

LEONARDO FRANCO MARTINS

**TESTES COMPLEMENTARES EM SÊMEN E AVALIAÇÃO DA SÍNTESE
DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS ANIÔNICOS EM PLASMA SEMINAL DE
TOUROS DA RAÇA NELORE CLASSIFICADOS EM APTOS E INAPTOS À REPRODUÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

LEONARDO FRANCO MARTINS

**TESTES COMPLEMENTARES EM SÊMEN E AVALIAÇÃO DA SÍNTESE
DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS ANIÔNICOS EM PLASMA
SEMINAL DETOUROS DA RAÇA NELORE CLASSIFICADOS EM APTOS E
INAPTOS À REPRODUÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:19 de outubro de 2009.

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)

Profa. Maria Cristina Bacat Pereira
(Coorientador)

Dr. Jefersson Ferreira da Fonseca

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

Prof. José Domingos Guimarães
(Orientador)

Às pessoas que mais amo neste mundo,
Adalberto, Maria da Conceição, Cíntia, Antônio Patrício e companhia,
e minhas sobrinhas Manuela e Carolina.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de estudo durante o doutorado. Aos Departamentos de Veterinária e Zootecnia, que proporcionaram a realização deste trabalho. À funcionária Rosi que sempre me ajudou muito durante todo o doutorado.

Ao meu orientador José Domingos Guimarães e toda família Guimarães, por seus ensinamentos, e por serem exemplos como profissionais e pessoas.

Ao meu amigo de fé gordão camarada Rogério Pinho, devido à sua cooperação técnica e pessoal em todas as fases e experimentos realizados. Aos paraenses e amigos Eric e Bruno, pela ajuda, amizade e cooperação técnica.

As veterinárias Jeanne Siqueira e Morgana Cardoso, pela ajuda na realização dos trabalhos na fazenda da agropecuária CFM. Sr. Rodney, Tamires Miranda Neto e Fúlvio Domeneck, por proporcionar ótimas condições de trabalho para a realização dos experimentos. A todos os funcionários da agropecuária CFM, em especial Lorival, Nivaldo, Vaguinho, Neném, Baiano, que tanto ajudaram.

À professora Maria Cristina Baracat-Pereira pela confiança, ajuda, ensinamentos e exemplo de pesquisadora e de pessoa. A todos no laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas da UFV, em especial à Mariana, Hebréia, Meire, Lanna, Nayara, Patrícia, Rubens e Marcos Jorge, fundamentais no trabalho de proteômica, sempre ajudando e ensinando.

Ao professor Joaquim Hernán Patarroyo, e sua equipe, Márcio, Sidmar, Elisangela, por conceder a utilização do microscópio de epifluorescência, amizade e convivência. A todos que trabalharam no setor de gado de corte da UFV, Sr. Loviral, Sr. Didi, Dr. Belmiro e professor Mario Fonseca Paulino, pela ajuda.

Aos professores, Ciro Alexandre Alves Torres e Eduardo Paulino da Costa pelos ensinamentos e conselhos. Ao Sr. Nenzinho, Gustavo, Jean e Emílio, pela amizade e ajuda.

Aos estagiários Maurício Japinha, Renan Boca, Pedro Marcelinho, Anderson, Hugo e Jotinha, pela ajuda e amizade. Aos hoje mestres e mestrados Renan Reis, Grazi, Pedro Gama, Danilo Murta, João Gabriel, pela amizade e ajuda.

À família Gasparini Texeira, minha namorada Cíntia e seus pais (Mauri e Zila), irmãs (Érica e Flávia), Vanildo, Zilma, Marcel e Vitória, pela amizade.

Às duas gerações da república dos Aflitos (desde 1998), Jorge Bode, Alhuvas, Tiago Pardal, Tiago Chumbinho, Rogério Bambino, Guilherme Durock, Mãozinha, Ratão, Marco Toca e todos os agregados (Bitá, Sandro, Xarope, Zé, entre outros), pela amizade e *rock and roll* proporcionado.

BIOGRAFIA

LEONARDO FRANCO MARTINS, filho de Adalberto Martins e Maria da Conceição Franco Martins, nasceu em 24 de fevereiro de 1975, na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Em 1998, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná.

Em 2001, concluiu o mestrado na área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, junto ao Departamento de Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2005, iniciou o curso junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nível de doutorado, área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, junto ao Departamento de Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Testes complementares em sêmen bovino.....	2
Proteínas do plasma seminal envolvidas na capacitação espermática e fertilização.....	4
OBJETIVOS.....	13
HIPÓTESES.....	13
CAPÍTULO 1 - TESTE HIPOSMÓTICO EM SÊMEN E PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS DA RAÇA NELORE.....	14
EXPERIMENTO 1: Avaliação física, morfológica e teste hiposmótico em sêmen de touros jovens e adultos da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução.....	14
RESUMO.....	14
1 - INTRODUÇÃO.....	15
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 – Animais, exame andrológico e classificação quanto a aptidão reprodutiva.....	15
2.2 - Avaliação física e morfológica do sêmen.....	17
2.3 - Teste hiposmótico.....	17
2.4 - Análise Estatística.....	18
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1 - Touros jovens.....	19
3.2 - Touros adultos.....	22
3.3 - Conclusão.....	24
EXPERIMENTO 2: Avaliação de proteínas e peptídeos aniônicos diferencialmente sintetizados em plasma seminal de touros adultos e jovens da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução.....	25
RESUMO.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 – Animais e coleta do plasma seminal.....	27
2.2 - Preparo das amostras para a análise proteômica.....	28
2.3 - Determinação da proteína total.....	28
2.4 - Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC) em HPLC.....	29
2.5- Determinação da massa molecular por espectrometria de massa.....	30
2.6 - Análise Estatística.....	30
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CAPÍTULO 2 - TESTE HIPOSMÓTICO E QUALIDADE DO SÊMEN IN NATURA E CONGELADO/DESCONGELADO DE TOUROS ADULTOS DA RAÇA NELORE.....	44
EXPERIMENTO 3: Utilização de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempo de	

incubação na realização do teste hiposmótico e sua relação com a qualidade e congelabilidade de sêmen de touros da raça Nelore.....	44
RESUMO.....	44
1 - INTRODUÇÃO.....	46
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 – Animais e criopreservação do sêmen.....	47
2.2 – Teste hiposmótico com diferentes soluções e tempos de incubação.....	47
2.3 – Coloração Supravital (Eosina-nigrosina).....	48
2.4 – Teste de termo-resistência lento.....	48
2.5 – Coloração fluorescente.....	49
2.6 – Análise estatística.....	49
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
EXPERIMENTO 4: Relação da concentração de sêmen no teste hiposmótico com a qualidade do sêmen in natura e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.....	59
RESUMO.....	59
INTRODUÇÃO.....	60
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1 – Animais e criopreservação do sêmen.....	60
2.2 – Teste hiposmótico com diferentes proporções sêmen: solução hiposmótica.....	61
2.3 – Coloração Supravital (Eosina-nigrosina).....	62
2.4 – Teste de termo-resistência lento.....	62
2.5 – Coloração fluorescente.....	62
2.6 – Análise estatística.....	62
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.....	14
Experimento	
1.....	14
Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão do perímetro escrotal, percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica, e aspectos físicos e morfológicos do sêmen <i>in natura</i> de touros jovens da raça Nelore, classificados em aptos e inaptos à reprodução.....	21
Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão do perímetro escrotal, percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica, e aspectos físicos e morfológicos do sêmen <i>in natura</i> de touros adultos da raça Nelore, classificados em aptos e inaptos à reprodução.....	23
CAPÍTULO 2.....	44
Experimento	
3.....	44
Tabela 1 - Composição química do diluente para a criopreservação de sêmen bovino (citrato-gema).....	47
Tabela 2 – Quantidades de citrato de sódio e frutose das diferentes soluções hiposmóticas utilizadas em sêmen bovino <i>in natura</i> e congelado/descongelada.....	48
Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen <i>in natura</i> de touros adultos da raça Nelore, criados em condições extensivas.....	51
Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão do teste supravital e percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica em sêmen <i>in natura</i> e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.....	52
Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de touros adultos da raça Nelore congelado/descongelado e após 3 horas de incubação (teste de termoresistência).....	53
Tabela 6 - Valores médios e desvios-padrão dos resultados dos testes supravital, hiposmótico e coloração fluorescente em sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.....	55
Tabela 7 - Valores médios e desvios-padrão do percentual de espermatozóides reativos em sêmen <i>in natura</i> e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore, após incubação em solução hiposmótica em diferentes osmolaridades.....	56

Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão do percentual de espermatozóides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore, após incubação em solução hiposmótica em diferentes tempos de incubação.....56

Experimento

4.....59

Tabela 1 - Composição química do diluidor base (Bioxcell® - IMV).....61

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros adultos da raça Nelore, criados em condições extensivas.....63

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão do teste supravital e percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros da raça Nelore.....64

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de touros adultos da raça Nelore congelado/descongelado e após 3 horas de incubação (teste de termo-resistência).....65

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão dos resultados dos testes supravital, hiposmótico e coloração fluorescente em sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.....66

Tabela 6 - Valores médios e desvios-padrão do percentual de espermatozóides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore, após incubação em solução hiposmótica com diferentes quantidades de sêmen em 1 mL de solução hiposmótica.....67

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA	2
Figura 1 - Reação acrossômica e fusão dos gametas (Fonte: Gadelá., 2008).....	7
Figura 2 - Mecanismo de atuação das BSP's na capacitação espermática (Fonte : Manjunath e Thérien, 2002).....	9
Figura 3 - Diagrama esquemático dos aspectos do metabolismo espermático e fertilização que são potencialmente influenciados por moléculas protéicas encontradas no plasma seminal (Fonte: Moura et al., 2007).....	11
CAPÍTULO 1	14
Experimento	
1	14
Figura 1 - Espermatozóide não reativo (A) e os principais tipos de dobramentos de cauda encontrados na realização do teste hiposmótico (B) (Fonte: arquivo pessoal do autor).....	18
Experimento	
2	25
Figura 1 - Curva padrão para estimar a concentração protéica pelo método do Bradford ajustado.....	29
Figura 2 - Perfis cromatográficos comparativos de troca catiônica em HPLC das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos (AA) à reprodução. Foi utilizada a coluna Spherisorb® SCX 5µm (WATERS CORPORATION). Os círculos indicam as regiões TC1 a TC6 em que foram obtidos os 18 eluatos que foram selecionados para a cromatografia de fase reversa.....	31
Figura 3 - A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), absorvância a 214nm (AU) e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da primeira fração da troca catiônica (TC1). B) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal (as setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa).....	33
Figura 4 - A) Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) do pico diferencial do plasma seminal de touros jovens aptos à reprodução (JA) provenientes da cromatografia de fase reversa da	

primeira fração da troca catiônica (TC1) utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e B) ácido sinapínico.....34

Figura 5 - A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), a absorvância a 214nm (AU) e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da segunda fração da troca catiônica (TC2). B) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal (as setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa).....35

Figura 6 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais do plasma seminal de touros jovens aptos (JA) (C), jovens inaptos (JI) (A) e touros adultos aptos à reprodução (AA) (B), proveniente da cromatografia de fase reversa da segunda fração da troca catiônica (TC2), utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.....36

Figura 7 - A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), absorvâncias a 214nm (AU), e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da terceira fração da troca catiônica (TC3). B, C, D) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal. As setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa.....37

Figura 8 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais do plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e touros adultos aptos à reprodução (AA), provenientes da cromatografia de fase reversa da terceira fração da troca catiônica (TC3) utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.....38

Figura 9 - A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes) e a absorvância a 214nm (AU), e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da quarta fração da troca catiônica (TC4). B, C) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal. As setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa.....39

Figura 10 - Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais do plasma seminal de touros jovens aptos (JA) (A e C), e touros adultos aptos à reprodução (AA) (B), proveniente da cromatografia de fase reversa da quarta fração da troca catiônica (TC4) utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.....40

Figura 11 - Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), a absorvâncias a 214nm (AU) e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da quinta fração da troca catiônica

(TC5).....41

Figura 12 - Espectro de massa molecular (MALDI-TOF/TOF) do pico do plasma seminal de touros jovens inaptos (JI), provenientes da cromatografia de fase reversa da quinta fração da troca catiônica (TC5) utilizando a matriz de ácido sinapínico.....41

Figura 13 - Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), absorvância a 214nm (AU), e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da sexta fração da troca catiônica (TC6).....42

CAPÍTULO 2.....44

Experimento

3.....44

Figura 1 - Espermatozóides íntegros (A), semi-lesados (B) e lesados (C) sob a microscopia de epifluorescência utilizando diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo (Fonte: arquivo pessoal do autor).....49

RESUMO

MARTINS, Leonardo Franco, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2009. **Testes complementares em sêmen e avaliação da síntese diferencial de proteínas e peptídeos aniônicos em plasma seminal de touros da raça nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa e Maria Cristina Baracat Pereira.

As principais análises realizadas como rotina para avaliar a qualidade seminal são a motilidade espermática progressiva retilínea e morfologia para a mensuração da fertilidade de touros. Diversas técnicas complementares são utilizadas para melhorar avaliação da fertilidade de touros. Cada técnica está relacionada com diferentes aspectos da qualidade seminal e seus resultados ainda não são totalmente compreendidos. Foram realizados quatro experimentos. O experimento 1 teve como objetivo estudar as relações entre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen com o teste hiposmótico em sêmen *in natura* de touros jovens e adultos. Foram utilizados 626 touros da raça Nelore, sendo 420 touros jovens e 206 touros adultos. Os touros jovens com idades variando de 18 a 22 meses e touros adultos com idades variando de 3 a 10 anos, foram submetidos a exame andrológico. Após a palpação das glândulas vesiculares e mensurações testiculares foi realizada a coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação. Após a análise física e morfológica do sêmen foi realizado o teste hiposmótico. Após a classificação andrológica, 83% dos touros jovens e 94% dos touros adultos foram classificados em aptos à reprodução. Não houve diferenças entre as médias de perímetro escrotal dos touros classificados como aptos e inaptos à reprodução ($P > 0,05$). Houve diferenças entre as médias de todos os aspectos físicos e morfológicos do ejaculado de touros inaptos e aptos à reprodução ($P < 0,05$), mas não foram observadas no percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico ($P > 0,05$). Com estes resultados, pode-se concluir que o teste hiposmótico não pode ser utilizado isoladamente para prever o potencial reprodutivo de touros jovens e adultos da raça Nelore, pois não houve diferenças entre os percentuais de espermatozoides reativos do sêmen de touros aptos e inaptos à reprodução, e não houve relações com os principais aspectos de qualidade seminal. O experimento 2 teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente sintetizadas em plasma seminal de touros jovens e adultos da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução. Após o exame andrológico, os touros jovens foram classificados em aptos (117) e inaptos (49) à reprodução, e os touros adultos (56), em aptos à reprodução. As amostras de plasma seminal, conservadas em palhetas finas sob -196°C , foram descongeladas à temperatura ambiente para serem realizadas as análises proteômicas. Foi

realizada a MDLC *offline*, sendo a primeira dimensão a cromatografia de troca catiônica e a segunda a de fase reversa. Foram coletadas seis frações eluídas nas condições de equilíbrio (pH 7,0) na cromatografia de troca catiônica, que correspondem às frações de peptídeos e proteínas com caráter aniônico e neutro. As frações correspondentes aos picos eluídos obtidos na cromatografia de fase reversa foram analisadas em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF para a determinação da massa molecular das proteínas. Foram selecionados e analisados 96 eluatos coletados na cromatografia de fase reversa para a espectrometria de massa, com síntese protéica diferencial entre os tratamentos. Dezoito massas moleculares foram identificadas por espectrometria de massa, entre 4.233 e 13.560 Da. A proteína de 12.910 Da, com massa molecular e características semelhantes à aSFP (*acidic seminal fluid protein*), foi obtida em maior concentração nos touros aptos adultos, seguidos pelos aptos jovens e inaptos. Os perfis cromatográficos protéicos foram diferentes entre os grupos, sugerindo que a proteínas aniônicas podem ser estudadas visando identificar marcadores protéicos para a aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore, pela análise proteômica do plasma seminal. Nos experimentos 3 e 4 foram estudadas as relações do teste hiposmótico com os aspectos físicos e morfológicos do sêmen, e testes complementares em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore. No sêmen *in natura* foi feita a avaliação física e morfológica, a coloração supravital e o teste hiposmótico. Nas amostras congeladas/descongeladas, foram realizados os testes hiposmótico, coloração supravital, teste de termoresistência lento e a coloração fluorescente. No experimento 3 foram utilizados trinta ejaculados de seis touros adultos da raça Nelore. Foram utilizadas soluções com osmolaridades de 60, 100, 150 mOsm/kg e água destilada (19 mOsm/kg) com 15, 30 e 60 minutos de período de incubação a 37 °C no teste hiposmótico. Apenas a água destilada apresentou diferença em relação aos valores médios obtidos no teste hiposmótico realizado no sêmen *in natura* ($P < 0,05$). Não houve diferença entre os valores médios de espermatozoides reativos incubados com diferentes tempos de incubação, tanto no sêmen *in natura* como no congelado/descongelado ($P > 0,05$). No experimento 4, foram utilizados 15 ejaculados de 3 touros adultos da raça Nelore. Foram utilizados 10, 20, 50 e 100 μ L de sêmen em 1mL de solução hiposmótica. Não houve diferença entre os valores médios de espermatozoides reativos nas diferentes concentrações de sêmen no teste hiposmótico ($P > 0,05$). Nenhum teste de integridade de membrana plasmática dos espermatozoides foi capaz de classificar os touros quanto à sua congelabilidade do sêmen nos experimentos 3 e 4. O teste hiposmótico correlacionou-se com as principais características de qualidade seminal e com os valores obtidos nos testes complementares ($P < 0,05$). No experimento 3, concluímos que o teste hiposmótico pode ser realizado com 15 minutos de período de incubação e uma

