem a ligação entre as proteínas com afinidade e os ligantes da coluna e, conseqüentemente, permite a sua eluição (Clonis, 1989; Silva Júnior, 2004).

A purificação por afinidade pode, em um único procedimento, oferecer uma grande economia de tempo em relação a outros métodos menos seletivos. As moléculas alvo podem ser purificadas de misturas biológicas

complexas, como os plasmas sanguíneo e seminal e extratos celulares. Formas nativas podem ser separadas de formas desnaturadas de uma mesma substância e pequenas quantidades de material biológico podem ser purificadas de um meio contendo várias substâncias contaminantes (Affinity..., 2007).

Atualmente, a cromatografia de afinidade pode ser realizada com base nas interações entre a molécula alvo e um grande número de ligantes possíveis. São eles, imunoglobulinas, grupamentos fosfatos, fatores de coagulação, carboidratos, calmodulinas, grupamentos tiol e dissulfetos, dentre vários outros. A escolha do ligante específico para uma purificação eficiente dependerá das propriedades da molécula alvo de interesse (Affinity..., 2007, Azarkan et al., 2007).

Estratégias de purificação envolvendo mais de uma cromatografia também são comuns quando se visa estudar uma determinada proteína. Por exemplo, Salvador (2005) e Folhadella (2008) verificaram associações entre a proteína denominada Antígeno Associado à Fertilidade (Fertility Associated Antigen – FAA) e a reação acrossômica induzida por heparina e a fertilidade *in vitro* de espermatozoides de touros Nelore e Girleiteiro, respectivamente. Tal proteína possui afinidade por heparina e um peso molecular de 31 kDa (Bellin, et al., 1998; McCauley, et al, 1999), e, com base nessas informações, aqueles autores utilizaram a CEM para separar as proteínas segundo o seu peso molecular e, em seguida, utilizaram as frações correspondentes a faixa que continha as proteínas de 30 kDa para uma CAf, visando eliminar as proteínas sem afinidade àquele glicosaminoglicano dentro da mesma faixa de peso molecular. Dessa forma aqueles autores puderam purificar e quantificar a proteína de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCGIL. O Gir Leiteiro hoje. Disponível em: <http://www.girleiteiro.org.br/desempenho.asp>. Acesso em: 18/08/2007.
- ACOTT, T.S.; HOSKINS, D.D. Bovine sperm forward motility protein: partial purification and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v.253, n.19, p.6744-6750, 1978.
- AFFINITY Chromatography: principles and methods. GE Healthcare, Uppsala, Suécia, 2007, 156p.
- AMANN, R.P., SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v.57, p.380-403, 1983.
- AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.361-381, 1993.
- ANDRADE, V.J.; DIAS, J.C., SALVADOR, D.F. et al. Andrological characteristics of young (15-27 months old) Guzarat (*Bos taurus indicus*) bulls, raised on pasture in Minas Gerais, Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2004, v. 1, p.174.
- ASBIA, Relatório estatístico de produção, importação, e comercialização de sêmen. Disponível em <http://www.asbia.org.br/download/mercado/relatorio2008.pdf>. Acesso em 21/01/2010.
- ASHDOWN, R.R.; HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução masculina. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6ed. São Paulo – SP: Editora Manole Ltda, 1995. p.3-20.
- AZARKAN, M.; HUET, J.; BAEYENS-VOLNAT, D. et al. Affinity chromatography: a useful tool in proteomics studies. **Journal of Chromatography B**, v.849, p.81-90, 2007.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BELLIN, M.E. HAWKINS, H.E.; AX, R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of Heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2441-8, 1994.
- BELLIN, M.E.; HAWKINS, H.E.; OYARZO, J.N. et al. Monoclonal antibody detection of heparin binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, V.74, p. 173-182, 1996.
- BELLIN, M.E., OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2032-2039, 1998.
- BERGMANN, J.A.G., QUIRINO, C.R., VALE FILHO, V.R., ANDRADE, V.J., PEREIRA, J.C.C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 6, 1998.
- BRITO, L.F.C. et al. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.62, p.1198-1217, 2004.
- BRUNER, K.A.; McCRAW, R.L.; WHITACRE, M.D.; VAN CAMP, S.D. Breeding soundness examination of 1952 yearling beef bulls in North Carolina. **Theriogenology**, v. 44, p. 129-145, 1995.
- CALVETE, J.J.; MANN, K.; SANZ, L. et al. The Primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Letters**, v.399, p.147-152, 1996.
- CANCEL, A. M., CHAPMAN, D. A., KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-

- Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1293-1301 1997.
- CBRA 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2ed.. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.:il.
- CLONIS, Y.D. High-performance affinity chromatography (HPAC). In: OLIVER, R.W.A. **HPLC of macromolecules: a practical approach**. 1ed. Oxford, Inglaterra, 1989. p.157-182.
- CORNWALL, G.A.; VON HORSTEN, H.H. Sperm maturation in epididymis. In: CARREL, D.T. **The Genetics of Male Infertility**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. 211-231.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, p.21-25, Maio, 1998
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p.10149-10155, 1992.
- DIAS, J.C.; SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J et al. Congelabilidade do sêmen de tourinhos da raça Guzerá de dois anos de idade, previamente selecionados pela Classificação Andrológica por Pontos (CAP). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2003, p.189-190.
- EINSPANIER, R., EINSPANIER, A., WEMPE, F. et al. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal plasma. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.179, n.2, p.1006-1010, 1991.
- FOLHADELLA, I.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. 2008. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FOOTE, R.I. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 119-139, 2003.
- FORDYCE, G.; FITZPATRICK, L.A.; COOPER, N.J.; et al. Bull selection and use in Northern Australia 5. Social behavior and management. **Animal Reproduction Science**. v. 71, p. 81-99, 2002.
- GERENA, L. R., IRIKURA, D., URADE, Y. et al. Identification of a fertility-associated protein in Bull seminal plasma as lipocain-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.
- GEL filtration: principles and methods. GE Healthcare, Uppsala, Suécia, 2007, 121p.
- GUIMARÃES, J.D.; FRENEAU, G.E.; VALE FILHO, V.R. et al. Puberdade e relação das características dos túbulos seminíferos, com crescimento e idade, em tourinhos Gir. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1993. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1993, v.2, p.355.
- HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J.; KAVANAUGH et al. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.52, p.390-397, 1995.
- HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.199-204, 1996.
- JIMÉNEZ-SEVERIANO, H. Sexual development of dairy bulls in the Mexican

- tropics. **Theriogenology**, v.58, p.921-032, 2002.
- JOHNSON, W.H. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n.2, p.255-270, 1997
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In: JUNQUEIRA, L.C. **Histologia Básica**. 9ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 1999. p.355-366.
- KENNEDY, S.P, SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M et al. Breeding soundness evaluation of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. **Theriogenology**, v. 58, p. 947-961, 2002.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated antigen proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- 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. **Journal of Animal Science**, v.46, p.1054-1062, 1978.
- 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. **Biochemistry Journal**, v.241, p.685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E. et al. Major proteins of bovine seminal vesicle bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.49, p.27-37, 1993.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.109-119, 2002.
- MANN, T., MANN, C.L. Male Reproductive Function and Semen. New York. Ed: Springer-Verlag, 1981.
- MCCAULEY, T.C.; ZHANG, H.; BELLIN, M.E. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, p.145-153, 1999.
- MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparina binding proteins from seminal plasma bind to spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v.42, p.899-915, 1990.
- MOLINA, R., BOLAÑOS, I., GALINA, C.S et al. Sexual behavior of zebu bulls in the humid tropics of Costa Rica: simple versus multiple-sire groups. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 139-148, 2000.
- MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1487, p.24-32, 2000.
- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H. et al. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. **Journal of Andrology**, v.27, n.4, p.534-541, 2006a.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A. et al. Identification of proteins in accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **American Society of Andrology**, v.27, v.2, p.201-211, 2006b.
- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KOC, H. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.169-188, 2007a.
- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-

- penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and development**, v.74, p.214-222, 2007b.
- NIESSEN, W.M.A. Liquid chromatography – mass spectrometry. 3ed. Boca Raton – Flórida – USA, CRC Press, 2006.
- OLIVEIRA, P.C.; BARROS, J.B.G.; CARDOSO, C.A.D et al. Avaliação da biometria testicular e qualidade seminal em touros jovens Canchim, Limosin e Pardo Suíço. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.2, p. 61-63, 2002.
- PIMENTEL, C.A., FERREIRA, J.M.M., MORAES, J.C.F. et al. Desenvolvimento testicular e corporal em touros de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.8, n.1, p. 27-33, 1984
- RAWLINGS, N.; EVANS, A.C.O.; CHANDOLIA, R.K. et al. Sexual maturation in te bull. **Reproduction of Domestic Animals**, v.46, p.295-301, 2008.
- SALVADOR, D.F. **Perfis cromatográficos e eletroforéticos de proteínas com afinidade a heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelação do sêmen e reação acrossômica induzida**. 2005. 56p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SCHEIT, K.H.; KEMME, M.; AUMÜLLER, G. et al. The major protein of bull seminal plasma: biosynthesis and biological function. **Bioscience Reports**, v.8, n.6, p.589-608, 1988.
- SEIDAH, N.G.; MANJUNATH, P.; ROCHEMONT, J. et al. Complete aminoacid sequence of BSP-A₃ from bovine seminal plasma: homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. **Biochemistry Journal**, v.243 p.195-203, 1987.
- SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ed. Ephrata, Pennsylvania: Cadmus Professional Communications Science Press Division, 2003. 368p.
- SILVA JÚNIOR, J.G. **Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro – RJ, Editora Interciência Ltda, 2004.113f.
- SOUZA, C.E.; MOURA, A.A.; MONACO, E. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A₁/A₂, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.72-89, 2008
- THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidilcoline-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1372-1379, 1995.
- THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1080-1088, 1997.
- TORRES-JÚNIOR; J.R.S.; HENRY, M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction.**, v.2, n.2, p.114-121, 2005.
- VALE FILHO, V.R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7, v.1 1988, Belo Horizonte. **Anais...**Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.1, 1988, p.418-438.
- VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil: análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, 1989, Belo Horizonte. **Palestras...** Belo Horizonte:

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. p.94-118.

VALE FILHO, V.R. Seleção de touros e matrizes, em estação de monta, para alta eficiência reprodutiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 1, 1994, Uberaba: Associação Brasileira dos Criadores de Zebu, 1994, p.11-20.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 12, 1997, Caxambu. **Curso de Andrologia e Tecnologia de Sêmen em Bovinos**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1997.

VALE FILHO, V.R. Subfertilidade em touros jovens e erados: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo nº35, 2001, p.81-87.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; SALVADOR, D.F et al. Prevalência de tourinhos da raça Tabapuã precoces e super-precoces (um e dois anos de idade), com base no perfil andrológico, submetidos a dois manejos nutricionais, na região de Nanuque, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, 2003. Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2003, p.178-180.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; SALVADOR, D.F. et al. Andrological profile and libido of early mature young (one year old) Nelore (*Bos taurus indicus*) bulls raised under two types of pastures. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Porto Seguro. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2004, v. 1, p.176.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L.S. **Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998. 80p

WAY, A.L.; GRIEL JR, L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation and the acrosome reaction of cauda epididimal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.21, n.2, p.213-219, 2000.

WELLING, G.W.; WELLING-WESTER, S. Size-exclusion HPLC of proteins. In: OLIVER, R.W.A. **HPLC of macromolecules: a practical approach**. 1ed. Oxford, Inglaterra, 1989. p.77-89.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E.B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v.24, p. 761-765, 1965.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE TOURINHOS GIR SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE LEITE

RESUMO

O presente estudo visou identificar tourinhos Gir-leiteiro precoces (PREC) e não-precoces (NPREC) segundo a idade à puberdade e avaliar diferenças ocorridas durante seu desenvolvimento reprodutivo. Mensurações de peso vivo (PV) e de perímetro escrotal (PE) foram realizadas mensalmente, junto com a coleta e a avaliação física do sêmen (motilidade (MOT); vigor (VIG)), concentração (CONC) e morfologia espermática (defeitos maiores (DM); defeitos menores (Dm); defeitos totais (DT) e espermatozoides normais (NORM)) em 16 animais dos 13 aos 23 meses de idade. A puberdade foi definida como o momento em que os animais apresentaram pela primeira vez um ejaculado contendo 50 milhões de espermatozoides, com no mínimo 10% de motilidade. Os animais foram classificados como precoces e não-precoces segundo a distribuição de frequência das idades à puberdade, adotando como critério de separação dos grupos a sua mediana. Todos os parâmetros estudados foram comparados entre os grupos e entre as diversas idades estudadas. Modelos de regressão linear e quadrático do PV, PE, CONC e DM em relação à idade e à idade em relação à puberdade foram ajustados. Os animais precoces apresentaram menores idades à puberdade e à maturidade sexual ($17,0 \pm 1,0$ e $18,7 \pm 1,0$ meses, respectivamente) em relação aos não-precoces ($19,2 \pm 1,1$ e $20,5 \pm 1,0$ meses, respectivamente). Animais precoces foram mais leves que os não-precoces na pré-puberdade o que não foi observado da puberdade até os 60 dias depois da puberdade. A MOT mostrou o aumento mais pronunciado antes da puberdade em ambos os grupos, no entanto, este foi observado dois meses mais cedo nos animais precoces. Registrou-se aumento da CONC mais cedo em animais precoces e que foi maior ($p < 0,05$) do que os animais não-precoces aos 23 meses de idade. Diferenças no desenvolvimento reprodutivo de animais precoces e não-precoces puderam ser observadas, indicando que a seleção de tourinhos, para a maturidade sexual precoce é indicada para a melhoria da eficiência reprodutiva de touros Gir.

Palavras-chave: motilidade espermática, perímetro escrotal, zebu.

REPRODUCTIVE DEVELOPMENT OF GYR YOUNG BULLS SELECTED FOR MILK PRODUCTION

ABSTRACT

The present study was conducted to identify precocious (PREC) and non-precocious (NPREC) dairy Gyr bulls and evaluate differences during their reproductive development. Live weight (LW) and scrotal circumference (SC) were measured monthly and semen samples were collected and evaluated for sperm motility (MOT), vigor (VIG), concentration (CONC) and morphology (major defect (MD); minor defect (mD); total defect (TD) and normal sperm (NORM)) in 16 animals from 13 to 23 months of age. Puberty was defined as the age which animals show at least 50 million sperm, with minimum of 10% of motility. Animals were grouped as precocious and non-precocious according to frequency distribution of their age at puberty, having the median as the point of definition of the groups. Differences between groups and across ages were tested for all studied traits. Linear and quadratic regression of LW, SC, CONC and MD on age and age in relation to puberty were adjusted. Age at puberty was different ($p < 0.05$) between PREC (17.0 ± 1.0 months) and NPREC (19.2 ± 1.1 months) groups. PREC animals were also lighter before puberty than NPREC animals. Sperm motility increased before puberty in both groups. However this event occurred two months earlier in PREC animals. Sperm concentration increased earlier in PREC animals and was also higher ($p < 0.05$) than in NPREC animals at 23 months of age. Differences on PREC and NPREC reproductive development were observed, suggesting that selection of young bulls for precocious sexual maturity is possible and indicated for improvement of reproductive efficiency.