solução hiposmótica entre 60 e 150 mOsm/kg, tanto em sêmen *in natura* como em congelado/descongelado. De acordo com os resultados do experimento 4, o teste hiposmótico pode ser realizado com 20 a 100µL em sêmen *in natura*, e 10 a 100 µL de sêmen congelado/descongelado em 1mL de solução hiposmótica, sem interferir em seus resultados, mas preferencialmente deve-se optar por 100µL, tanto para sêmen *in natura* como congelado/descongelado, porque melhora a leitura das lâminas. De acordo com os resultados deste trabalho o teste hipósmótico não pode ser utilizado para prever o potencial reprodutivo de touros da raça Nelore. Mas, o teste hiposmótico avalia outro aspecto da membrana plasmática dos espermatozoides e possui relações com os principais aspectos da qualidade seminal e outros testes complementares, por isso deve ser empregado para uma melhor compreensão dos seus resultados. A análise proteômica do plasma seminal em associação à avaliação andrológica pode ser uma ferramenta promissora para prever a aptidão reprodutiva em touros, por meio da identificação de moléculas protéicas no plasma seminal.

ABSTRACT

MARTINS, Leonardo Franco, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2009. **Complemental tests in semen and evaluation of the anionic proteins and peptides differentially synthesized in seminal plasma of Nelore bulls classified as sound and unsound for breeding.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Eduardo Paulino da Costa and Maria Cristina Baracat Pereira.

The main analyses performed routinely to assess the sperm quality are the spermatic motility and morphology for the measurement bull's fertility. Several complementary techniques are used to improve bull's fertility evaluation. Each technique is related to different aspects of sperm quality and their results are not yet fully understood. Four experiments were done. Experiment 1 was to study the relationship between the physical and morphological semen aspects with the hiposmotic test in fresh semen of young and adult bulls. Six hundred and twenty-six Nelore bulls were used, 420 young and 206 adults. Young bulls were 18 to 22 months and adult bulls were 3 to 10 years, they were subject to andrological examination. After vesicular glands palpation and testicular measurements semen was collected by eletroejaculation method. After physical and morphological semen examination hiposmotic test was done. After the breeding soundness examination, 83% of young bulls and 94% of adults bulls were classified as sound for breeding. There was no difference between the average scrotal circumference of bulls classified as sound and unsound for breeding ($P>0.05$). There was difference between all semen physical and morphological aspects of bulls classified as sound and unsound for breeding ($P>0.05$), but there was no difference in hiposmotic test results ($P>0.05$). According to these results, the hiposmotic test can not be used alone to predict the reproductive potential of young and adult Nelore bulls, because there was no difference between the hiposmotic test results ($P>0.05$) and no relationship with the main quality semen aspects. The end point of experiment 3 was to identify proteins differentially expressed in seminal plasma of adult bulls and young Nelore bulls classified as sound and unsound for breeding. After the breeding soundness examination, the young bulls were classified as sound (117) and unsound for breeding (49) for breeding, and adults bulls (56) as sound for breeding. Samples of seminal plasma, conserved in straws under -196°C , were thawed at ambient temperature to be done proteomic analysis. MDLC was performed *offline*, the first dimension was cation exchange chromatography and the second was reverse phase. Six fractions eluted in equilibrium conditions were collected in (pH 7.0) in cation exchange chromatography, which represent the fractions of peptides and proteins with anionic and neutral character. The fractions corresponding to peaks in the eluates reverse-phase chromatography were analyzed in a mass spectrometre for

determination of protein molecular weight. Were selected and analyzed 96 eluates collected in reverse-phase chromatography for mass spectrometry with protein synthesis difference between the treatments. Eighteen molecular weights were identified by mass spectrometry (4233-13560 Da). The 12910 Da protein, with molecular mass and similar characteristics of aSFP (*acidic seminal fluid protein*), was obtained in higher concentration in adult bulls, followed by the young bulls classified as sound for breeding and unsound consecutively. The chromatographic protein profiles were different among groups, suggesting that anionic proteins can be studied in order to identify protein markers of reproductive potential of Nelore bulls, by the seminal plasma proteomic analysis. In experiments 3 and 4 were studied the relationship between the hiposmotic test with the physical and morphological semen aspects and complementary tests in fresh and frozen/thawed semen of adult Nelore bulls. In fresh semen were done physical and morphological evaluation, supravital staining and hiposmotic test. In frozen/thawed semen were done hiposmotic test, supravital staining, slow thermoresistance test and fluorescent stain. In experiment 3 were used 30 ejaculates from 6 adult Nelore bulls. It were used solutions with osmolalities of 60, 100, 150 mOsm/kg and distilled water (19 mOsm/kg) with 15, 30 and 60 minutes of incubation time at 37 ° C, in hiposmotic test. Only distilled water was different in relation to average values obtained in the hiposmotic test realized on fresh semen ($P < 0.05$). There was no difference between the mean values of reactive spermatozoa incubated with different incubation time in both fresh and frozen/thawed semen ($P > 0.05$). In Experiment 4 were used 15 ejaculates from 3 adult Nelore bulls. It was used 10, 20, 50, 100 μ L of semen in 1 ml of hiposmotic solution. There was no difference between the mean values of reactive spermatozoa in different concentrations of semen in hiposmotic test ($P > 0.05$). None of spermatozoa plasma membrane integrity test was able to classified adult Nelore bulls according to their semen freezability in experiments 3 and 4. The hiposmotic test correlated with the main characteristics of semen quality and the complementary tests semen results ($P < 0.05$). In Experiment 3 we concluded that the hiposmotic test can be accomplished with 15 minutes of incubation time and a hiposmotic solution between 60 and 150 mOsm/kg in both fresh and frozen/thawed semen. According to the results of experiment 4, the hiposmotic test can be accomplished with 20 to 100 μ L in fresh semen, and 10 to 100 μ L of frozen/thawed semen in 1 ml of hiposmotic solution, without interfering with their results, but it should be choose 100 μ L for both fresh and frozen/thawed semen, because it improves the slides reading. According to the results of this work the hiposmotic test can not be used to predict the reproductive potential of Nelore bulls. But, because it evaluate another aspect of the spermatozoa plasma membrane and its relationships with main aspects of semen quality and others complementary tests, hiposmotic test should be studied to better

understand its result. Proteomic analysis in association with breeding soundness evaluation may be a promising tool to predict bull reproductive potential, by identification of protein molecules in seminal plasma.

INTRODUÇÃO GERAL

As principais análises realizadas para avaliar a qualidade seminal são a motilidade espermática progressiva retilínea e morfologia espermática para a mensuração da fertilidade de touros. No entanto, apesar da avaliação destes parâmetros viabilizarem a definição de critérios mínimos para seleção e utilização de reprodutores, eles não são bons para predizer o potencial reprodutivo de touros, porque não levam em conta a integridade da membrana plasmática e o metabolismo espermático. Diversas técnicas complementares são utilizadas para melhorar a avaliação da fertilidade de touros, tais como: teste de termo-resistência, teste de reação acrossomática, percentagem de acrossomas alterados, penetração de espermatozóides no muco cervical, teste de adesão dos espermatozóides a zona pelúcida de oócitos bovinos, técnicas de coloração, dentre outras. Cada técnica está relacionada com diferentes aspectos da qualidade seminal, e seus resultados ainda não são totalmente compreendidos. A avaliação isolada de apenas um desses aspectos não é eficaz em predizer a fertilidade de machos. Isto se deve em parte, ao fato da fertilização ser um processo complexo, envolvendo inúmeros fatores (Rodriguez-Martinez, 2005).

Os espermatozóides são células complexas em que a capacidade fecundante está relacionada não só com aspectos físicos e morfológicos do ejaculado, mas também com aspectos bioquímicos do sêmen. A análise proteômica do plasma seminal é importante para identificar proteínas envolvidas no processo de fertilização, mas também pode ser utilizada como ferramenta para predizer o potencial reprodutivo de bovinos (Killian et al., 1993; Bellin et al., 1996; Moura et al., 2007). As visualizações de moléculas com baixas massas moleculares e em baixas concentrações é um limitante da análise proteômica por eletroforese bidimensional. Estas limitações têm sido superadas pela utilização de técnicas cromatográficas. A combinação de diferentes e independentes dimensões de separação, por meio da cromatografia líquida multidimensional (MDLC), tem sido bastante utilizada nas análises proteômicas recentes. A espectrometria de massa associada a métodos de separação de proteínas é uma poderosa ferramenta no estudo de moléculas protéicas nos diversos campos da biologia molecular e celular. A capacidade dessas tecnologias utilizadas conjuntamente em identificar e quantificar proteínas em soluções orgânicas complexas mudará significativamente o entendimento sobre os mecanismos bioquímicos celulares (Aebersold e Mann, 2003). A teoria atualmente aceita para a fusão dos gametas deverá ser melhor compreendida no futuro, devido os grandes avanços nos estudos das moléculas protéicas envolvidas na fertilização (Gadella, 2008).

A utilização conjunta de técnicas de rotina e o desenvolvimento de técnicas complementares para a avaliação andrológica será uma importante ferramenta para avaliar os melhores animais, detectar animais subfértéis e melhorar estratégias de conservação espermática. Este estudo teve como finalidade contribuir com o entendimento da relação dos aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos do sêmen de touros da raça Nelore.

REVISÃO DE LITERATURA

Testes complementares em sêmen bovino

O principal propósito dos testes complementares é de determinar o potencial de fertilização de uma amostra de sêmen (*in natura*, resfriado ou congelado) usando um rápido e barato procedimento. Mas os resultados são inconsistentes quando se compara com as taxas de fertilidade (Den Daas, 1992; Rodriguez-Martinez, 2003; Siqueira et al., 2007). Siqueira et al. (2007) encontraram correlações baixas e positivas dos resultados do teste hiposmótico e a taxa de prenhez (0,23), e dos resultados do teste de termoresistência com a taxa de fertilidade (0,13). A motilidade após o descongelamento se correlacionou negativamente com a taxa de fertilidade (-0,22). Razões para isso se devem em parte das dificuldades em mensurar a fertilidade em condições a campo, a complexidade dos atributos dos espermatozoides para a fertilização e imprecisão nas mensurações dos testes utilizados. Isto pode ser observado quando verificamos modestas correlações com resultados *in vitro* com resultados a campo de reprodutores e amostras criopreservadas (Rodriguez-Martinez, 2003). Rodriguez-Martinez (2003) em artigo de revisão conclui que os testes complementares em sêmen devem ser interpretados como valores prognósticos e devem ter objetividade, repetibilidade e acurácia. A objetividade em escolher um atributo do espermatozoide realmente relevante para o potencial fecundante do espermatozoide e/ou para o caso clínico reprodutivo em questão. A repetibilidade pode ser um problema, por exemplo, quando não são observados resultados semelhantes durante a microscopia de epifluorescência para a análise da integridade física da membrana plasmática dos espermatozoides. E finalmente a acurácia que é o maior problema a ser resolvido, por diferentes razões. A capacidade fecundante dos espermatozoides está relacionada com diversos fatores, que não podem ser mensurados em um único teste *in vitro*, e o ejaculado é composto de diversas populações heterogêneas, oriundas de várias ondas espermatogênicas, com diferentes atributos celulares de qualidade (Rodriguez-Martinez, 2006).

A utilização de testes complementares em sêmen é importante para a indústria da inseminação artificial. Não é possível mensurar o verdadeiro potencial de fertilização das amostras, mas a identificação de amostras de baixa qualidade para a comercialização é possível atualmente (Mocé e Graham, 2008; Rodriguez-Martinez, 2006). Estimar a fertilidade de amostras de sêmen ou reprodutores por um simples exame é difícil, visto correlações variáveis de resultados de testes complementares com a fertilidade. A principal razão é o fato que o ejaculado e as amostras de sêmen congelado não são suspensões homogêneas de espermatozoides. Os espermatozoides não apresentam a mesma morfologia, padrão de motilidade, qualidade nuclear e de membrana plasmática. O ejaculado é um acumulado de várias populações de espermatozoides, produto de diferentes ondas espermiáticas do testículo que maturaram durante o trânsito epididimário e foram armazenadas na cauda do epidídimo (Rodriguez-Martinez, 2006). Recentemente, Muiño et al. (2008) demonstraram que existem 4 subpopulações de espermatozoides (classificados quanto ao padrão de motilidade analisada com computador) no sêmen *in natura* e congelado, a criopreservação altera a frequência dessas populações, e que existem diferenças entre touros e ejaculados quanto a essas mudanças sofridas durante a criopreservação.

Os testes que avaliam a membrana plasmática dos espermatozoides avaliam a integridade física da membrana plasmática e a integridade bioquímica. Colorações com eosina/nigrosina e trypan-blue, também chamadas de colorações vitais, tem sido por décadas utilizadas para a avaliação da integridade física das membranas dos espermatozoides. Recentemente a coloração fluorescente tem sido desenvolvida para a avaliação da integridade física da membrana plasmática. O iodeto de propídeo tem alta afinidade pelo DNA (corando o núcleo de vermelho) e só penetra em células com danos na membrana plasmática. O diacetato de carboxifluoresceína é permeável e é de-esterificado dentro da célula por esterases citoplasmáticas, resultando em carboxifluoresceína livre que em uma célula com membrana plasmática intacta causa a fluorescência verde através da luz ultra violeta na microscopia de epifluorescência (Harrison e Vickers, 1990). A microscopia de epifluorescência é mais específica e sensível que a microscopia óptica (colorações vitais), detectando um maior número de espermatozoides com danos na membrana plasmática (Brito et al., 2003).

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática, e consiste no aumento de volume celular dos espermatozoides expostos a uma solução hiposmótica, associada a uma expansão da membrana plasmática e conseqüente alteração das estruturas utilizadas para a movimentação dos espermatozoides, forçando o flagelo a curvar-se nos espermatozoides com a membrana intacta, ou permanecem aparentemente normais em microscopia óptica nos espermatozoides com danos na membrana plasmática (Drevius, 1972). Os processos de capacitação, reação do

acrossoma e fertilização necessitam de uma membrana bioquimicamente ativa (Fraser et. al., 2005), e o teste hiposmótico avalia a atividade bioquímica da membrana intacta devido ao influxo de água para o interior das células (Correa e Zavos, 1995). Relações altas entre o teste hiposmótico e a fertilidade de amostras de sêmen bovino congeladas foram verificadas em programas de inseminação artificial (Revell e Mrode, 1994; Correa et al., 1997b; Bacinoglu et al., 2008). Nagy (2000) realizou com sucesso o teste hiposmótico em sêmen de humanos com necrozoospermia para a identificação dos espermatozoides viáveis para a injeção intracitoplasmática do espermatozoide no oócito. Smikle e Turek (1997) comentaram a vantagem do procedimento não ser tóxico para a célula como os corantes vitais, por exemplo, a eosina-nigrosina.