Keywords: scrotal circumference, sperm motility zebu.

INTRODUÇÃO

As raças bovinas zebuínas são conhecidas por sua expressiva produtividade em climas tropicais com forragem de baixa qualidade, além de sua rusticidade. Apesar dessas qualidades, os zebuínos também são conhecidos por terem desenvolvimento sexual mais tardio comparado aos animais de raças européias (Nogueira, 2004).

A seleção de touros para a precocidade sexual deve ser um objetivo de produtores e pesquisadores, pois permitirá a introdução precoce de animais no manejo reprodutivo, aumentando a vida útil dos mesmos e reduzindo intervalo de gerações (Andréa et al., 2000). A seleção de reprodutores com base nessa característica também é vantajosa pelo fato das fêmeas filhas de touros precoces apresentarem menor idade ao primeiro parto (Ferraz e Eler, 2007), em decorrência da elevada herdabilidade desta característica (Eler et al., 2002; Eler et al., 2004).

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar tourinhos precoces e não-precoces, e avaliar as diferenças no seu desenvolvimento reprodutivo até a maturidade sexual.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as técnicas e procedimentos utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA – UFMG, protocolo nº 55/2008).

Trinta tourinhos Gir-leiteiro clinicamente normais oriundos de cinco propriedades no estado de Minas Gerais foram acompanhados clínica e andrologicamente por um período de nove meses (abril a dezembro de 2007). Todos os animais, que

são de linhagens com alta pressão de seleção para a produção de leite das matrizes, foram transportados para a Fazenda Experimental Getúlio Vargas da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Uberaba (19°45'56" de latitude sul, 47°57' de longitude oeste e 774m de altitude), onde foram submetidos a um período de adaptação de trinta dias antes do início do experimento. O clima do município é caracterizado como tropical semi-úmido, com temperatura média de 21,4°C, precipitação anual média de 1684,6mm e a umidade relativa do ar média de 71,4% (Estação Climatológica Principal de Uberaba – EPAMIG/INMET (2006).

Os animais foram mantidos em confinamento individual, e alimentados com dieta contendo 20% de proteína bruta (PB), 70% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e 1,105Mcal/kg de energia líquida, à base de 1% do peso vivo, durante todo o período experimental e silagem de milho como volumoso, além de sal mineral e água *ad libitum*.

Avaliaram-se mensalmente o peso vivo (PV), o perímetro escrotal (PE), e foram realizadas as coletas de sêmen.

O PV foi obtido individualmente por meio de balança e o PE foi mensurado com fita milimétrica no seu local de maior largura, envolvendo as duas gônadas.

As amostras de sêmen foram obtidas por meio de eletro-ejaculação, sendo coletadas em tubos cônicos graduados para a aferição do volume do ejaculado (VE). No momento da coleta, uma gota do sêmen foi posicionada em lâmina sob lamínula para a avaliação da motilidade total (MOT: % de espermatozoides móveis) e do vigor espermático (VIG: 1-5) em microscopia ótica (10-40x). Uma alíquota de 20µl da amostra de sêmen foi diluída em 1000µl de solução de formol-salino para a posterior determinação da concentração espermática (CONC: $\times 10^6$ espermatozoides/mL) em

câmara de Neubauer. Outra alíquota de sêmen foi utilizada para turvar um volume de 500µl de formol-salino para a avaliação da morfologia espermática (percentual de defeitos espermáticos maiores (DM), menores (Dm) e totais (DT) e de espermatozóides normais (NORM)) (CBRA, 1998) em preparação úmida para microscopia de contraste de fases (Barth e Oko, 1989).

Todos os dados utilizados no presente estudo foram ajustados de acordo com a idade à puberdade, segundo a metodologia descrita por Brito et al (2004). A puberdade em machos bovinos é definida como a idade em que o animal apresenta um ejaculado com no mínimo 50 milhões de espermatozóides totais com no mínimo 10% de motilidade (Wolf et al., 1965). Com base nesta definição, a idade em que os animais iniciaram a puberdade foi denominada momento 0 (zero dias em relação à puberdade) e foi adotado o máximo de observações existentes antes e após tal período, para verificar o desenvolvimento das características avaliadas. Assim, observou-se que 12 animais entraram na puberdade antes do início do experimento, portanto não tinham observações pré-puberdade, e dois ainda não tinham atingido a puberdade no final do período experimental, de modo que, dos 30 animais avaliados, apenas 16 continham informações completas 60 dias antes e 60 dias após o momento 0. Sob esta estrutura de ajuste dos dados, todas as variáveis foram comparadas entre os grupos de animais (precoces e não precoces) nos respectivos momentos em relação à puberdade (-60, -30, 0, +30 e +60 dias).

Após o ajuste dos dados de acordo com a idade em relação à puberdade (dias), no momento 0 foi realizada uma distribuição de frequência das idades dos 16 animais estudados por meio do procedimento FREQ do SAS (SAS, 2002). Adotou-se como ponto de separação dos grupos a mediana (18

meses) das idades naquele período. Assim, animais com idades à puberdade menores do que a da mediana foram considerados precoces (PREC) e aqueles com idades superiores à mediana, foram considerados não-precoces (NPREC).

A definição de animais não-precoces foi mais apropriada que animais tardios, uma vez que todos os 16 animais estudados, mesmo aqueles que atingiram a puberdade com idades maiores do que a mediana naquele período, atingiram a maturidade sexual (no mínimo 70% de espermatozóides normais com menos de 15% de defeitos espermáticos maiores: Hopkins et al., 1997) até 24 meses, idade normalmente observada para raça.

Todas as variáveis estudadas foram submetidas aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e de Assimetria e Curtose, por meio do procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do SAS (SAS, 2002). As variáveis VE e CONC foram transformadas logaritmicamente ($\log(X + 1)$), e as variáveis DM, Dm, DT e NORM foram submetidas à transformação angular ($\arcsin\left(\sqrt{\frac{X}{100}}\right)$) para a aproximação da distribuição normal. As variáveis MOT e VIG, por serem escores subjetivos de avaliação, foram consideradas variáveis não-paramétricas (Sampaio, 2002).

As comparações das médias de idade, PV e PE, na puberdade e na maturidade sexual entre os grupos PREC e NPREC, foram realizadas pelos testes de Fisher (variáveis paramétricas) e pelo teste de Mann-Whitney (variáveis não-paramétricas).

O delineamento experimental adotado para análise das variáveis foi em blocos ao acaso em esquema de subparcelas com 8 repetições. Os grupos constituíram as parcelas e as idades em que os animais foram avaliados, as subparcelas. As análises

foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (Littell, et al., 1998). O efeito de grupo foi obtido pelo teste F e os efeitos de idade foram estimados por meio de ajustamento de modelos de regressão linear e quadrática. As comparações entre as idades dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste SNK por meio do procedimento GLM do SAS. As variáveis MOT e VIG foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Friedman (Sampaio, 2002). Inicialmente foi realizado o ordenamento das observações por meio do PROC RANK do SAS (Ipe, 1987) e, em seguida, a análise dos ordenamentos pelo PROC MIXED.

Os modelos de regressão linear e quadrática das variáveis avaliadas em relação à idade e à idade à puberdade foram ajustados por meio do PROC REG do SAS. Para os casos em que a interação entre grupo e idade foi significativa, ajustou-se um modelo de regressão para cada grupo. As correlações entre as variáveis paramétricas foram

estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson por meio do PROC CORR e as associações entre as variáveis paramétricas e não-paramétricas pelo coeficiente de correlação de Spearman por meio do PROC CORR com a opção SPEARMAN do SAS (SAS, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferenças entre grupos ($p > 0,05$) para os parâmetros estudados, exceto para as idades à puberdade e à maturidade sexual ($p < 0,01$) (tabela 1), indicando que os animais precoces na puberdade, também o são na maturidade sexual. Em média, os animais precoces atingiram a puberdade dois meses mais cedo do que os não precoces. Houve também diferenças entre as idades para os parâmetros analisados, demonstrando que ambos os grupos apresentaram incremento nos valores das diversas variáveis da puberdade à maturidade sexual.

Tabela 1: Médias e respectivos desvios padrão da idade, peso vivo (PV) e perímetro escrotal (PE) na puberdade ($\geq 50 \times 10^6$ espermatozóides e $\geq 10\%$ de motilidade espermática) e na maturidade sexual ($\geq 70\%$ de espermatozóides normais e $<15\%$ de DM) em tourinhos girleiteiro precoces e não-precoces

	Precoces (n=8)	Não Precoces (n=8)
Puberdade		
Idade (meses)	17,0 \pm 1,0 ^b	19,2 \pm 1,1 ^a
PV (kg)	315,2 \pm 33,9	346,0 \pm 30,4
PE (cm)	27,9 \pm 39,0	26,2 \pm 1,5
VE (mL)	4,0 \pm 1,0	6,6 \pm 3,8
CONC ($\times 10^6$ /mL)	60,9 \pm 76,4	100,5 \pm 67,8
MOT (%) *	16,9 \pm 15,8	27,6 \pm 19,1
Vigor (1-5) *	2,6 \pm 0,9	2,5 \pm 1,3
DM (%)	67,1 \pm 18,9	43,9 \pm 25,8
Dm (%)	10,7 \pm 11,5	13,7 \pm 9,0
Normais (%)	22,1 \pm 19,2	42,4 \pm 21,5
Maturidade sexual		
Idade (meses)	18,7 \pm 1,0 ^b	20,5 \pm 1,3 ^a
PV (kg)	366,4 \pm 29,6	380,6 \pm 28,7
PE (cm)	30,5 \pm 3,3	30,4 \pm 2,0
VE (mL)	5,3 \pm 1,8	5,0 \pm 1,6
CONC ($\times 10^6$ /mL)	113,2 \pm 139	79,6 \pm 55,3
MOT (%)	37,8 \pm 24,3	40,7 \pm 23,0
Vigor (1-5)	2,6 \pm 1,3	3,6 \pm 1,5
DM (%)	10,3 \pm 4,6	11,3 \pm 3,6
Dm (%)	9,0 \pm 6,6	10,0 \pm 5,0
Normais (%)	80,7 \pm 9,0	78,7 \pm 6,1

Médias seguidas de letras distintas nas linhas diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$).

PV – peso vivo; PE – perímetro escrotal; VE – volume do ejaculado; CONC – concentração espermática; MOT – motilidade espermática; DM – defeitos espermáticos maiores; Dm – defeitos espermáticos menores.

No geral, as idades à puberdade e à maturidade sexual médias dos 16 animais foram menores do que as descritas por Brito et al. (2004), ao registrarem idades médias de 20 e 23,8 meses, para puberdade e maturidade, respectivamente. A diferença entre os dois estudos pode ser explicada pelas diferenças de manejo alimentar adotado nos experimentos. No presente experimento, os animais foram criados em sistema intensivo, alimentados com dieta (1% PV) de elevado conteúdo protéico, além de silagem de milho como volumoso. Já os touros Nelore descritos por Brito et al. (2004) foram manejados extensivamente do nascimento até o final do experimento, em

pasto de *Brachiaria brizantha*, apenas com suplementação mineral *ad libitum*.

Barth et al. (2008) avaliaram o efeito de três planos nutricionais distintos (baixo, médio e alto conteúdo 0%, 6,6% e 37% de concentrado, respectivamente), na pré e na pós-desmama, sobre o desenvolvimento sexual de touros Angus e Angus x Charolês, e verificaram que os animais suplementados com alto plano nutricional atingiram a idade à puberdade mais cedo, tanto na pré- (9,9 meses) como na pós-desmama (9,7 meses), do que os animais suplementados com os planos médios (pré-desmama: 10,9 meses; pós-desmama: 10,1 meses) e baixos (pré-

desmama: 10 meses; pós-desmama: 10,9 meses). Assim, apesar dos animais deste último estudo serem de subespécies distintas das do presente estudo e daquele de Brito et al (2004), verifica-se a influência do plano alimentar sobre a idade à puberdade em bovinos.

Observou-se efeito significativo ($p < 0,01$) de idade sobre o peso vivo (figura 1A). O PV médio aumentou de 196,7 a 428,5 kg no grupo PREC e de 203,7 a 370,7 kg no grupo NPREC, dos 13 aos 23 meses de idade. Em ambos os grupos pôde-se verificar que o período de maior ganho de peso foi observado entre 15 e 21 meses de idade.