O teste de termo-resistência lento consiste na sujeição da amostra ao banho-maria a 38°C por determinado período, para posteriormente ser analisada a motilidade retilínea progressiva e o vigor espermático. As amostras criopreservadas devem apresentar no mínimo 30% de motilidade retilínea progressiva e 3 de vigor ao descongelamento e 15% de motilidade retilínea progressiva e vigor 2 após as 5 horas de incubação, para ser considerada adequada para uso em programas de inseminação artificial, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. A comercialização de sêmen congelado no Brasil é feita segundo as normas de sanidade publicada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, portaria nº 005/1996 (CBRA, 1998). Recentemente Vianna et al. (2009) utilizando 64 ejaculados de 39 touros da raça Nelore em um programa de inseminação artificial comparou amostras classificadas como de altas e baixas congelabilidade (utilizando o teste de termoresistência lento e análise computadorizada de motilidade espermática para a classificação) e não observaram diferenças nas taxas de gestação. Os autores concluem que o teste de termo-resistência não mimetiza as condições uterinas e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da vaca, e não pode ser utilizado para prever a fertilidade das amostras de sêmen, visto a grande influência de várias substâncias presentes no trato genital da vaca que possuem papel fundamental no metabolismo e sobrevivência dos espermatozoides até o momento da fertilização.

Proteínas do plasma seminal envolvidas na capacitação espermática e fertilização

O plasma seminal é um fluido bioquimicamente complexo, formado pelas secreções dos testículos, epidídimos, ductos deferentes, ampolas, glândulas vesiculares, próstata e bulbouretrais. Ele é constituído de proteínas, carboidratos, lipídeos, sais minerais, e vitaminas, e tem a função de veículo dos espermatozoides no momento da ejaculação, disponibilizando substratos metabolizáveis e proteção no trato genital feminino. Durante o evento da fertilização, várias proteínas encontradas no plasma

seminal atuam em interações bioquímicas altamente reguladas, tais como: ligação de proteínas seminais na superfície dos espermatozoides durante a ejaculação, formação de reservatórios espermáticos no trato genital da fêmea, capacitação espermática, reconhecimento dos gametas, reação acrossômica, penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão dos gametas (Muiño-Blanco et al., 2008). Entretanto, os mecanismos moleculares de ação destes polipeptídeos ainda não foram elucidados, uma vez que poucas proteínas foram realmente identificadas e caracterizadas (Gadela, 2008).

Os espermatozoides oriundos dos testículos não possuem motilidade e capacidade fecundante, pois irão adquirir durante o trânsito epididimário, sob controle de andrógenos. Durante a maturação epididimária, o espermatozoide é banhado em diferentes e sucessivos ambientes bioquímicos que são específicos para cada região do epidídimo. As regiões anatômicas do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) absorvem as proteínas e as secretam diferentemente, tendo uma composição bioquímica diferente entre si (Hafez, 2004). Durante a maturação do espermatozoide ocorrem mudanças na membrana plasmática, com a segregação de certas proteínas e lipídeos para domínios na membrana plasmática. Mudanças na composição lipídica, perda ou modificações (glicosilação, proteólise e relocação) de proteínas (oriundas do testículo) e a incorporação de novas proteínas. As proteínas adsorvidas às membranas podem ser modificadas por diferentes processos, e um deles é a clivagem proteolítica de proteínas pré-existentes, resultando na distribuição de novas proteínas (ou subunidades) nos diferentes domínios de membrana ou formando o conteúdo protéico do fluido epididimário (Dacheux et al, 2009). Outro mecanismo é a adição de proteínas que foram secretadas pelo epitélio epididimária e liberados no lúmen dos túbulos. O fluido epididimário é composto de fluido testicular somente na cabeça do epidídimo, devido a sua ação de reabsorção intensa e secreção e atividade proteolítica de proteínas pré-existentes, isto corresponde a 90% de absorção das proteínas testiculares sobrando muito pouco ou quase nada do conteúdo protéico testicular no corpo e na cauda dos epidídimo (Marengo, 2008).

Diversas proteínas dos epidídimos têm sido detectadas por diversas técnicas eletroforéticas e cromatográficas. Aproximadamente 15 a 20 proteínas são 60 a 80% da concentração total de proteínas. As principais identificadas são: lactoferrina, procatelepsina D, beta-N-acetyl-hesominidase, manosidase, galactosidase, CRISP (proteína secretada rica em cisteína), GPX (glutathione peroxidase), PGDS (prostaglandina D2 sintetase) e clusterina. Todas as isoformas da clusterina, uma glicoproteína ácida, representa 30-40% das proteínas secretadas no epidídimo, com função na modulação da apoptose e outras ainda não descritas. A PGDS é a única lipocalina associada à atividade enzimática.

As proteínas da família das lipocalinas consistem em várias proteínas de baixa massa molecular que se ligam e transportam moléculas lipofílicas. A glutathiona peroxidase e a catalase são as principais moléculas contra a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, onde cada vez mais aumenta a proporção entre ácidos graxos insaturados e saturados, durante o trânsito epididimário (Dacheux et al., 2009). Vaisberg et al. (2005) observaram a presença da glutathiona peroxidase ou suas subunidades nos testículos, epidídimos e espermatozóides, mas não no plasma seminal.

As enzimas envolvidas no metabolismo e conjugação com glutathiona promovem proteção contra o estresse oxidativo e degradação proteolítica nos epidídimos (Reyes-Moreno et al., 2002). Algumas proteínas, como por exemplo, a P25b, aldose redutase e o fator inibitório de macrófagos é ancorada a membrana plasmática do espermatozóide durante o trânsito epididimário por meio de estruturas chamadas de epididimossomes, que são vesículas membranosas que transferem proteínas aos diferentes domínios da membrana plasmática dos espermatozóides. A P25b está envolvida na capacidade de adesão à zona pelúcida, a aldose redutase com a detoxificação de compostos tóxicos e o papel do fator inibidor de macrófagos ainda não foi explicado (Frenette et al., 2003). A presença de lipoproteínas nos fluidos epididimários e plasma seminal são parcialmente explicados (Gadella, 2008). Os prostassomes são vesículas similares aos epididimossomes oriundos da próstata, que possuem várias funções no metabolismo espermático, dentre elas, proteção contra o sistema imune da fêmea, melhora da motilidade espermática e a estabilização da membrana plasmática (Saez et al., 2003).

Alterações nas membranas plasmáticas dos espermatozóides ocorrem quando estes entram em contato com o líquido seminal, e durante a migração espermática pelo trato genital feminino. Moléculas adsorvidas pela membrana plasmática, durante a maturação epididimária e ejaculação, estão sujeitas à resistência mecânica e interações eletroquímicas oferecidas por componentes do muco cervical e uterino, possibilitando a capacitação espermática e fecundação do ovócito no trato genital feminino (Rodriguez-Martinez, 2007). Segundo Fraser et al. (2005), o aumento da permeabilidade da membrana a íons desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos, que culminam na hiperativação do flagelo e reação acrossômica (Figura 1). Este evento é pré-requisito para a fecundação, e a reação acrossômica é considerada como etapa final da capacitação espermática (Visconti & Kopf, 1998).

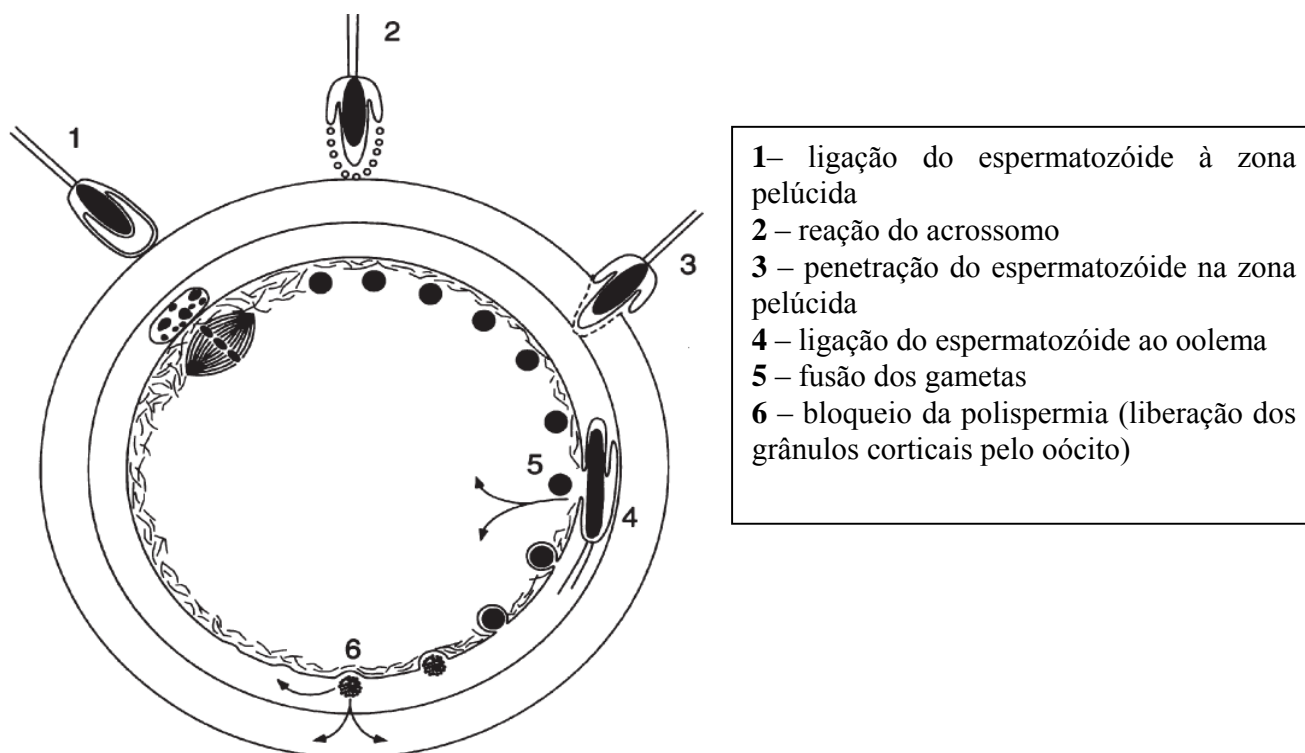


Figura 1. Reação acrossômica e fusão dos gametas (Fonte: Gadela., 2008).

É possível que a capacitação espermática esteja mais envolvida com a remoção de fatores decapacitantes do que a ativação do processo com um estímulo, pois, a diluição de espermatozóides de mamíferos com solução fisiológica e outras soluções isotônicas remove proteínas adsorvidas na membrana plasmática dos espermatozóides, antioxidantes naturais e outras substâncias com função de proteção da integridade da membrana dos espermatozóides (Maxwell & Johnson, 1999). Maxwell e Johnson (1999) verificaram que a remoção de substâncias presentes na membrana plasmática dos espermatozóides, acarretou em aglutinações de cabeça (possivelmente início de fluidez da membrana plasmática), e a adição de plasma seminal previne esta situação. Esses fatores decapacitantes são polipeptídeos originados das secreções dos epidídimos e glândulas anexas, e são adsorvidas à membrana plasmática dos espermatozóides no momento da ejaculação (Fraser, 2008). A aceleração do processo de capacitação espermática após processos de criopreservação (devido a alterações na estrutura e atividade bioquímica da membrana plasmática) é um dos fatores que contribuem para a diminuição da sobrevivência dos espermatozóides no trato genital feminino após o descongelamento e inseminação (Watson, 2000), e a adição de moléculas protéicas específicas nos diluentes para a criopreservação pode ser uma alternativa para contornar este problema (Garner et al., 2001; Prathalingam et al., 2006; de Graaf et al., 2008).

A caracterização de quatro diferentes proteínas no plasma seminal de touros e sua relação com a fertilidade, em programa de inseminação artificial, demonstrou que duas destas moléculas com peso molecular de 26kDa e 55kDa estavam relacionadas a touros de alta fertilidade, enquanto duas moléculas de 16kDa estavam relacionadas a touros de baixa fertilidade (Killian et al., 1993). Jobim et al. (2004) também utilizando a eletroforese bidimensional identificaram 4 proteínas (acidic proteins of bovine seminal fluid-aSFP; clusterina; 15-16 kDa e pI 4,7-5,2; 13-14 kDa e pI 4-4,5) em plasma seminal de touros com boa congelabilidade, e uma proteína (25-26 kDa, pI 6-6,5) em plasma de touros com baixa congelabilidade do sêmen. Outros estudos corroboram as observações que existe efeito benéfico do fluido das glândulas sexuais acessórias de touros de alta fertilidade em detrimento aos touros de baixa fertilidade, quando foram avaliados *in vitro* pelo método de adesão à zona pelúcida em oócitos bovinos (Henault et al., 1995).

As proteínas são caracterizadas quanto à massa molecular, forma, afinidade de ligação, carga elétrica, etc. Técnicas de eletroforese são utilizadas para identificação das proteínas quanto ao seu peso molecular, ponto isoelétrico, e utilizadas em conjunto com imunofluorescência e radioimunensaio para a identificação e caracterização dos locais de produção no trato reprodutor masculino, atividade biológica e importância na fertilidade dos animais (Killian et al., 1993). As principais proteínas do plasma seminal de bovinos são da família das proteínas ácidas, chamadas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3(15-16kDa) e BSP-30-kDa, secretadas pelas glândulas vesiculares e adsorvidas na membrana plasmática durante a ejaculação (Gwathmey et al., 2006). Estas glicoproteínas interagem com os fosfolípidos com radical colina da membrana plasmática dos espermatozoides, prevenindo as alterações dos lipídeos de membrana plasmática que ocorrem durante a capacitação espermática. Acredita-se que as lipoproteínas de alta densidade (HDL), heparina e a albumina sérica bovina (substâncias presentes no muco uterino na ocasião do estro) tenham papel na remoção do colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides, e que a remoção deste esteróide esteja ligada à alteração da fluidez e permeabilidade da membrana durante a capacitação (Cross, 1998; Manjunath e Thérien, 2002; Cuneo et al., 2004) (Figura 2). Gwathmey et al. (2006) demonstraram *in vitro* que as proteínas da família das proteínas ácidas (BSP's) também estão relacionadas com a manutenção da motilidade espermática durante a fase de armazenamento na tuba uterina. Outra função das principais proteínas do plasma seminal de bovinos (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30-kDa) é a de ligação com hormônios peptídeos de crescimento celular, importantes no desenvolvimento e maturação dos espermatozoides, como os IGFs I e II (insulin-like growth factor I e II), (Desnoyers e Manjunath, 1994). Hoeflich et al. (1999) analisando a concentração de IGFs e suas proteínas ligadoras em plasma seminal de touros da

raça simental em uma central de inseminação, não encontraram diferenças entre os animais em relação a congelabilidade do sêmen e fertilidade à campo.