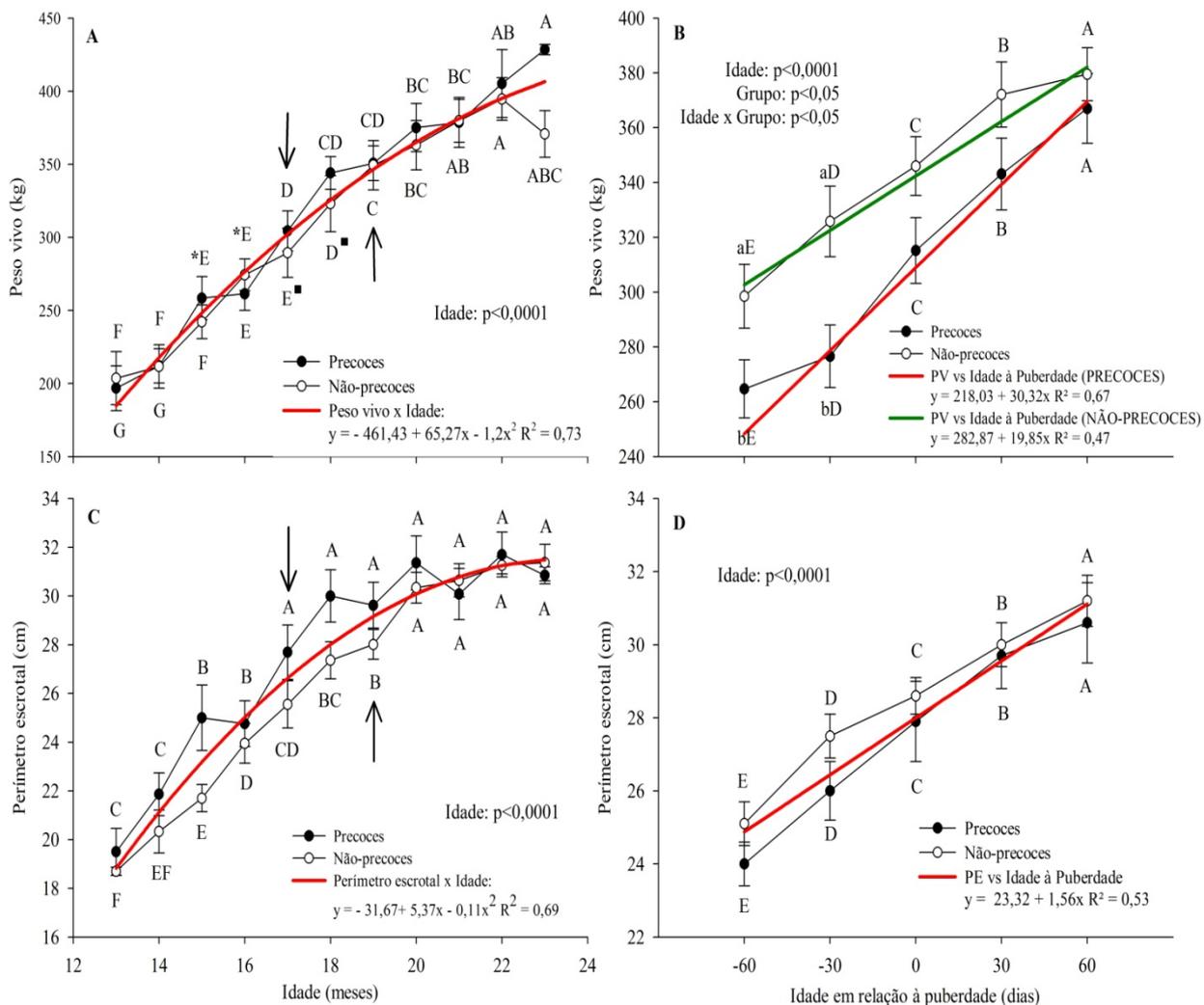


Figura 1: Médias (\pm erros padrão) do peso vivo (PV) e do perímetro escrotal (PE) segundo a idade (figuras A e C) e a idade em relação à puberdade (figuras B e D) em touros Gir precoces e não-precoces. Setas indicam idade média à puberdade (≥ 50 milhões de espermatozoides e $\geq 10\%$ de motilidade espermática): ↓ precoces ↑ não-precoces. As linhas vermelhas em A e C representam o ajuste do modelo de regressão quadrática para os parâmetros em relação à idade, e em D em relação à idade à puberdade. Na figura B as linhas vermelha e verde representam o ajuste do modelo de regressão linear do PV em função da idade à puberdade para animais precoces e não-precoces, respectivamente. Médias sobrescritas com letras minúsculas distintas diferem entre grupo dentro da idade pelo teste de Fisher (F) ($p < 0,05$). Médias sobrescritas com letras maiúsculas distintas diferem entre as idades dentro de cada grupo pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Não houve efeito de grupo e da interação grupo x idade sobre o PV, demonstrando que o desenvolvimento segundo a idade foi exatamente o mesmo para animais precoces e não-precoces. No entanto, quando se avaliou a mesma característica segundo a idade em relação à puberdade, verificou-se tanto o efeito de idade, como o de grupo, bem como a interação entre grupo e idade (figura 1B). Os animais precoces foram mais leves aos 60 e aos 30 dias antes da puberdade, no entanto, a partir do momento zero até 60 dias após a puberdade, o incremento no peso vivo dos animais de ambos os grupos foi semelhante. Este resultado sugere que os animais NPREC apresentaram maior desenvolvimento corporal no período pré-puberal para iniciar a puberdade.

O peso vivo apresentou padrão de desenvolvimento quadrático em função da idade (linha vermelha na figura 1A: $y = -461,43 + 65,27x - 1,2x^2$, $R^2 = 0,73$) para os 16 animais. O padrão difere do descrito por Torres-Júnior e Henry (2005) que encontraram um crescimento linear do peso em função da idade, dos 7,5 aos 30,7 meses de idade em touros Guzerá.

Contudo, quando se avaliou o PV em função da idade à puberdade verificou-se efeito linear dos 60 dias antes aos 60 dias depois da puberdade. Como o efeito da interação entre grupo e idade foi significativo, um modelo de regressão linear foi ajustado para cada grupo. Os animais precoces, apesar de serem mais leves na pré-puberdade, apresentaram ganho de peso médio mensal maior em relação aos animais não-precoces, demonstrado pelos coeficientes angular da regressão (o valor de “b” no modelo $y = a + bx$) dos seus respectivos modelos. Os animais precoces (linha vermelha na figura 1B) apresentaram ganho de peso representado pelo modelo $y = 218,03 + 30,32x$ indicando que esses animais obtiveram ganho médio mensal de

30,32kg. Já os animais não-precoces (linha verde na figura 1B) obtiveram ganho de peso representado pelo modelo $y = 282,87 + 19,85x$ indicando que esses animais obtiveram ganho médio mensal de apenas 19,85kg. Tais resultados explicam a inclinação mais acentuada do modelo que representa o ganho de peso dos animais precoces, alcançando pesos semelhantes aos animais não-precoces a partir da puberdade.

O perímetro escrotal variou de 19,5 a 30,8 cm e de 18,7 a 31,4 cm, dos 13 aos 23 meses de idade para animais precoces e não-precoces, respectivamente. Apenas houve efeito significativo da idade (figura 1C) e da idade à puberdade (figura 1D) sobre o PE. O desenvolvimento dessa característica foi semelhante para os dois grupos, contudo os animais precoces atingiram tamanho testicular condizente tanto com a puberdade quanto com a maturidade sexual dois meses mais cedo que os animais não precoces (setas na figura 1C).

O perímetro escrotal é medida amplamente usada na seleção de reprodutores por possuir elevada herdabilidade (Ferraz e Eler, 2007) e associações favoráveis com características produtivas e reprodutivas, como ganho de peso, qualidade do sêmen e precocidade sexual. Estudos demonstram que o PE apresenta correlações favoráveis com o peso corporal (Torres-Júnior e Henry, 2005; Dias et al., 2008), com o peso à desmama (Martins Filho et al., 1994), com motilidade espermática (Pastore et al., 2008), produção espermática diária (Palasz et al., 1994) e morfologia espermática (Silva et al., 2002). Possui ainda correlação genética favorável com a idade ao primeiro parto e com o intervalo de partos, de novilha meias-irmãs paternas de touros da raça Nelore (Martins Filho e Lôbo, 1991; Martins Filho e Lôbo, 1994). No presente estudo, os animais precoces atingiram valores para PE condizente com a puberdade e com a maturidade sexual em idades menores do que os animais não-precoces, evidenciando a

importância desta característica para a seleção de animais com potencial reprodutivo superior em touros ainda jovens.

O melhor ajuste do desenvolvimento testicular em função da idade foi apresentado por seu modelo quadrático (linha vermelha na figura 1C: $y = -31,67 + 5,37x - 0,11x^2$, $R^2 = 0,69$). Em revisão realizada por Rawlings et al. (2008), o padrão de desenvolvimento testicular de touros é sigmóide, onde o crescimento é lento em período infantil, seguido de um rápido crescimento durante a fase puberal, estabilizando, por fim, quando o touro atinge a maturidade sexual. Neste estudo, o modelo quadrático foi o que melhor representou o padrão de aumento no perímetro escrotal, uma vez que os dados foram obtidos a partir dos 13 meses de idade, pois não se dispunham de informações dos animais no período infantil.

Avaliando o PE segundo a idade em relação à puberdade, observou-se efeito linear (linha vermelha na figura 1D). Como não houve interação significativa entre grupo e idade em relação à puberdade, afirma-se que o desenvolvimento do PE para ambos os grupos foi semelhante e representado pelo modelo $y = 23,32 + 1,56x$. O aumento médio mensal no perímetro escrotal dos animais, dos 60 dias antes aos 60 dias depois da puberdade, foi de 1,56cm como mostra coeficiente angular da regressão.

O volume do ejaculado aumentou de 0,95 a 9 mL em animais PREC e de 1,5 a 5,5 mL nos animais NPREC, dos 13 aos 23 meses de idade, respectivamente. Apenas o efeito de idade foi significativo para esta característica quando analisada segundo a idade dos animais (figura 2A). Os testículos,

o epidídimo e principalmente as glândulas sexuais acessórias (GSA) são responsáveis pela produção e secreção do plasma seminal (Senger, 2003). Rawlings et al. (2008) verificaram rápido crescimento testicular e de estruturas sexuais acessórias dependentes de andrógenos após 5 meses de idade, durante o rápido aumento na secreção de testosterona nessa fase. Como as GSA são dependentes de testosterona para o seu total desenvolvimento e funcionamento (Senger, 2003) acredita-se que o aumento do volume do ejaculado com a idade dos animais possa estar associado à ação daquele andrógeno sobre as estruturas responsáveis pela produção e secreção do plasma seminal.

A concentração espermática média aumentou de 0 a 660 em animais precoces e de 0 a 66,7 milhões de espermatozoides/mL em animais não-precoces, dos 13 aos 23 meses de idade. Houve efeito de idade e de grupo sobre a concentração (figura 2B). Aos 16, 17 e 18 meses de idade, a concentração espermática foi maior no grupo de animais precoces, indicando que estes possuem desempenho espermatogênico mais acentuado durante o desenvolvimento sexual do que os animais não precoces. A concentração também foi maior aos 23 meses de idade, época em que os animais já se encontravam na maturidade sexual. Do ponto de vista econômico, este resultado sugere que animais precoces seriam altamente indicados para centrais de inseminação artificial, tanto por sua utilização mais precoce nos testes de progênie, quanto pela quantidade de doses de sêmen produzidas por esses animais, aumentando não só a comercialização de material genético de alto valor como também a velocidade da propagação gênica de interesse à melhoria de rebanhos.

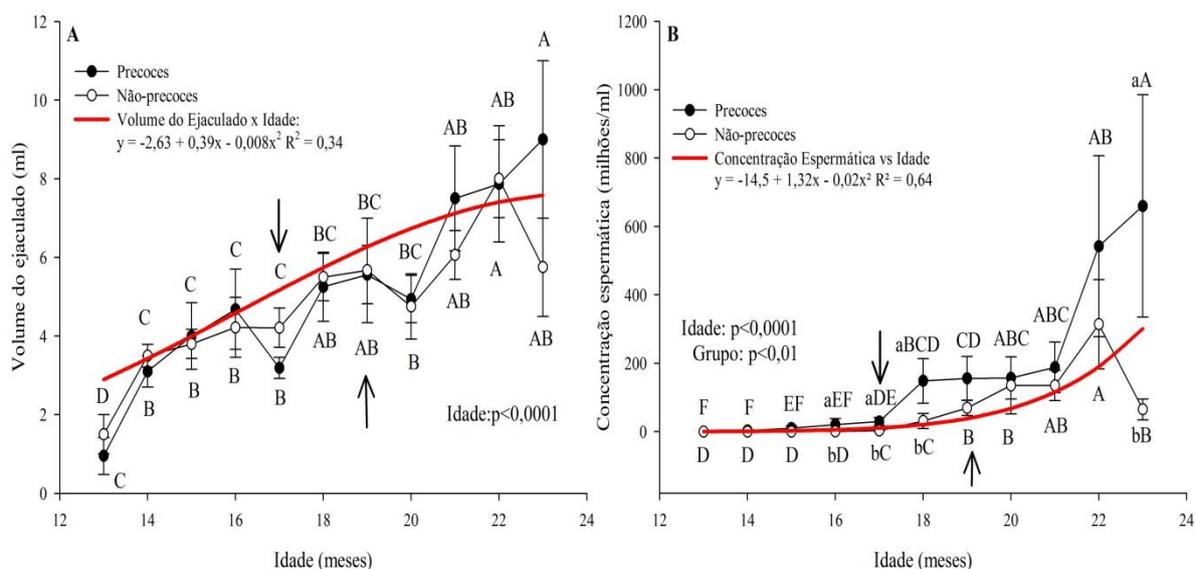


Figura 2: Médias (\pm erros padrão) do volume do ejaculado (VE - **A**) e da concentração espermática (CONC - **B**) segundo a idade em tourinhos Gir precoces e não-precoces. Setas indicam idade média à puberdade (≥ 50 milhões de espermatozoides e $\geq 10\%$ de motilidade espermática: \downarrow precoces \uparrow não-precoces). A linha vermelha representa o ajuste do modelo de regressão quadrática para VE (**A**) e para CONC (**B**) de ambos os grupos em relação à idade. Médias sobrescritas com letras minúsculas distintas diferem entre grupo dentro da idade pelo teste de Fisher (F) ($p < 0,05$). Médias sobrescritas com letras maiúsculas distintas diferem entre idades dentro de cada grupo pelo teste SNK ($p < 0,05$).

A concentração espermática apresentou desenvolvimento quadrático em relação à idade (figura 2B). Como o efeito da interação entre grupo e idade não foi significativo, o desenvolvimento da concentração espermática foi semelhante para animais PREC e NPREC, justificando o ajuste de apenas um modelo (linha vermelha na figura 2B: $y = -14,5 + 1,32x - 0,02x^2$, $R^2 = 0,64$). Observa-se que o desenvolvimento da CONC em animais precoces iniciou-se mais cedo e foi mais acentuado do que nos animais não-precoces.

A CONC também apresentou desenvolvimento quadrático em relação ao PE ($y = -4,2 + 0,08x + 0,006x^2$, $R^2 = 0,69$). O diâmetro dos túbulos seminíferos cresce gradativamente no período infantil, e mais rapidamente no período puberal.

Aumentos no diâmetro e no comprimento dos túbulos seminíferos influenciam

diretamente o tamanho testicular (Rawlings et al., 2008), e resultam em maior produção espermática.

A idade também apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a motilidade espermática com aumento mais acelerado entre 16 e 19 meses para animais PREC e entre 18 e 20 meses de idade para animais NPREC, (figura 3A). Quando se avaliou a motilidade espermática segundo a idade em relação à puberdade, verificou-se que tais períodos corresponderam a -30 à +60 dias para animais PREC e -30 à +30 dias para animais NPREC (figura 3B). Tais resultados demonstraram que ocorreu aumento da motilidade espermática no período pré-puberal para ambos os grupos. Almquist e Barber (1974) tiveram sucesso em coletar os primeiros espermatozoides móveis de touros da raça Charolês, criados sob alto plano nutricional, às 39 semanas de idade, ou seja, duas semanas antes do início da puberdade que foi observada às 41 semanas.

Resultados similares em *Bos taurus taurus* foram registrados por Lunstra e Echterkamp (1982), ao verificarem que o período de mais rápido aumento na motilidade espermática progressiva foi observado entre 2 semanas antes e 6 semanas após a puberdade. Dois meses antes do início da puberdade ocorre o início do aumento linear nas concentrações séricas de LH e de testosterona em *Bos taurus taurus* (Lunstra et al., 1978).

Pouco se sabe sobre a influência direta da testosterona sobre a motilidade espermática, entretanto, esse hormônio, através de seu metabólito 5 α -diidrotestosterona, é o regulador mais ativo da função epididimária (Robaire e Viger, 1995). No epidídimo ocorre maturação espermática, que é o conjunto de alterações morfológicas e metabólicas ocorridas no espermatozóide durante o trânsito epididimário, logo após a sua formação no testículo, que aumentam o poder fecundante do espermatozóide (Cornwall e von Horsten, 2007). Tais alterações incluem, não só a condensação final do núcleo, modificação na forma do acrossoma, alterações na constituição lipídica e protéica da membrana plasmática e na migração da gota citoplasmática proximal para a porção distal da peça intermediária, como também aumento da motilidade espermática progressiva (Barth e Oko, 1989).