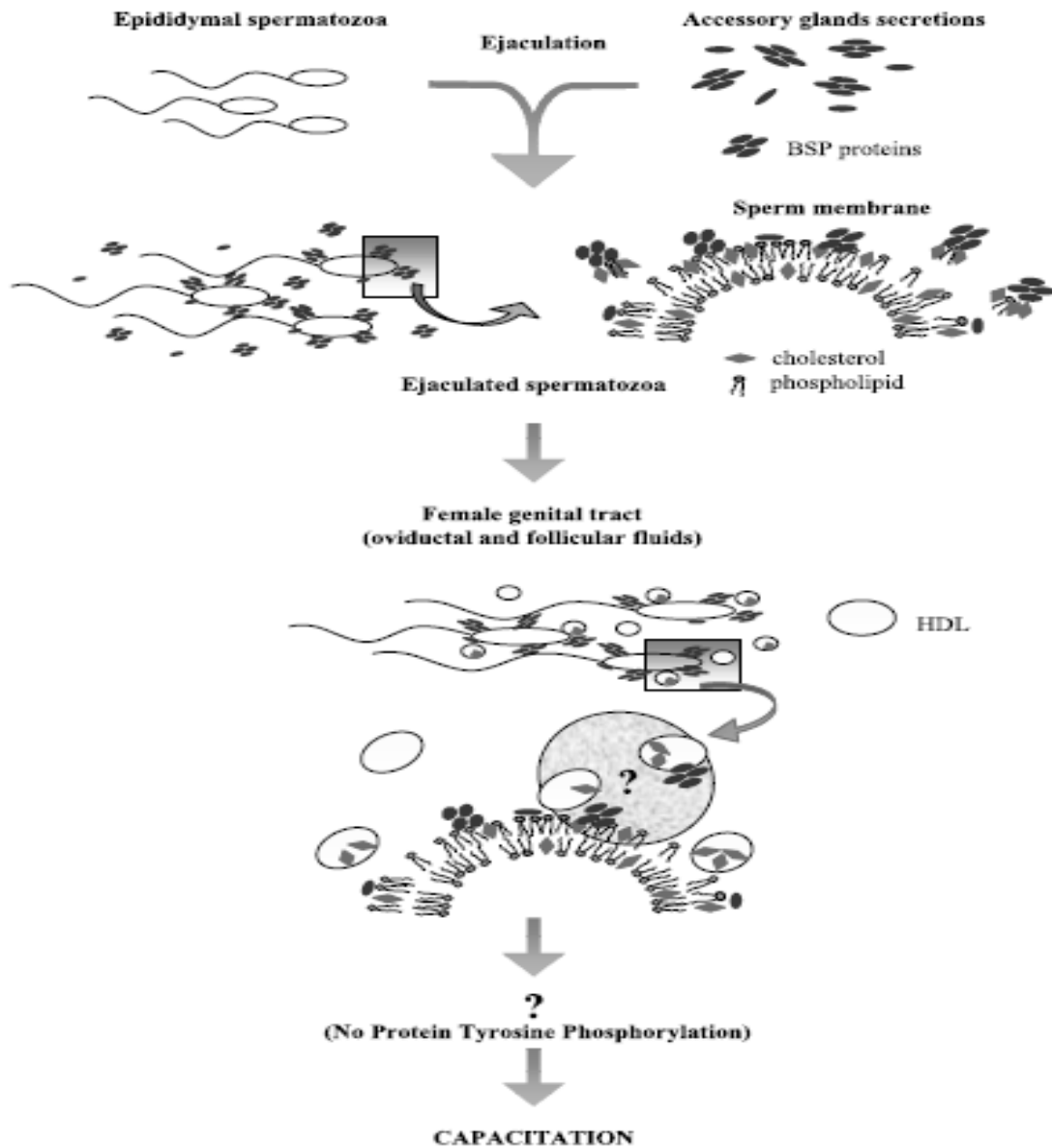


Figura 2. Mecanismo de atuação das BSP's na capacitação espermática (Fonte : Manjunath e Thérien, 2002).

O contato dos espermatozoides com lipoproteínas de alta densidade, muco uterino, possivelmente forma um complexo com os fosfolídeos da membrana plasmática, colesterol, proteínas adsorvidas, e lipoproteínas de alta densidade (Therrien et al., 1999), alterando a permeabilidade da membrana plasmática permitindo que o íon cálcio entre e ative a fosfolipase A₂, sendo esta enzima importante na capacitação espermática (Manjunath et al., 1994). As fosfolipases A₂ são enzimas

dependentes do íon cálcio, que atuam desestabilizando a membrana plasmática dos espermatozóides, assim aumentando a permeabilidade a íons pela membrana plasmática e promovendo a capacitação espermática.

Foi demonstrado que alguns glicosaminoglicanos que estão presentes no muco uterino induzem a capacitação espermática. A heparina liga-se à membrana plasmática dos espermatozóides por meio de proteínas ligadoras de heparina (baixo peso molecular), potencializando seus efeitos por aumentar os locais de atuação na membrana plasmática (Cuneo et al., 2004). Segundo Manjunath et al. (2002) a heparina promove a capacitação pela ligação e remoção de proteínas do plasma seminal, que estão adsorvidas pela membrana plasmática do espermatozóide e possuem a função de inibir a capacitação. Estas proteínas são produzidas na próstata, glândulas bulbouretrais, glândulas vesiculares seminais e ampolas, e adsorvidas na membrana plasmática no momento da ejaculação. Segundo Bellin et al. (1996) essas proteínas são indicativas do potencial reprodutivo de touros. Moura et al. (2006) estudando o perfil protéico da secreção das glândulas acessórias de 37 touros holandeses em uma central de inseminação artificial, verificaram que quatro proteínas (BSP 30 kDa, osteopoetina, fosfolipase A₂ e espermadesina Z13) estavam relacionadas com a fertilidade. A osteopoetina possui função na interação espermatozóide e oócito, sendo relacionada a touros com baixos índices de retorno ao cio em programas de inseminação artificial (Moura, 2005). Posteriormente, Moura et al. (2007) empregando a mesma técnica de separação dos fluidos das glândulas acessórias e espermatozóides da cauda dos epidídimos, identificaram mais uma proteína chamada de nucleobindina também encontrada nos ossos, mas a sua função no metabolismo dos espermatozóides e fertilização ainda é desconhecida. Diversas pesquisas no mundo foram realizadas para a identificação e entendimento do papel biológico das moléculas protéicas no plasma seminal de bovinos (Figura 3), mas ainda é o início visto o grande número de proteínas e seus complexos mecanismos de inibição e ativação da motilidade, capacitação espermática e fertilização.

O plasma seminal bovino apresenta várias proteínas com atividade de imunossupressão de linfócitos bovinos *in vitro* (Fahmi et al., 1985a; Fahmi et al., 1985b), visto que o sêmen é potencialmente antigênico no interior do trato reprodutivo da fêmea (Fahmi et al., 1985a). Ainda com a função de proteger os espermatozóides no trato genital feminino, proteínas com ação antimicrobiana são secretadas pelas glândulas anexas em bovinos (Sinsinthy et al., 1984). Shoneck et al. (1996) identificaram uma proteína de peso molecular de 12,9kDa (aSFP-acidic seminal fluid protein), secretada pelas glândulas vesiculares e pelas ampolas dos ductos deferentes de bovinos, a qual suprime a motilidade espermática e protege os espermatozóides contra a peroxidação dos lipídeos durante o

armazenamento nas ampolas dos ductos deferentes. Segundo Jobim et (2004) esta proteína pode ser utilizada como um marcador no plasma seminal de touros com bons resultados de congelamento de sêmen.

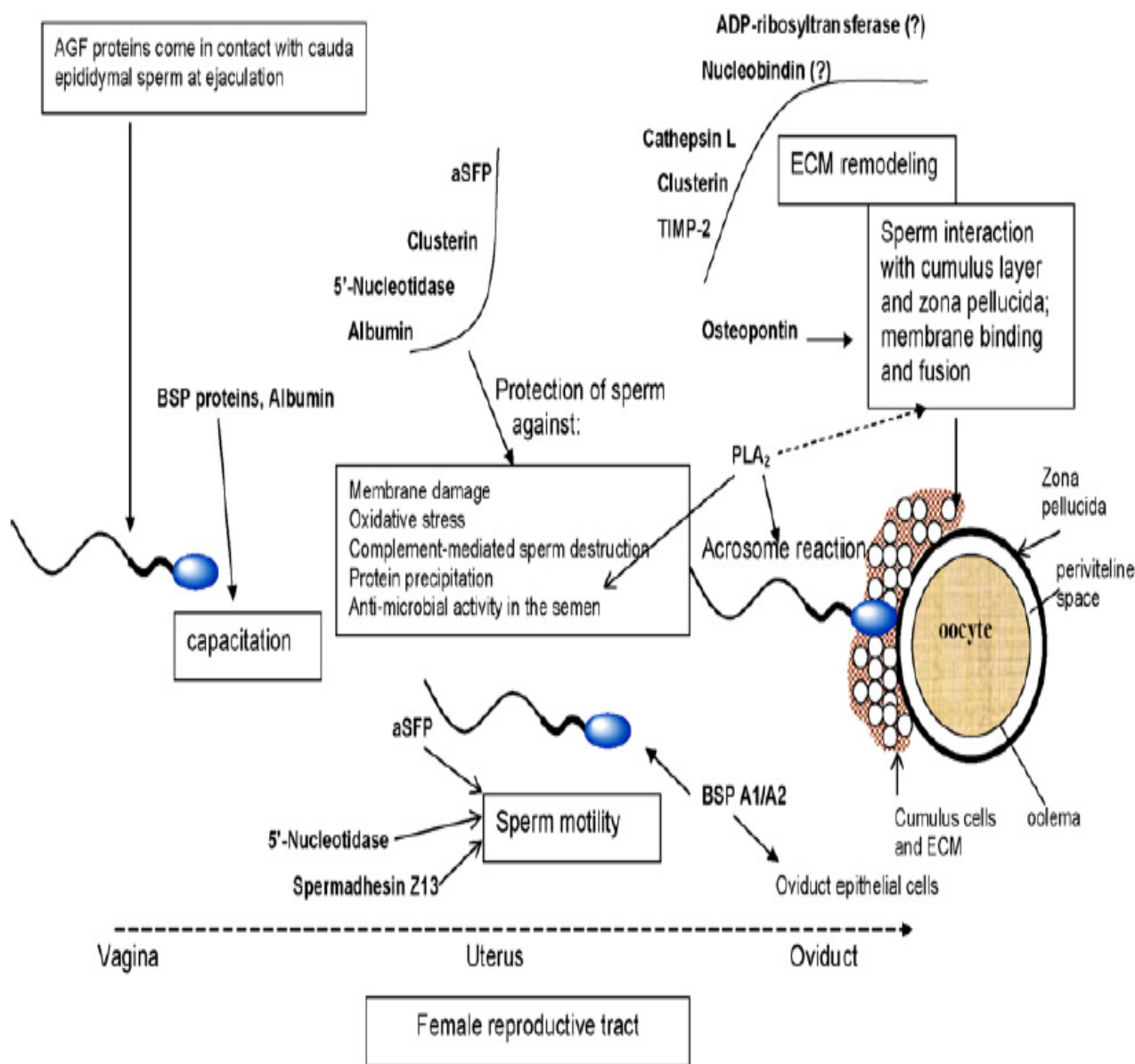


Figura 3. Diagrama esquemático dos aspectos do metabolismo espermático e fertilização que são potencialmente influenciados por moléculas proteicas encontradas no plasma seminal (Fonte: Moura et al., 2007).