Componentes do plasma seminal também exercem influência sobre a motilidade espermática. A frutose e o ácido cítrico são alguns dos principais metabólitos secretados pelas glândulas sexuais acessórias, e utilizados como fonte de energia para a fisiologia espermática. Rawlings et al. (2008) verificaram que o conteúdo de frutose e de ácido cítrico presente no plasma seminal de touros europeus aumenta significativamente após os 5 meses de idade

(pré-puberdade), influenciando, também, no aumento da motilidade espermática. Elementos protéicos do plasma seminal também parecem exercer influência sobre a motilidade espermática. Uma glicoproteína presente no plasma seminal e de possível origem epididimária, denominada proteína da motilidade espermática progressiva (Forward Motility Protein – FMP), é capaz de induzir, na presença de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), a motilidade progressiva em espermatozóides de touros oriundos da cabeça do epidídimo (Acott e Hoskins, 1978). Os autores verificaram que tal proteína foi encontrada em maior quantidade no epidídimo, sugerindo que este compartimento seja o seu sítio de produção e secreção, e ainda que ela modifique o metabolismo do espermatozóide durante a maturação espermática. Assim, o fato da motilidade espermática iniciar o seu aumento no período pré-puberal pode ser explicado pelo aumento na secreção de andrógenos que regulam as funções epididimárias, como a maturação espermática, e a secreção das glândulas sexuais acessórias no mesmo período.

Os defeitos espermáticos maiores também diminuíram com a idade (figura 3C) em ambos os grupos. O período de maior declínio dos DM foi entre 16 (85,4%) e 23 (4%) meses e entre 17 (57,9%) e 23 (8%) meses de idade para os grupos PREC e NPREC, respectivamente. Dados semelhantes foram descritos por Schmidt-Hebbel et al. (2000), que verificaram diminuição nos DM entre 14,2 (48%) e 25 (4,7%) meses de idade durante o desenvolvimento sexual de touros Gir selecionados para reprodução.

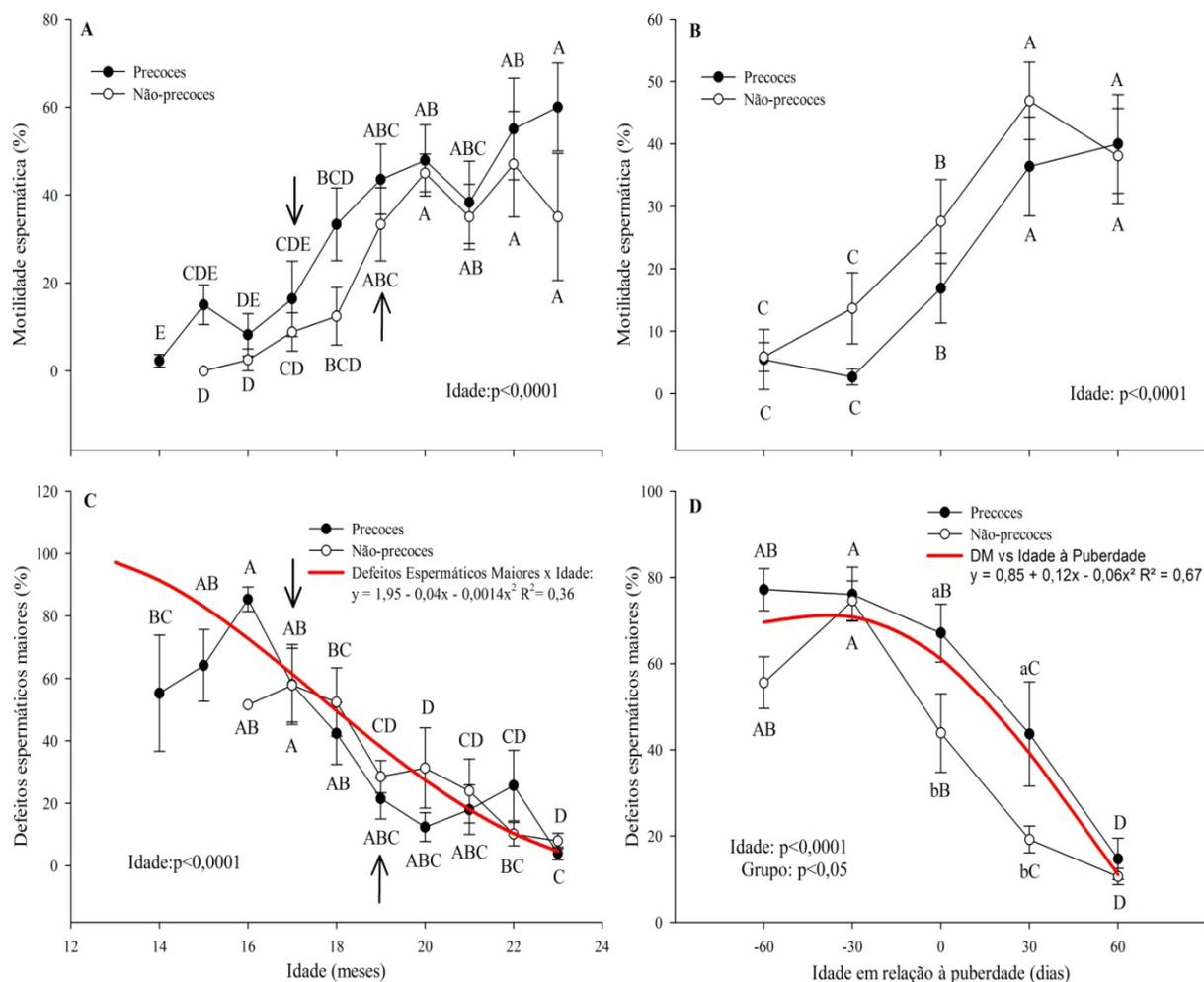


Figura 3: Médias (\pm erros padrão) da motilidade espermática (MOT) e dos defeitos espermáticos maiores (DM) segundo a idade (A e C) e a idade em relação à puberdade (B e D) em tourinhos Gir precoces e não-precoces. Setas indicam idade média à puberdade (≥ 50 milhões de espermatozoides e $\geq 10\%$ de motilidade espermática): \downarrow precoces \uparrow não-precoces). A linha vermelha representa o ajuste do modelo de regressão quadrática para DM de ambos os grupos em relação à idade e à idade à puberdade. Médias sobrescritas com letras minúsculas distintas diferem pelo teste de Fisher (F) ($p < 0,05$). Médias sobrescritas com letras maiúsculas distintas diferem pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Quando se avaliou esta característica de acordo com a idade em relação à puberdade (figura 3D), verificou-se, além do efeito de idade, o efeito significativo de grupo. Os animais não-precoces, apesar de iniciarem o aprimoramento do processo espermiogênico mais tarde que os animais precoces, apresentaram menores percentuais de DM na puberdade (momento 0) e 30 dias depois.

Entretanto, ambos os grupos apresentaram percentuais de defeitos maiores semelhantes 60 dias após a puberdade. Tal informação sugere a possibilidade de iniciar a seleção dos reprodutores ainda mais cedo, visando não só eficiência reprodutiva como também precocidade.

Não houve efeito significativo da interação entre grupo e idade, indicando que o desenvolvimento dos defeitos espermáticos maiores foi semelhante para ambos os grupos e representado por modelos quadráticos tanto em relação à idade ($y = 1,9 - 0,04x - 0,0014x^2$, $R^2 = 0,36$) como à idade em relação à puberdade ($y = 0,85 + 0,12x - 0,06x^2$, $R^2 = 0,67$).

Os primeiros dados com relação aos defeitos maiores foram registrados a partir dos 16 meses de idade (figura 3C) no grupo de animais não precoces. Isso ocorreu pelo fato de não terem sido encontradas células espermáticas até esta idade, possivelmente

em razão dos animais não terem iniciado ainda o processo espermatogênico. O mesmo não ocorreu com os animais precoces que já aos 13 meses de idade apresentaram células espermáticas no ejaculado.

Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman (tabela 2) demonstram um desenvolvimento coeso de todas as características avaliadas. Com o avanço da idade, houve aumento significativo do PE, PV, VE, da CONC, MOT, VIG e NORM, e a diminuição dos defeitos espermáticos maiores (DM), menores (Dm) e totais (DT), confirmando os resultados descritos anteriormente.

Tabela 2: Correlações de Pearson e Spearman entre os parâmetros estudados no desenvolvimento sexual de tourinhos Gir-leiteiro

	PE	PV	VE	CONC	MOT*	VIG*	DM	Dm	DT	NORM
Idade	0,78 ¹	0,83 ¹	0,55 ¹	0,77 ¹	0,57 ¹	0,48 ¹	- 0,60 ¹	- 0,04 ^{ns}	- 0,56 ¹	0,56 ¹
PE		0,82 ¹	0,54 ¹	0,81 ¹	0,43 ²	0,39 ²	- 0,51 ¹	- 0,09 ^{ns}	- 0,46 ¹	0,46 ¹
PV			0,58 ¹	0,76 ¹	0,47 ¹	0,35 ²	- 0,60 ¹	0,07 ^{ns}	- 0,55 ¹	0,55 ¹
VE				0,41 ¹	0,04 ^{ns}	- 0,08 ^{ns}	- 0,31 ²	0,07 ^{ns}	- 0,28 ²	0,28 ²
CONC					0,52 ¹	0,59 ¹	- 0,52 ¹	- 0,01 ^{ns}	- 0,51 ¹	0,51 ¹
MOT*						0,86 ¹	- 0,44 ²	0,01 ^{ns}	- 0,44 ²	0,44 ²
VIG*							- 0,30 ³	0,01 ^{ns}	- 0,28 ³	0,28 ³
DM								- 0,01 ^{ns}	0,95 ¹	- 0,95 ¹
Dm									0,28 ²	- 0,28 ²
DT										- 1,00 ¹

¹ p < 0,0001; ² p < 0,01; ³ p < 0,05; ^{ns} não significativo; * correlação de Spearman

O PE apresentou correlação significativa e de alta magnitude com o peso corporal, similar aos registrados por outros autores, e vêm sendo utilizada como ferramenta de seleção tanto para ganho de peso, como para precocidade. Moura et al. (2002) verificaram que touros Nelores mais pesados aos 10 meses já apresentavam maiores PE ($r=0,62$). Aos 30 meses, a correlação de Pearson entre o PE e o peso corporal foi significativa, porém de menor magnitude ($r=0,53$).

O PE apresentou correlação significativa e de média magnitude com o volume do ejaculado e elevada correlação com a concentração espermática. Foi observada diminuição no percentual de defeitos espermáticos maiores com o aumento da idade, do peso e do PE, durante o desenvolvimento sexual dos animais, como demonstrado pelas correlações negativas entre as variáveis. Foram observadas associações significativas de média magnitude entre idade, motilidade e vigor espermático.

A idade foi mais marcante para o percentual de espermatozoides normais, defeitos maiores e totais, demonstrando uma evolução do processo espermatogênico e de maturação espermática durante o desenvolvimento sexual dos touros.

As correlações entre PE, MOT, DM e DT encontradas foram semelhantes às descritas por Folhadella et al. (2006) (PE x MOT = 0,42; PE x DM = -0,49). Corroborando ainda com aqueles autores, as correlações entre a morfologia espermática e a motilidade, foram inversas, denotando a associação entre a morfologia do espermatozoide e sua movimentação.

CONCLUSÕES

Sob as mesmas condições de manejo nutricional intensivo, tourinhos Gir-leiteiro precoces à puberdade, atingem a maturidade sexual dois meses mais cedo que animais não-precoces.

É possível selecionar tourinhos Gir-leiteiro na pré-puberdade, visando a maturidade sexual precoce.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOTT, T.S.; HOSKINS, D.D. Bovine sperm forward motility protein: partial purification and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v.253, n.19, p.6744-6750, 1978.
- ALMQUIST, J.O.; BARBER, K.A. Puberal characteristics and early growth of Charolais bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v.38, n.4, p.831-834, 1974.
- ANDREA, M.V.; MARCONDES, C.R.; LÔBO, R.B. et al. Marcadores Moleculares Associados à Precocidade Sexual de Novilhas da Raça Nelore. In: **III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**, 2000, Belo Horizonte. Anais do III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2000. v.1. p.427-429.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BARTH, A.D.; BRITO, L.F.C.; KASTELIC, J.P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, v.70, p.485-494, 2008.
- BRITO, L.F.C. SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M. et al. Sexual development in early- and late-maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.62, p.1198-1217, 2004.
- CBRA 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2ed.. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.:il.
- CORNWALL, G.A.; VON HORSTEN, H.H. Sperm maturation in epididymis. In: CARREL, D.T. **The Genetics of Male Infertility**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. 211-231.
- DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M. et al. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.1, p.53-59, 2008.
- ELER, J.P.; SILVA, J.A.V.; FERRAZ J.B.S.; et al.. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.951-954, 2002.
- ELER, J.P.; SILVA, J.A.; FERRAZ, J.B. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.951-954, 2002.
- ELER J.P.; SILVA J.A.V; EVANS J.L. et al. Additive genetic relationship between heifer pregnancy and scrotal circumference in

- Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2519-2527, 2004.
- FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P. Seleção de bos indicus para precocidade sexual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.167-171, 2007.
- FOLHADELLA, I.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Características andrológicas de touros da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.809-815, 2006.
- HOPKINS F.M.; SPITZER, J.C. The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.13, p.283-293, 1997.
- IPE, D. Performing the Friedman test and the associated multiple comparison test using PROC GLM. **Proceedings of the Twelfth Annual SAS Users Group International Conference**, v.12, p.1146-1148, 1987.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1216-1231, 1998.
- 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. **Journal of Animal Science**, v.46, n.4, p.1054-1062, 1978.
- LUNSTRA D.D.; ECHTERNKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, v.55, n.3, p.638-648. 1982.
- MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.B. Estimates of genetic correlations between sire scrotal circumference and offspring age at first calving in Nellore cattle. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, n.1, p.209-212, 1991.
- MARTINS FILHO, R., LÔBO, R.B., DE LOS REYES, A. et al. Estimativas de parâmetros genéticos para a circunferência escrotal em bovinos da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, Maringá, 1994. **Anais...Viçosa: SBZ**, 1994. p.162.
- MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R.B. Correlações genéticas entre circunferência escrotal e características reprodutivas de fêmeas em bovinos da raça Nelore. **Ciência Agrônômica**, v.25, n.1, p.10-15, 1994.
- MOURA, A.A.A.; RODRIGUES, G.R.; MARTINS FILHO, R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia (supl.)**, v.31, n.2, p.934-943, 2002.
- NOGUEIRA, GP. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) Cattle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.361-372, 2004.
- PALASZ, A.T.; CATES, W.F.; BARTH, A.D. et al. The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. **Theriogenology**, v.42, n.4, p.715-726, 1994.
- PASTORE, A.A.; TONIOLLO, G.H.; LÔBO, R.B. et al. Características biométricas, testiculares, seminais e parâmetros genéticos de touros pertencentes ao programa de melhoramento genético da raça nelore. **Ars Veterinaria**, v.24, n.2, p.134-141, 2008.
- RAWLINGS, N. EVANS, A.C.O.; CHANDOLIA, R.K. et al.; Sexual Maturation in the bull. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, Supl.2, p.295-301, 2008.

ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Biology of Reproduction**, v.52, p.226-236, 1995.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: FEP MVZ Editora, 2002.

SAS. *User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 2002.

SCHMIDT-HEBBEL, J.; TONIOLLO, H.; LEITE, F.G. et al. Características físicas e morfológicas de sêmen de touros jovens das raças Gir, Guzera, Nelore (*Bos taurus indicus*) e Caracu (*Bos taurus taurus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.461-467, 2000.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ed. Ephrata,

Pennsylvania: Cadmus Professional Communications Science Press Division, 2003. 368p.

SILVA, A.E.D.F. UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T. et al. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1157-1165, 2002.

TORRES-JÚNIOR; J.R.S.; HENRY, M. Sexual development of Guzera (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.114-121, 2005.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E.B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v.24, p. 761-765, 1965.

CAPÍTULO II:

PROTEÍNAS SEMINAIS COM AFINIDADE À HEPARINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DE TOURINHOS GIR SELECIONADOS PARA A PRODUÇÃO DE LEITE

RESUMO

O presente estudo objetivou descrever a concentração de proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina durante o desenvolvimento reprodutivo e associar suas concentrações com parâmetros reprodutivos de tourinhos Gir-leiteiro precoces (PREC) e não-precoces (NPREC) criados em condições de confinamento. Dezesesseis animais foram acompanhados clínica e andrologicamente dos 13 aos 23 meses de idade. Os animais foram classificados como PREC e NPREC segundo a distribuição de frequência das idades à puberdade. Amostras de plasma seminal dos ejaculados foram colhidas em tampão Tris 40mM contendo inibidores de proteases e submetidas à cromatografia de afinidade à heparina para a caracterização do perfil de proteínas com afinidade à heparina e estimação de suas concentrações nas diversas idades estudadas. As concentrações dos picos cromatográficos nas diversas idades foram comparadas entre os grupos estudados e correlacionadas com os diversos parâmetros reprodutivos avaliados. Observou-se a presença de oito picos no cromatograma de afinidade à heparina, eluídos em diferentes concentrações de NaCl. O pico 1 (P1) representa as proteínas sem afinidade à heparina e os picos P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8, foram eluídos da coluna de afinidade nas respectivas concentrações de NaCl: **P2 e P3** – 0,09M; **P4** – 0,18M; **P5** – 0,3M; **P6** – 0,45M; **P7** – 0,6M e **P8** – 1,5M. Verificou-se que P1 e P2 estiveram presentes em todas as idades avaliadas em ambos os grupos. P3, P4, P5, P6, P7 e P8 tiveram o aumento mais significativo a partir dos 18 (PREC) e 19 (NPREC) meses de idade. Houve diferença no padrão de concentração de proteínas com afinidade à heparina entre os dois grupos apenas na puberdade. Correlações significativas foram observadas entre os picos cromatográficos e os parâmetros reprodutivos avaliados, com destaque para P5, P6 e principalmente P7. Este último apresentou as maiores correlações positivas com perímetro escrotal, motilidade e concentração espermática, além de ser o único correlacionado com o vigor espermático. O P7 também apresentou correlação inversa e de alta magnitude com os defeitos maiores, bem como menores concentrações dentre os picos avaliados; no entanto, as pequenas variações observadas foram responsáveis pelas maiores correlações. Conclui-se que o pico 7 de afinidade à heparina pode ser um importante marcador da função espermática de touros Gir-leiteiro.

Palavras-chave: cromatografia, espermatozóide, precocidade sexual, sêmen, Gir-leiteiro

SEMINAL PLASMA HEPARIN BINDING PROTEINS DURING REPRODUCTIVE DEVELOPMENT OF GYR YOUNG BULLS SELECTED FOR MILK PRODUCTION

ABSTRACT

This study was conducted to describe the concentration of seminal plasma heparin binding proteins (HBPs) during precocious (PREC) and non-precocious (NPREC) dairy Gyr young bulls reproductive development and to associate their concentrations with reproductive parameters. Sixteen animals were clinically and andrologically evaluated from 13 to 23 months of age and were grouped as PREC and NPREC according to the frequency distribution of their age at puberty. Seminal plasma samples were collected in Tris 40mM buffer with protease inhibitors and heparin affinity chromatography was performed to characterize the seminal plasma HPBs profile and to estimate their concentration through the ages. Chromatographic peaks concentrations were compared between groups and correlated to all reproductive traits. Eight peaks were observed according to different NaCl concentrations. Peak 1 (P1) represented the non heparin affinity proteins in seminal plasma (0% NaCl) and peaks P2, P3, P4, P5, P6, P7 and P8 were eluted from affinity column in the following NaCl concentrations: P2 and P3 – 0.09M; P4 – 0.18M, P5 – 0.3M; P6 – 0.45M; P7 – 0.6M and P8 – 1.5M. P1 and P2 were present in all evaluated ages and in both groups, and P3, P4, P5, P6, P7 and P8 had significant increase at 18 and 19 months of

age (precocious and non-precocious, respectively). Differences ($p < 0.05$) in heparin affinity proteins secretion pattern for both groups were observed only at puberty. Significant correlations were observed between chromatographic peaks and reproductive parameters, especially peaks P5, P6 and P7. The latter shows high and positive correlations with scrotal circumference, sperm motility, concentration and was the only one correlated with sperm vigor. It was also highly and inversely correlated with major sperm defects within all evaluated peaks. P7 had the lowest variation within other peaks, however its small variation was responsible for higher correlations. The results suggest that heparin affinity seminal plasma proteins in peak 7 can be an important marker for sperm function in dairy Gyr bulls.

Keywords: chromatography, sexual precocity, sperm, dairy Gyr.

INTRODUÇÃO

Durante anos o potencial reprodutivo do touro tem sido avaliado pela biometria testicular, representada pelo perímetro escrotal, e pelos parâmetros físicos (motilidade e vigor) e morfológicos (defeitos espermáticos maiores e menores) do sêmen. Tais parâmetros são eficientes na seleção de animais aptos à reprodução e descarte dos animais inaptos. No entanto, diferenças quanto à fertilidade de touros selecionados pelos parâmetros citados acima podem ser observadas. Assim, outros fatores bioquímicos, como proteínas seminais, podem estar associados a tais diferenças.

Killian et al. (1993) verificaram por meio da eletroforese bidimensional duas proteínas (26kDa, pI 6,2 e 55kDa, pI 4,5) presentes no plasma seminal de touros Holandeses de centrais de inseminação artificial nos Estados Unidos, com maior fertilidade e duas (16kDa, pI 4,1 e 16kDa, pI 6,7) mais presentes em touros de menor fertilidade avaliada pela taxa de não retorno ao estro, baseada em milhares de inseminações artificiais. Posteriormente, as proteínas relacionadas com a alta fertilidade foram identificadas como Osteopontina (55kDa, pI 4,5; Cancel et al. 1997) e Prostaglandina D Sintetase (26kDa, pI, 6,2; Gerena et al., 1998).

Uma classe de proteínas do plasma seminal bastante descrita na literatura é a que apresenta afinidade à heparina. Tais proteínas são as mais presentes no plasma

seminal, com produção e secreção, na sua grande maioria, pelas glândulas sexuais acessórias de maneira dependente de andrógenos (Sheit et al., 1998). Atuam na função espermática induzindo o efluxo de colesterol durante a capacitação espermática (BSP A₁/A₂, BSP A₃ e BSP 30kDa; Manjunath e Thérien, 2002), na formação do reservatório espermático no epitélio do oviduto (BSPA₁/A₂; Gwathmey et al., 2006), na remodelação da matriz extracelular (inibidor tecidual de metaloproteinases-2 – TIMP-2; McCauley et al., 2001) e também da reação acrossômica (antígeno associado à fertilidade – FAA; Miller et a., 1990).

Estudos sobre essa classe de proteínas já foram realizados em touros zebuínos, com Nelore (Salvador, 2005) e Gir-leiteiro (Folhadella, 2008), contudo, tais estudos foram realizados em touros sexualmente maduros. Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever o padrão de concentração de proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina durante o desenvolvimento reprodutivo, comparar suas concentrações entre os grupos de tourinhos Gir-leiteiro precoces (PREC) e não-precoces (NPREC) criados em condições de confinamento e identificar as proteínas mais correlacionadas à tais parâmetros.

MATERIAL E MÉTODOS

O manejo alimentar e os métodos de avaliação das variáveis reprodutivas dos

animais foram descritas no capítulo 1. Em suma, dezesseis tourinhos Gir-leiteiro criados dos 13 aos 23 meses de idade, em Uberaba – MG foram avaliados andrologicamente segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) e classificados como precoces (PREC; n=8) e não-precoces (NPREC; n=8), baseados na distribuição de frequência das respectivas idades à puberdade ($>50 \times 10^6$ de espermatozóides com no mínimo 10% de motilidade; Wolf et al., 1965).

Todos os procedimentos utilizados nas análises bioquímicas do plasma seminal foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e na Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Durante os dois primeiros meses de coletas de dados de campo, dois métodos para a coleta de plasma seminal foram testados num experimento piloto, visando averiguar a qualidade de preservação do conteúdo protéico durante o armazenamento das amostras até o momento das análises laboratoriais. No primeiro método, por ocasião da coleta de sêmen, duas alíquotas de 2mL de sêmen de cada animal foram coletadas e centrifugadas a campo (600 x g durante 10min) em centrífuga sorológica para a separação do plasma seminal das células espermáticas. O sobrenadante foi acondicionado em tubos criogênicos de 2mL e congelado em nitrogênio líquido (NL). Outras duas alíquotas de 1mL de sêmen total foram diluídas em 1mL (diluição inicial: 1:2) de tampão Tris Base 40mM contendo inibidores de proteases (Tris 40mM, CaCl_2 2mM, Azida Sódica 0,01%, Pepstatina A

1 μ M, PMSF 1mM). As amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos de 2mL e armazenadas em NL até o momento de análise.

Em laboratório, as amostras foram removidas do NL, descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas (16.295 x g durante 5min) para a separação das células espermáticas das amostras preservadas no tampão Tris base e para eliminar qualquer artefato remanescente na amostra de plasma seminal previamente centrifugada a campo. Esta última, após o descongelamento, foi diluída (1:2) no tampão Tris base para igualar as concentrações protéicas em ambas as amostras.

Realizou-se a cromatografia líquida de desempenho rápido (FPLC) de exclusão molecular, utilizando um cromatógrafo automatizado (FPLC System, Pharmacia, Uppsala, Suécia), para averiguar o efeito do método de coleta sobre a qualidade do conteúdo protéico do plasma seminal até o momento de análise. Foi utilizada uma coluna Superose 12 de 24mL com poro de 10 μ m diâmetro (Pharmacia, Uppsala, Suécia) e o tampão Tris base 40mM como fase móvel. As proteínas das amostras (TAMPÃO ou PURO) foram aplicadas na coluna em um volume de 500 μ L e foram eluídas a um fluxo constante de 0,5mL/min. As saídas das proteínas foram detectadas pelo leitor de 280nm ajustado na sensibilidade 1 e os cromatogramas (figura 1) foram construídos pelo registrador do FPLC System.

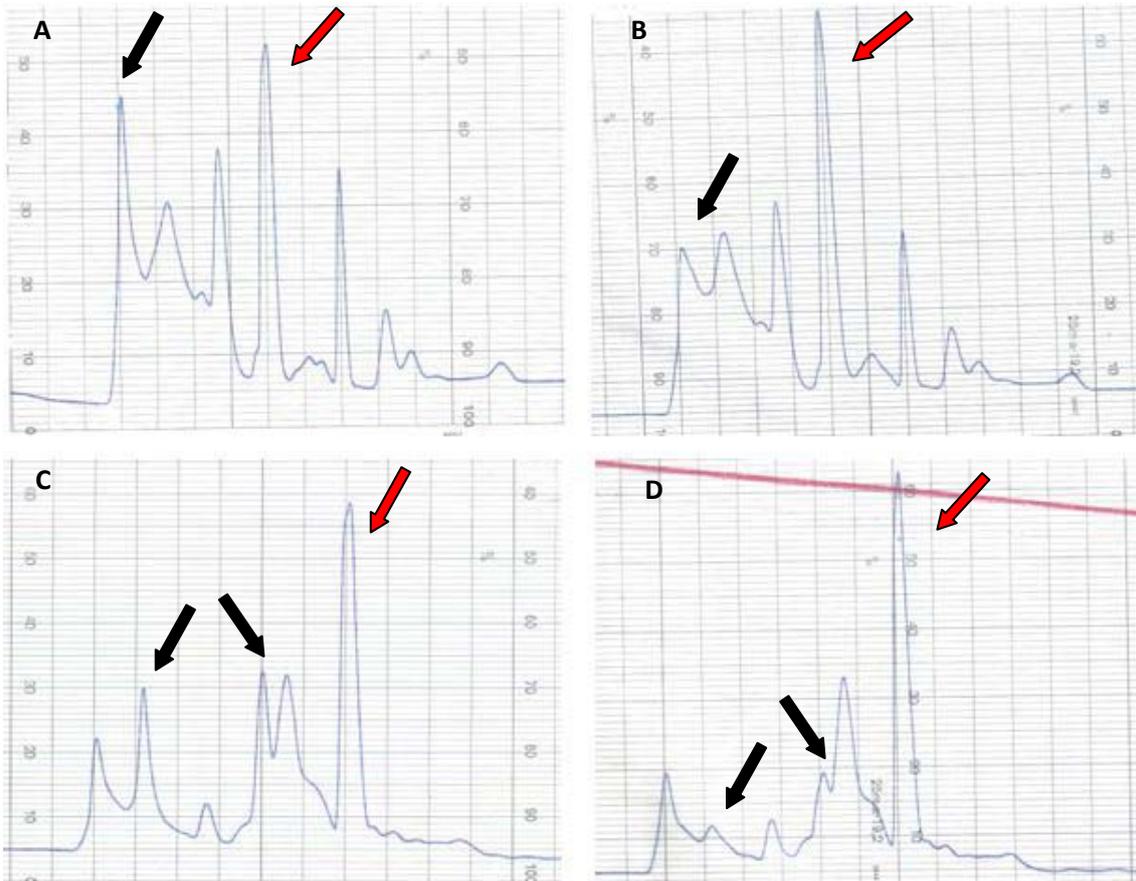


Figura 1: Cromatogramas de exclusão molecular de proteínas do plasma seminal de tourinhos dois Girleiteiro coletado por dois métodos (com ou sem tampão Tris base 40mM). **A:** touro 1 com tampão; **B:** touro 1 sem tampão; **C:** touro 2 com tampão; **D:** touro 2 sem tampão. As setas indicam as diferenças entre os picos dos cromatograma do mesmo touro (A vs B e C vs D).

Verificaram-se diferenças nas áreas dos primeiros picos (proteínas de maiores pesos moleculares eluídos da coluna Superose 12) entre os cromatogramas do mesmo animal testado. Nas amostras em que o sêmen foi tratado com o tampão Tris base (figuras 1A e 1C) as áreas dos primeiros picos foram maiores do que nas amostras centrifugadas a campo e armazenadas sem aquele tampão (figuras 1B e 1D). É possível que tais proteínas nas amostras puras tenham sido desnaturadas ou estiveram sujeitas à ação de proteases, que quebram as proteínas em peptídeos menores. De fato, além de observar a diminuição nas áreas dos picos

referentes às proteínas de maior peso molecular, verificou-se, também, ligeiro aumento na área do pico central de cada cromatograma. Isso reforça a hipótese de que houve ação de proteases, que quebraram as proteínas de maior peso molecular e os peptídeos resultantes de tal ação foram eluídos juntamente com proteínas de menores pesos moleculares. Portanto, baseando-se nos resultados deste experimento piloto, sugere-se que os inibidores de proteases presentes no tampão Tris foram eficazes em preservar a qualidade do conteúdo protéico do plasma seminal. Assim, todas as coletas de plasma seminal

foram realizadas com o tampão Tris base 40mM.

As amostras de plasma seminal utilizadas para as análises bioquímicas subsequentes das proteínas seminais foram correspondentes às idades -60, -30, 0, +30 e +60 dias em relação à puberdade dos 16 animais estudados.

Inicialmente as amostras foram retiradas do NL, descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas (16.295 x g por 5min) para a separação do plasma seminal e das células espermáticas. O plasma seminal foi alíquotado em tubos de 2mL e acondicionados a -20°C até o momento da análise.

A determinação das proteínas totais (PT) do plasma seminal foi realizada segundo Bradford (1976). Inicialmente, uma curva padrão foi construída a partir de quantidades conhecidas (0, 0,5; 1,5; 3; 5 e 10µg) de albumina sérica bovina (BSA). Os valores de absorbância da curva padrão apresentaram função linear ($y = 0,624 + 0,066x$, $R^2=0,99$) com concentrações de BSA.

Dois microlitros de amostra foram diluídos até 1000 vezes (1:1000) em tampão Tris Base 40mM para enquadramento da leitura de absorbância das amostras na curva padrão. Dessas amostras diluídas, 160µL foram depositados em duplicata em poços de uma microplaca de ELISA e aos mesmos foram adicionados e homogeneizados 40µL de reagente de Bradford (10% de Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% de Etanol a 95% e 10% de ácido fosfórico a 85%) concentrado

cinco vezes. Após um período de 10min de incubação, a placa foi submetida à espectrofotometria em leitor de ELISA (SpectraMax 340, Molecular Devices Inc, Toronto, Canadá) em um comprimento de onda de 595nm. As médias dos valores de absorbância das duplicatas foram substituídas no valor y da curva padrão, obtendo-se a quantidade de PT da amostra diluída (µg/160µL). Em seguida esse valor foi convertido para mg/mL e logo após, multiplicado pelo seu fator de diluição (até 1:1000) para determinar a concentração de proteínas totais na amostra coletada. Para determinar a concentração de PT no momento da ejaculação, os valores encontrados na amostra foram multiplicados pelo fator de diluição inicial (1:2) no momento da coleta.

Um experimento piloto foi realizado para determinar o melhor padrão de separação das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina, usando uma coluna HiTrap Heparin HP de 5mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e amostras de plasma seminal de touros maduros. Tais amostras foram submetidas ao FPLC, utilizando como fases móveis o mesmo tampão Tris 40mM utilizado na coleta do plasma seminal (solução A) e o tampão Tris 40mM acrescido de 1,5M de NaCl (solução B) para a eluição das proteínas que se ligaram à coluna. Testaram-se dois métodos de aplicação do gradiente da solução B: o método linear, onde o gradiente aumenta linearmente de 0 a 100% em 60 minutos, e o método em etapas onde o gradiente foi mantido, até a saída total de um pico de afinidade, nas concentrações 0, 6, 12, 20, 30, 40 e 100% de NaCl (figura 2).

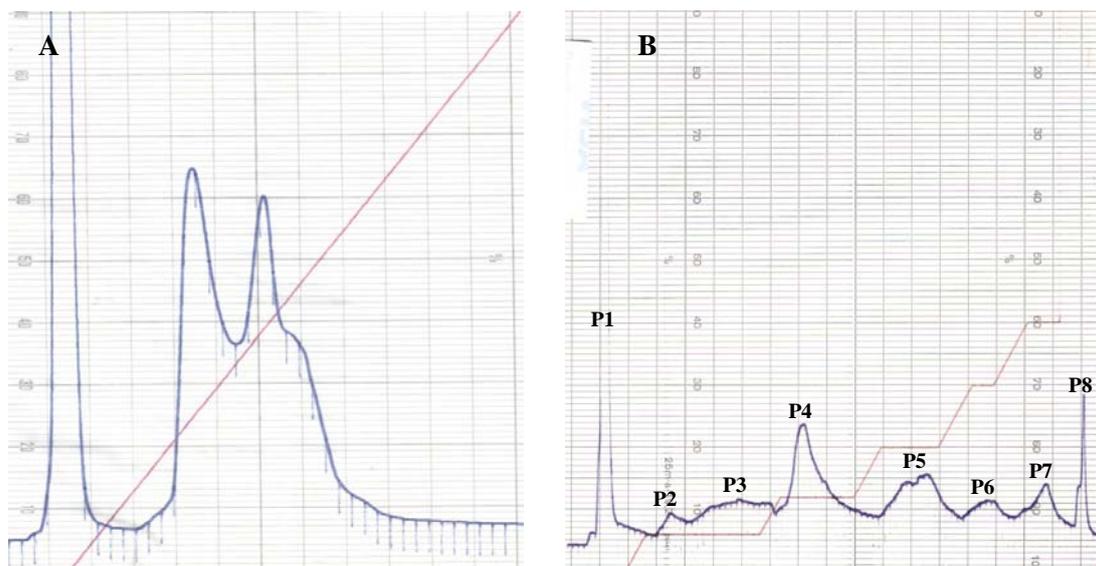


Figura 2: Experimento piloto (animal maduro) para padronização de separação das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina. A linha vermelha representa o crescimento do gradiente da solução B (Tris base 40mM + 1,5M NaCl). **A** – cromatograma com gradiente linear; **B** – cromatograma com gradiente em etapas. **P1** – 0% (proteínas sem afinidade à heparina); **P2** e **P3** – 6% (0,09M NaCl); **P4** – 12% (0,18M NaCl); **P5** – 20% (0,3M NaCl); **P6** – 30% (0,45M NaCl); **P7** – 40% (0,6M NaCl); **P8** – 100% (1,5M NaCl).

Observou-se que a aplicação do gradiente linear (figura 2A) foi eficiente em eluir as proteínas com afinidade à heparina, no entanto de forma agregada, levando à suposição de que existem apenas 3 picos de afinidade. Já no cromatograma B, pôde-se observar que, além de possuir a mesma eficiência em eluir todas as proteínas, o padrão de separação das mesmas foi mais bem definido, permitindo a detecção de sete picos com afinidade à heparina (P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8), além do pico referente às proteínas sem afinidade (P1).

Com base nos resultados do experimento piloto, as amostras de plasma seminal dos animais estudados nos respectivos períodos (-60, -30, 0 +30 e +60 dias em relação à puberdade) foram submetidas à FPLC de afinidade à heparina, adotando-se a aplicação do gradiente em etapas. Um volume de 500µL da amostra de trabalho (plasma seminal diluído 1:2 em tampão Tris 40mM) foi injetado na coluna de afinidade sob um fluxo inicial de 0,5mL/min da

solução A (tampão Tris Base 40mM) para a ligação da proteína com afinidade à heparina à resina da coluna. Após 5 minutos, o fluxo foi acelerado para 2mL/min e após 12 minutos foi iniciado um gradiente com a solução B para a eluição das proteínas que foram ligadas à coluna. O gradiente foi mantido nas proporções de 6, 12, 20, 30, 40 e 100% da solução B para a separação das proteínas de acordo com seus respectivos graus de afinidade à heparina.

À medida que iam sendo eluídos, os picos correspondentes às respectivas concentrações de NaCl foram coletados em tubos de 50mL e armazenados a 4°C. Em seguida foram dialisados em água destilada a 4°C em câmara fria utilizando a membrana de diálise Spectra/Por (Thomas Scientific, Swedesboro, Nova Jersey, EUA) com porosidade de 1kDa para a total remoção do sal da solução B. Em seguida, os picos foram liofilizados e armazenados a -20°C até o momento de posteriores análises.

Os cromatogramas gerados foram digitalizados e as áreas dos picos foram estimadas pelo programa Autocad 2008 (V. B.51.0, Autodesk, Inc.). O somatório das áreas dos picos correspondeu à quantidade de proteína aplicada em cada corrida cromatográfica e cada pico correspondeu a um percentual do total de proteínas aplicado. Para estimar a quantidade de proteína (mg/mL) de cada pico no ejaculado bruto, o valor encontrado para cada pico foi multiplicado por 2 para estimar a quantidade de proteína por mL da amostra de trabalho e novamente por 2 (fator de diluição inicial 1:2) no momento da coleta de plasma seminal.

Os valores de proteínas totais e de cada pico foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e de assimetria e curtose, pelo procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do pacote estatístico SAS (SAS, 2002). Somente o valor de proteínas do P1 se encontrou dentro da curva normal e não necessitou de transformação. As variáveis PT, P2, P4, P5 e P6 foram submetidas à transformação logarítmica ($\log(X + 1)$) para ajuste da normalidade e os valores dos picos P3, P7 e P8, por não se enquadrarem na curva normal, mesmo após a transformação logarítmica, foram considerados variáveis não-paramétricas (Sampaio, 2002). A verificação e o ajuste da normalidade para os parâmetros ponderais e reprodutivos avaliados estão descritos no capítulo 2.

O estudo foi realizado em delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema de parcelas subdivididas, sendo cada animal um bloco e as idades em relação à puberdade as subparcelas. Os valores de PT, P1, P2, P4, P5 e P6 foram comparados entre os grupos, nas idades em relação à puberdade, por meio do teste F, em entre idades dentro de cada grupo pelo teste SNK, utilizando o procedimento MIXED do SAS (Littell, et al., 1998) e o efeito de idade dentro de cada grupo foi ajustado por meio

de modelos de regressão linear e quadrática. Quando houve interação significativa entre grupo e idade à puberdade, um modelo foi ajustado para cada grupo separadamente.

Os valores de P3, P7 e P8, por serem considerados não paramétricos, foram submetidos à ordenação das observações por meio do procedimento RANK do SAS (Ipe, 1987), para, só então, serem comparadas entre os grupos, nas idades em relação à puberdade pelos contrastes ortogonais, e entre as idades dentro de cada grupo pelo teste não-paramétrico de Friedman (Sampaio, 2002).

As associações dos valores protéicos do plasma seminal e de cada pico de afinidade à heparina com os parâmetros ponderais e reprodutivos avaliados foram estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson (variáveis paramétricas), utilizando o PROC CORR, e de Spearman (variáveis não-paramétricas) por meio do PROC CORR com a opção SPEARMAN do SAS (SAS, 2002). Os modelos de regressão linear e quadrático foram ajustados por meio do procedimento REG do SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 3 e 4 ilustram os cromatogramas de afinidade à heparina do plasma seminal entre 60 dias antes e 60 dias após a puberdade de dois animais (grupos precoces e não-precoces, respectivamente). A tabela 1 mostra os valores médios de idade (meses) e de proteínas (mg/mL) dos 16 animais estudados no mesmo período.

No geral, observa-se que em ambos os grupos há aumento tanto na concentração de proteínas como no número e nas áreas dos picos com afinidade à heparina. O aumento mais significativo nas áreas dos picos, principalmente para P4, P5, P6, P7 e P8, ocorreu a partir da puberdade (figuras 3C e

4C), aumentando gradativamente à medida que os animais avançavam no desenvolvimento reprodutivo até 60 dias após a puberdade.

O pico 1 (proteínas sem afinidade à heparina) esteve presente em todas as idades em ambos os grupos estudados, sendo o pico de maior área dentre todas as proteínas do plasma seminal. Observou-se aumento na sua área com o desenvolvimento reprodutivo dos animais, tanto pelo aumento da concentração de proteínas totais do plasma

seminal, como pela possível secreção de novas proteínas que são produzidas e secretadas com o desenvolvimento reprodutivo dos animais. No entanto, afirmações qualitativas a respeito das proteínas presentes neste pico, como quais proteínas aumentam em concentração, quais passam a ser secretadas e o momento em que esses eventos acontecem, não puderam ser feitas a partir dos resultados obtidos com esta metodologia e também não foram objetivo do presente estudo.

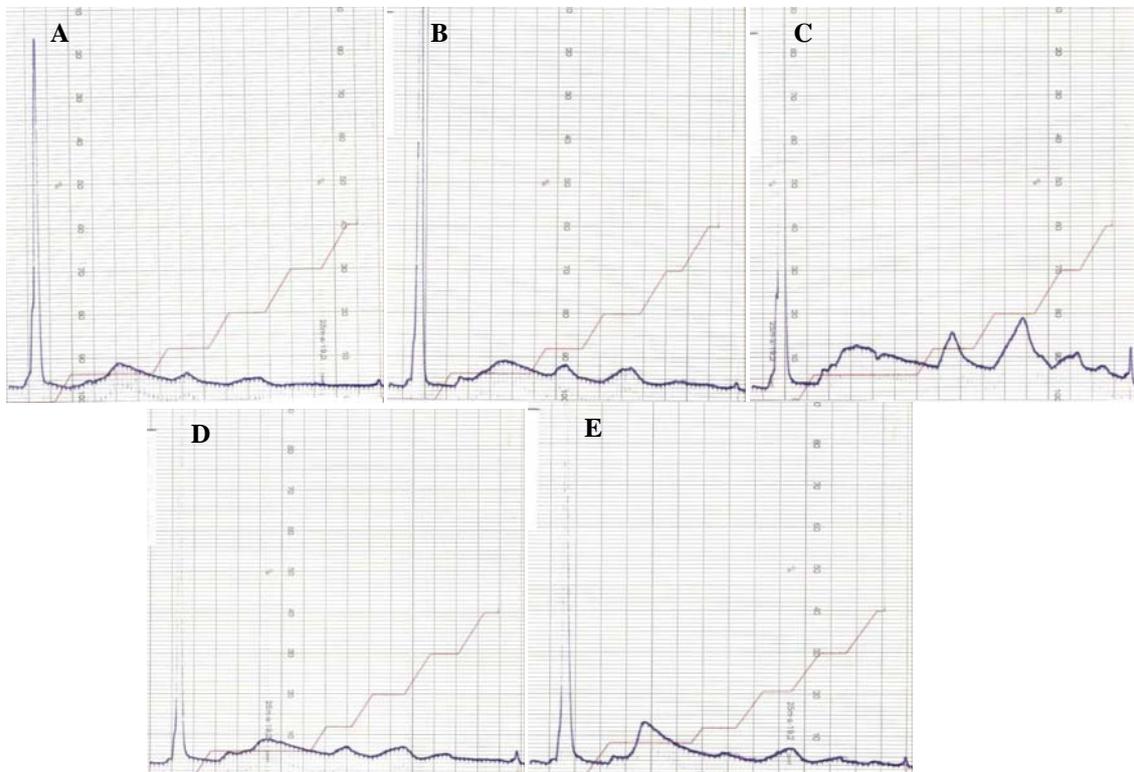


Figura 3: Cromatogramas de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de um touro representante do grupo de animais precoces durante o seu desenvolvimento reprodutivo. **A:** 60 dias antes da puberdade; **B:** 30 dias antes da puberdade; **C:** na puberdade; **D:** 30 dias após a puberdade; **E:** 60 dias após a puberdade.

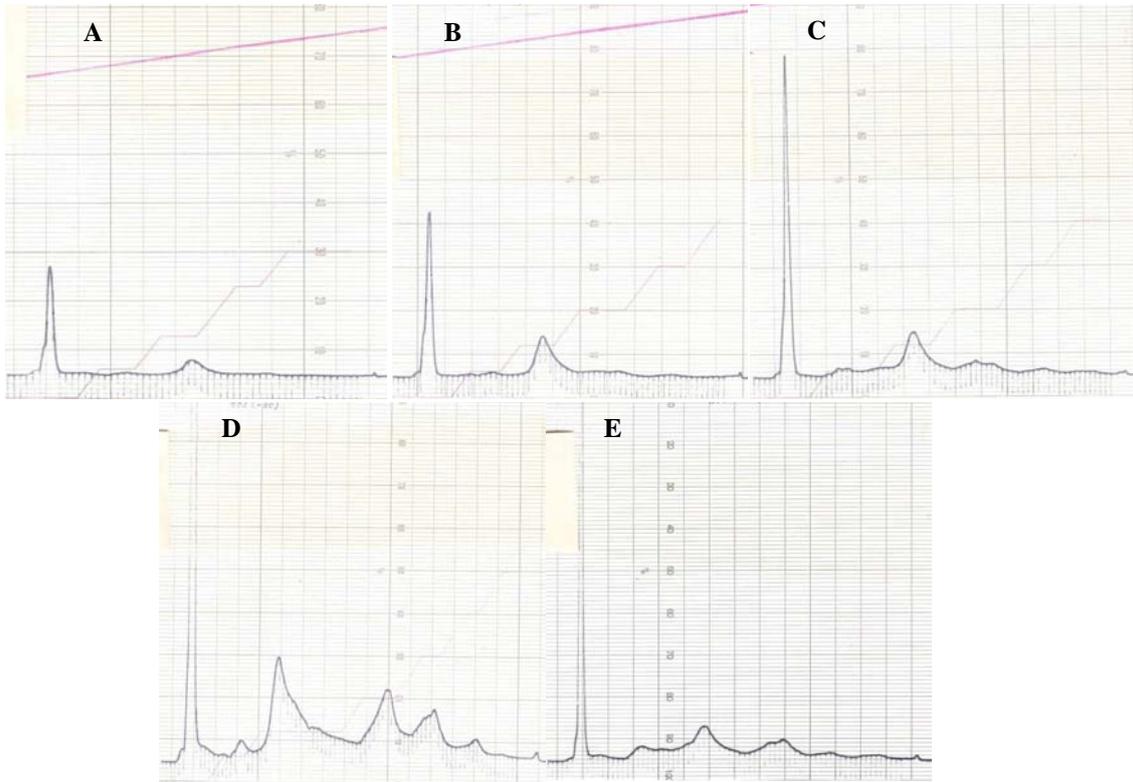


Figura 4: Cromatogramas de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de um touro representante do grupo de animais não-precoces durante o seu desenvolvimento reprodutivo. **A:** 60 dias antes da puberdade; **B:** 30 dias antes da puberdade; **C:** na puberdade; **D:** 30 dias após a puberdade; **E:** 60 dias após a puberdade.

Tabela 1: Médias (\pm desvios-padrão) da idade média e dos valores de proteínas totais e dos picos cromatográficos de afinidade à heparina do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiro precoces (PREC) e não-precoces (NPREC) avaliados desde 60 dias antes até 60 dias depois da puberdade

Parâmetro	IDADES EM RELAÇÃO À PUBERDADE											
	-60		-30		0 (puberdade)		30		60 (mat. sexual)		NPREC	PREC
	PREC	NPREC	PREC	NPREC	PREC	NPREC	PREC	NPREC	PREC	NPREC		
Idade (meses)	15,2 \pm 1,0	17,3 \pm 1,1	16,1 \pm 1,0	18,3 \pm 1,0	17,0 \pm 1,0	19,2 \pm 1,1	18,0 \pm 1,0	20,2 \pm 1,1	19,0 \pm 1,0	21,3 \pm 1,1	NPREC	PREC
PT (mg/mL)	13,3 \pm 7,7	15,2 \pm 12,8	12,7 \pm 9,7	15,5 \pm 8,4	13,5 \pm 13,5	36,9 \pm 24,4	37,1 \pm 36,0	29,7 \pm 18,0	32,1 \pm 14,8	34,0 \pm 13,7	NPREC	PREC
P1 (mg/mL)	8,3 \pm 3,1	7,1 \pm 5,0	7,3 \pm 4,6	6,9 \pm 2,3	6,1 \pm 4,1	11,4 \pm 5,6	12,4 \pm 7,2	9,4 \pm 4,5	12,2 \pm 4,1	10,9 \pm 3,4	NPREC	PREC
P2 (mg/mL)	0,6 \pm 0,3	0,6 \pm 0,6	0,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,8	0,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,6	1,2 \pm 1,3	0,8 \pm 0,7	1,2 \pm 1,3	1,0 \pm 0,3	NPREC	PREC
P3 (mg/mL)	2,1 \pm 3,2	1,9 \pm 3,2	1,9 \pm 2,8	2,6 \pm 3,4	2,7 \pm 3,9	8,5 \pm 7,3	7,7 \pm 8,0	6,0 \pm 5,3	5,4 \pm 3,2	6,5 \pm 3,8	NPREC	PREC
P4 (mg/mL)	1,2 \pm 0,7	3,2 \pm 3,8	1,7 \pm 1,5	2,9 \pm 1,8	2,0 \pm 2,5	6,0 \pm 5,1	7,9 \pm 10,5	4,7 \pm 4,2	6,2 \pm 4,8	5,7 \pm 3,3	NPREC	PREC
P5 (mg/mL)	0,6 \pm 0,7	1,8 \pm 2,1	0,9 \pm 1,1	1,5 \pm 1,8	1,3 \pm 2,0	6,9 \pm 5,4	7,1 \pm 9,7	4,7 \pm 4,1	4,8 \pm 2,9	5,0 \pm 2,3	NPREC	PREC
P6 (mg/mL)	0,3 \pm 0,3	0,7 \pm 0,9	0,2 \pm 0,4	0,7 \pm 0,7	0,5 \pm 0,7	4,4 \pm 3,5	2,0 \pm 2,3	2,7 \pm 2,6	2,1 \pm 1,8	2,7 \pm 1,5	NPREC	PREC
P7 (mg/mL)	0,04 \pm 0,11	0,4 \pm 0,5	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,4	1,1 \pm 1,1	1,5 \pm 2,4	1,1 \pm 1,1	0,7 \pm 0,4	1,6 \pm 1,2	NPREC	PREC
P8 (mg/mL)	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,4	0,6 \pm 1,1	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,6	NPREC	PREC

O pico 2 (0,09M NaCl) também esteve presente desde -60 a +60 dias em relação à puberdade em todos os animais de ambos os grupos, observando-se apenas o aumento na sua área com o decorrer do desenvolvimento. Já os picos 3 e 4 (0,09M e 0,18M NaCl, respectivamente) estiveram presentes desde 60 dias antes da puberdade apenas em poucos animais de ambos os grupos. Em média, sua secreção teve início aproximadamente 30 dias antes da puberdade, com aumento acentuado 30 dias

após. Os picos 5, 6, 7 e 8 foram os mais influenciados pelos eventos relacionados com a puberdade. Suas concentrações são baixas na grande maioria dos animais até o momento da puberdade, onde passaram a ser secretadas em maiores quantidades.

Todos os picos avaliados em ambos os grupos, com exceção dos picos 1 e 2, foram influenciados pela idade (figuras 5 e 6), aumentando gradativamente suas concentrações no sêmen com o desenvolvimento reprodutivo dos animais.

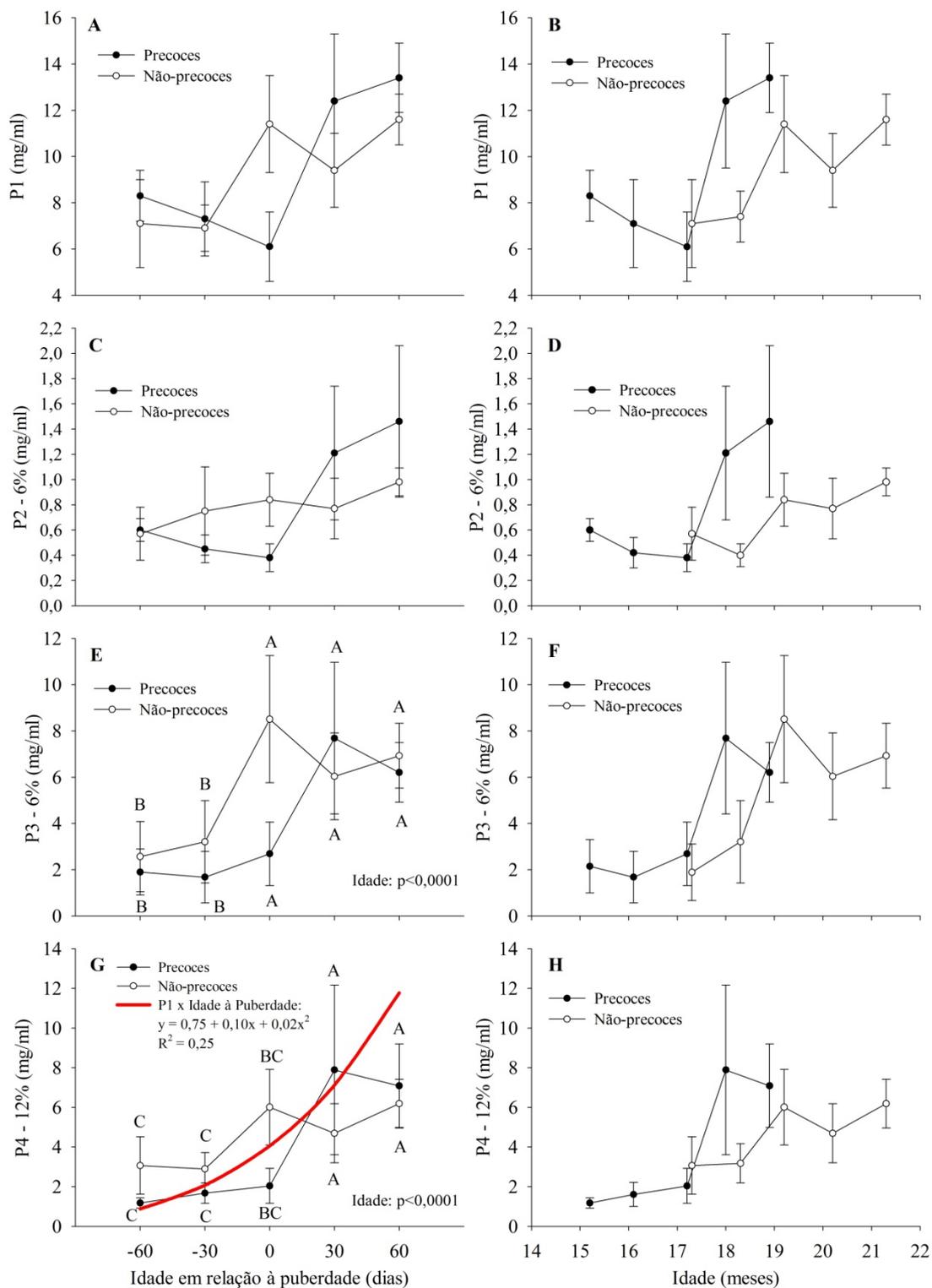


Figura 5: Médias (\pm erros padrão) dos picos cromatográficos de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiro precoces e não-precoces. **A, C, E e G:** P1, P2, P3 e P4 nas idades em relação à puberdade; **B, D, F e H:** P1, P2, P3 e P4 nas idade em meses. Médias sobrescritas com letras minúsculas diferem entre grupos dentro da idade pelos teste F ($p < 0,05$). A linha vermelha em G representa o modelo de regressão quadrática do P4 em função da idade em relação à puberdade.

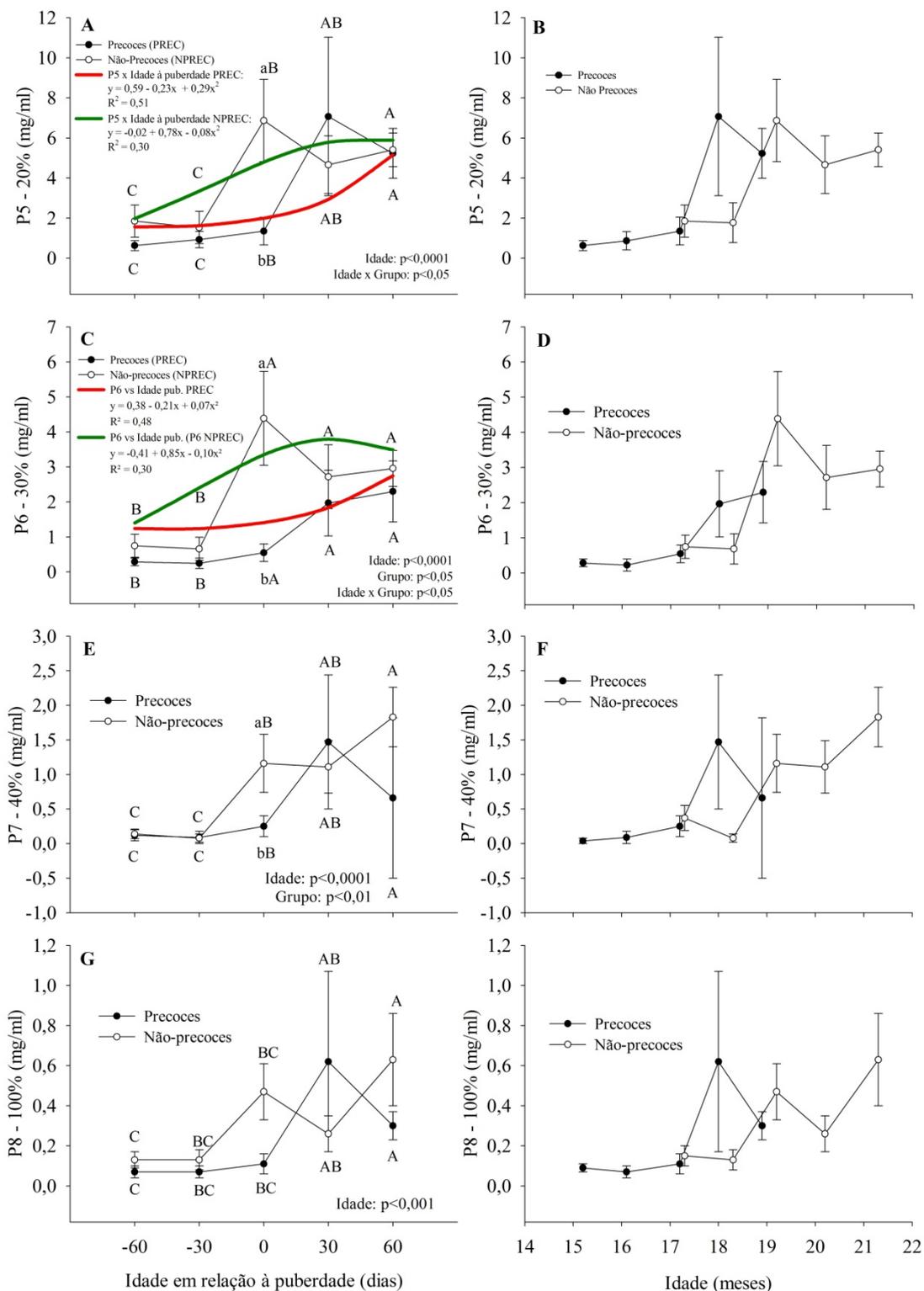


Figura 6: Médias (\pm erros padrão) dos picos cromatográficos de afinidade à heparina de proteínas do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiro precoces e não-precoces. **A, C, E e G:** P5, P6, P7 e P8 nas idades em relação à puberdade; **B, D, F e H:** P5, P6, P7 e P8 nas idade em meses. Médias sobrescritas com letras minúsculas diferem entre grupos dentro da idade pelos teste F ($p < 0,05$). As linhas vermelha e verde em A e C representas os modelos de regressão quadrática do P5 e P6 para animais precoces e não-precoces, respectivamente, em função da idade em relação à puberdade.

Com exceção dos picos 1, 2 e 3 (figura 3A, C e E), houve diferenças entre os grupos estudados quanto às concentrações dos picos cromatográficos com afinidade à heparina. Observa-se que na puberdade (momento 0) os animais não-precoces apresentam maiores concentrações de P4 (figura 3G), P5, P6, P7 e P8 (figura 4A, C, E e G). Entretanto, todos os animais apresentaram concentrações iguais dos mesmos picos aos 30 e 60 dias após a puberdade. Observando com mais detalhe os gráficos em relação à idade (figuras 3H e 4B, 4D, 4F e 4H), nota-se que o início do aumento das concentrações de tais picos nos animais precoces inicia-se na puberdade, ou seja, aos 17 meses de idade. O início do aumento nas concentrações dos mesmos picos nos animais não-precoces ocorre 30 dias antes da puberdade, período que corresponde a uma idade média de 18 meses. Portanto, os animais precoces iniciaram o aumento das concentrações dos respectivos picos um mês mais cedo que os animais não-precoces.

Tal diferença entre estas idades pode não ser significativa do ponto de vista prático para seleção de touros visando eficiência reprodutiva, uma vez que todos os animais apresentaram as mesmas concentrações dos respectivos picos 60 dias após a puberdade. Contudo, do ponto de vista de melhoramento genético visando precocidade, a seleção dos animais precoces poderia ser indicada para a melhoria desta característica, principalmente se tais proteínas tiverem associações com fertilidade.

Todos os animais do presente experimento foram criados em condições de confinamento recebendo alimentação de alto nível nutricional. É possível que a nutrição tenha aproximado os dois grupos, minimizando ou mesmo eliminando as diferenças para várias características estudadas. Observou-se no capítulo 1 que os animais precoces tiveram o desenvolvimento reprodutivo muito semelhante aos não-precoces, diferindo apenas na produção

gamética observada por intermédio da concentração espermática e no início do aumento da motilidade espermática.

É possível que o elevado plano nutricional também tenha diminuído as diferenças no que se refere à secreção de proteínas com afinidade à heparina. Esse grupo de proteínas é produzido e secretado pelas glândulas sexuais acessória de maneira dependente de testosterona (Sheit et al., 1988). Brito et al. (2007a e 2007b) verificaram que touros alimentados com elevado plano nutricional durante a pré-desmama e na peribuperdade tiveram um período de secreção de LH mais prolongado, concentrações de insulina e IGF-I mais elevados, bem como aumento na secreção de testosterona, o que reforça a hipótese do efeito da suplementação alimentar sobre a secreção de proteínas nos dois grupos estudados.

Até o presente momento, este é o primeiro estudo que visa descrever a secreção de todas as proteínas com afinidade à heparina presente no plasma seminal durante o desenvolvimento reprodutivo de bovinos. Vários estudos descrevem a função de determinado grupo de proteínas em animais já maduros e na sua maioria da espécie *Bos taurus taurus*. Proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina já foram anteriormente identificadas no plasma seminal de touros Nelore (Salvador, 2005) e Gir-leiteiro (Folhadella 2008) e suas associações com a reação acrossômica induzida por heparina e com a fertilidade in vitro, respectivamente. No entanto tais estudos foram realizados em animais maduros e visaram apenas um grupo de proteínas com afinidade à heparina presentes na fração correspondente ao tempo de retenção entre 25 e 31 minutos, previamente separada por uma coluna Superose12.

As correlações entre proteínas totais do plasma seminal e os picos cromatográficos das proteínas com afinidade à heparina estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Correlações de Pearson e Spearman entre os valores de proteínas seminais totais e com afinidade à heparina separadas por FPLC de afinidade e os diversos parâmetros reprodutivos estudados

Parâmetro	PT	P1	P2	P3*	P4	P5	P6	P7*	P8*
Idade	0,41 ²	0,23 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,39 ²	0,46 ¹	0,51 ¹	0,54 ¹	0,59 ¹	0,42 ²
PE	0,56 ¹	0,47 ¹	0,41 ²	0,45 ¹	0,64 ¹	0,60 ¹	0,56 ¹	0,64 ¹	0,38 ²
PV	0,55 ¹	0,40 ²	0,29 ³	0,55 ¹	0,57 ¹	0,62 ¹	0,51 ²	0,69 ¹	0,52 ¹
MOT*	0,30 ²	0,16 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,27 ³	0,33 ²	0,38 ²	0,38 ²	0,46 ¹	0,36 ²
Vigor*	0,09 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,34 ²	0,21 ^{ns}
VE	0,25 ³	0,20 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,31 ²	0,24 ³	0,33 ²	0,34 ²	0,27 ³	0,17 ^{ns}
CONC	0,52 ¹	0,40 ²	0,41 ²	0,47 ²	0,54 ¹	0,59 ¹	0,63 ¹	0,67 ¹	0,53 ¹
DM	-0,60 ¹	-0,45 ²	-0,37 ²	-0,48 ¹	-0,52 ¹	-0,61 ¹	-0,57 ¹	-0,70 ¹	-0,54 ¹
Dm	0,04 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,01 ^{ns}
DT	-0,63 ¹	-0,48 ¹	-0,38 ²	-0,50 ¹	0,54 ¹	-0,62 ¹	-0,60 ¹	-0,69 ¹	-0,58 ¹
Normais	0,63 ¹	0,48 ¹	0,38 ²	0,50 ¹	0,54 ¹	0,62 ¹	0,60 ¹	0,69 ¹	0,58 ¹

¹ p < 0,0001; ² p < 0,01; ³ p < 0,05; ^{ns} não significativo; * correlação de Spearman

Houve correlação positiva entre a idade e proteínas totais P3, P4, P5, P6, P7 E P8. Os picos 1 e 2 não foram correlacionados com a idade, indicando que tais picos não aumentaram, à medida que os animais ficaram mais velhos. Já os picos que foram associados à idade reforçam a hipótese de que sua secreção aumenta durante o desenvolvimento sexual.

O perímetro escrotal apresentou maiores correlações do que a idade com todos os picos avaliados, inclusive com os picos 1 e 2. O plasma seminal é uma mistura complexa de fluidos produzidos pelos testículos, epidídimos e principalmente pelas glândulas sexuais acessórias (Manjunath e Sairam, 1987; Manjunath et al., 1993; Senger, 2003). Como P1 e P2 apresentaram correlações com o PE e não com a idade, é possível que tais grupos de proteínas sejam de origem testicular. Já os picos P3 a P8 apresentaram maiores correlações com o PE do que P1 e P2 e ainda foram correlacionados com volume do ejaculado. É provável que tais picos tenham sua origem nas glândulas sexuais acessórias, pois as correlações com o VE sugerem que a produção e secreção dessas proteínas são controladas pelos mesmos fatores que controlam a produção do plasma seminal. No momento da ejaculação, os

espermatozoides são revestidos por proteínas com afinidade à heparina produzidas pelas glândulas sexuais acessórias (Miller et al., 1990). Nass et al. (1990) provaram que a secreção dessas proteínas é dependente de andrógenos e, portanto, é possível que a produção de testosterona pelos testículos tenha influenciado a secreção das proteínas no presente estudo, explicando, assim, sua maior correlação com o PE do que com a idade.

Dentre todos os picos avaliados, observou-se que P5, P6 e especialmente o P7 apresentaram as maiores correlações com os parâmetros reprodutivos estudados. O pico 7 apresentou os menores valores de área nos cromatogramas e as pequenas variações dessas proteínas foram mais correlacionadas que os outros picos com motilidade, concentração e defeitos espermáticos maiores, além de ser o único pico correlacionado com o vigor espermático.

Outros estudos têm relacionado algumas proteínas do plasma seminal com a motilidade espermática. Acott e Hoskins (1978) descrevem uma glicoproteína do plasma seminal que é capaz de induzir, na presença de adenosina mono fosfato cíclico (cAMP), a motilidade progressiva em

espermatozoides oriundos da cabeça do epidídimo, denominado-a proteína da motilidade espermática progressiva (Foward Motility Protein – FMP). Os autores verificaram que tal proteína foi encontrada em maior quantidade no epidídimo, sugerindo que este compartimento seja o seu sítio de produção e secreção, e ainda que ela modifique o metabolismo do espermatozoide durante a maturação espermática. No entanto, a FMP foi purificada, dentre outros métodos, pela cromatografia de afinidade à Concanavalina A, além de ter provável origem epididimária enquanto os picos encontrados no presente estudo foram separados segundo sua afinidade à heparina, portanto especulações sobre semelhanças entre essas proteínas não podem ser feitas com base nos resultados nele obtido. Sugere-se, portanto, que o pico é importante indicador para o potencial reprodutivo de touros Gir-leiteiro.

CONCLUSÕES

O fato dos animais precoces apresentarem aumento das concentrações de proteínas com afinidade à heparina, principalmente os picos 5, 6 e 7 (0,3M, 0,45M e 0,6M de NaCl, respectivamente) um mês mais cedo, confirma sua superioridade reprodutiva em relação aos não-precoces, uma vez que ambos os grupos estavam sob mesmo regime alimentar.

Pela sua alta correlação com os parâmetros reprodutivos avaliados, o pico 7 se constitui em importante marcador da fertilidade de touros Gir-leiteiro.

PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÃO NA SELEÇÃO DE FUTUROS REPRODUTORES

O presente estudo fornece informações sobre proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina e suas associações com parâmetros reprodutivos de touros Gir-leiteiro criados em alto nível nutricional. As conclusões a respeito do pico cromatográfico 7 sugerem que o mesmo possa servir como indicador do potencial reprodutivo de touros Gir-leiteiro. As informações sobre a sua afinidade, isto é, a força iônica necessária para desfazer as interações eletrostáticas entre as proteínas e a heparina (0,6M de NaCl), permitem aplicação prática para a seleção de animais com maior potencial reprodutivo.

Essas informações permitiriam propor um método para dosar tais proteínas a campo. Seria possível, por exemplo, fracionar 1mL de plasma seminal coletado no momento da ejaculação e incubá-lo com resina de heparina. Em seguida, o material seria centrifugado a baixa rotação e o sobrenadante, que conteria as proteínas sem afinidade, seria desprezado. O precipitado conteria as proteínas com afinidade ligadas à resina. Sabendo-se da força iônica necessária para o desligamento das proteínas do pico 7 (0,6M de NaCl), poder-se-ia ressuspender o precipitado em uma solução contendo 0,5M de NaCl para desligar as proteínas com menores afinidades, deixando as proteínas do pico 7 ainda ligadas na resina. Uma nova centrifugação permitiria a eliminação das outras proteínas e o precipitado seria novamente incubado com uma solução, agora com a concentração ideal para o desligamento das proteínas do pico 7. Na última centrifugação o sobrenadante seria aliquoteado e submetido a um método de dosagem de proteínas (Bradford ou Lowry) por espectrofotometria.

Em experimentos preliminares utilizando os mesmos touros do presente estudo (dados não publicados) foi possível, por meio da espectrometria de massa (MS-MS MALDI/ToF-ToF) identificar no pico 7 a proteína BSP 30kDa, relacionada à

fertilidade de touros, contudo mais estudos são necessários para identificar e confirmar a associação das proteínas do pico 7 com a fertilidade de touros zebuínos. No entanto, com base nas informações sobre sua afinidade com a heparina, é possível, com pouco material e um procedimento prático, que este método possa complementar análises andrológicas preliminares de rotina para afirmar, com mais acurácia, o potencial reprodutivo dos animais destinados à reprodução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOTT, T.S.; HOSKINS, D.D. Bovine sperm forward motility protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.253, n. 19, p.6744-6750, 1978.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; RAWLINGS, N.C. et al. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, p.1-18, 2007a.
- 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, p.460-469, 2007b.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1293-1301, 1997.
- CBRA 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.:il.
- FOLHADELLA, I.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. 2008. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y. et al. Identification of a Fertility-Associated Protein in Bull Seminal Plasma As Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase. **Biology of Reproduction**, v.58, p.826-833, 1998.
- GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L. et al. Bovine seminal plasma protein PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v.75, p.501-507, 2006.
- IPE, D. Performing the Friedman test and the associated multiple comparison test using PROC GLM. **Proceedings of the Twelfth Annual SAS Users Group International Conference**, v.12, p.1146-1148, 1987.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1216-1231, 1998.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- 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. **Biochemical Journal**, v.241, p.685-692, 1987.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E. et al. Major proteins of

bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.49, p.27-37, 1993.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproduction and Immunology**, v.53, p.109–119, 2002.

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

SALVADOR, D.F. **Perfis cromatográficos e eletroforéticos de proteínas com afinidade a heparina do sêmen de touros jovens da raça Nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelação do 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**. 2ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: FEP MVZ Editora, 2002.

SAS. *User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 2002.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ed. Ephrata, Pennsylvania: Cadmus Professional Communications Science Press Division, 2003. 368p.

SHEIT, K.H.; KEMME, M.; AUMÜLLER, G. et al. The major protein of bovine seminal plasma: biosynthesis and biological function. **Bioscience Reports**, v.8, n.6, p.589-608, 1988.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E.B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v.24, p. 761-765, 1965.