Diversas enzimas estão sendo estudadas em plasma seminal de bovinos, para se entender a complexa interação entre enzimas, cofatores e inibidores enzimáticos que regulam o metabolismo

espermático. Matousek e Klaudy (1998) não encontraram diferença na concentração de ribonucleases no plasma seminal de touros de alta fertilidade, comparados com os de baixa fertilidade, mas concluíram que essas enzimas são sintetizadas nas ampolas e glândulas vesiculares de bovinos. As atividades enzimáticas das transaminases (Glutamato Oxaloacetato Transaminase e Glutamato Piruvato Transaminase) no plasma seminal estão relacionadas com o grau de injúria celular dos espermatozóides, visto que em condições adversas os espermatozóides liberam essas enzimas para o ambiente extracelular (Tuli e Holtz, 1994). Existe uma relação entre níveis altos de atividade destas enzimas e anormalidades espermáticas, em touros (Pangawkar et al., 1988). As enzimas arylsulfatases (AS-A,-B e -C) são enzimas que removem os grupos sulfatos de vários glicoconjugados e moléculas de colesterol que participam da estabilização da membrana plasmática dos espermatozóides (Gadella et al, 1991).

A análise proteômica do plasma seminal é importante para o conhecimento do processo de fertilização, mas também pode ser utilizada como ferramenta para predizer o potencial reprodutivo de bovinos (Killian et al., 1993; Bellin et al., 1996; Moura et. al., 2007). A utilização de técnicas de separação de proteínas como a eletroforese bidimensional e a cromatografia líquida multidimensional têm sido bastante utilizadas nas análises proteômicas em plasma seminal. Ao se utilizar metodologias de identificação de moléculas protéicas, como a espectrometria de massa, associada a técnicas de separação de proteínas é uma poderosa ferramenta no estudo de moléculas protéicas nos diversos campos da biologia molecular e celular. A capacidade dessas tecnologias utilizadas conjuntamente em identificar e quantificar proteínas em soluções orgânicas complexas mudará significativamente o entendimento sobre os mecanismos bioquímicos celulares (Aebersold e Mann, 2003). A teoria atualmente aceita para a fusão dos gametas deverá ser modificado no futuro, devido aos grandes avanços nos estudos das moléculas protéicas envolvidas na fertilização (Gadella, 2008).

A utilização conjunta de técnicas de rotina e o desenvolvimento de técnicas complementares para a avaliação andrológica será uma importante ferramenta para avaliar os melhores animais, detectar animais subfértéis e melhorar estratégias de conservação espermática. O entendimento do papel biológico destas moléculas protéicas será de grande importância no desenvolvimento das biotecnologias da reprodução em bovinos (criopreservação de gametas, inseminação artificial e produção de embriões) e novos testes complementares em sêmen para uma melhor avaliação de touros em regime de cobertura natural ou programas de inseminação artificial.

OBJETIVOS

1 – Estudar as relações entre aspectos físicos e morfológicos do sêmen com o teste hiposmótico em sêmen *in natura* de touros jovens e adultos da raça Nelore.

2 – Estudar as diferentes osmolaridades, tempos de incubação e concentração de sêmen do teste hiposmótico, e suas relações com a qualidade e congelabilidade do sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.

3 – Identificar proteínas e peptídeos diferencialmente sintetizados em plasma seminal de touros jovens e adultos da raça Nelore, classificados em aptos e inaptos à reprodução.

HIPÓTESES

1 – A integridade funcional da membrana plasmática analisada pelo teste hiposmótico em sêmen *in natura* tem relação com a qualidade seminal de touros jovens e adultos da raça Nelore.

2 – O teste hiposmótico pode ser realizado com menos tempo de incubação, uma gama maior de soluções hiposmótica e uma maior concentração de sêmen.

3 – O teste hiposmótico e a coloração fluorescente podem ser utilizados para prever a qualidade do sêmen congelado/descongelado de touros.

4 – A análise proteômica do plasma seminal de touros jovens e adultos da raça Nelore pode ser utilizada como ferramenta complementar para prever a aptidão reprodutiva e o desempenho reprodutivo em condições extensivas de criação.

CAPÍTULO 1

TESTE HIPOSMÓTICO EM SÊMEN E PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS DA RAÇA NELORE

EXPERIMENTO 1: Avaliação física, morfológica e teste hiposmótico em sêmen de touros jovens e adultos da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar as relações entre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen com o teste hiposmótico em sêmen *in natura* de touros jovens e adultos da raça Nelore, criados em condições extensivas. Foram utilizados 626 touros da raça Nelore, sendo 420 touros jovens e 206 touros adultos. Os touros jovens com idades variando de 18 a 22 meses, e os touros adultos com idades variando de 3 a 10 anos, foram submetidos a exame andrológico para a avaliação da aptidão reprodutiva, segundo os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Após a contenção individual dos animais em troncos especiais foram realizadas a palpação das glândulas vesiculares, as mensurações testiculares e a coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação. Após a análise física e morfológica do sêmen foi realizado o teste hiposmótico. Após a classificação andrológica, 83% dos touros jovens e 94% dos touros adultos foram classificados em aptos à reprodução. Não houve diferenças entre as médias das biometrias testiculares e perímetro escrotal dos touros jovens classificados como aptos e inaptos à reprodução ($P > 0,05$). Houve diferenças entre as médias de todos os aspectos físicos e morfológicos do ejaculado de touros inaptos e aptos à reprodução ($P < 0,05$), mas não foram observadas no percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico ($P > 0,05$). Conclui-se que o teste hiposmótico não pode ser utilizado isoladamente para predizer o potencial reprodutivo de touros jovens e adultos da raça Nelore, embora seja um importante teste complementar na avaliação espermática.

Palavras-chave: Teste complementar, Espermograma, *Bos indicus*, estação de monta, Macho

1 - INTRODUÇÃO

O potencial reprodutivo de um touro depende basicamente da gametogênese, das funções epididimárias e de seu desempenho sexual (libido e capacidade de serviço), processos que se iniciam com a puberdade e persistem por toda a vida, até a senescência. Após a fase puberal ocorrem marcadas mudanças quantitativa e qualitativa da produção espermática que posteriormente se estabilizam com a maturidade sexual do touro. Observa-se neste período, o aumento do volume seminal, da motilidade espermática progressiva, do vigor, da concentração espermática total e o decréscimo das patologias espermáticas (Evans et al., 1995). A associação entre motilidade e morfologia espermática, em tourinhos com bom desenvolvimento testicular e libido normais, estão entre os principais critérios utilizados como marcadores andrológicos para determinar a maturidade sexual.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para tentar prever a fertilidade dos reprodutores, mas é uma difícil tarefa quando se tem uma grande variação dos ejaculados em relação a viabilidade da célula espermática, sendo um ejaculado não representativo de toda sua vida reprodutiva (Rodriguez-Martinez, 2006). Larsson e Rodriguez-Martinez (2000) defendem a idéia que os diversos testes complementares podem ser utilizados para uma primeira triagem em animais jovens para a detecção de futuros machos doadores de sêmen. Kennedy et al. (2002) utilizando 3648 touros jovens taurinos e zebuínos, demonstraram que a causa mais importante de não aprovação em aptos à reprodução é a baixa qualidade seminal. Chacón et al. (1999) utilizando aproximadamente 2% da população de touros em monta natural da Costa Rica (898 reprodutores zebuínos, taurinos e mestiços), criados em condições extensivas, verificaram que 23,9% considerados inaptos à reprodução eram pela baixa qualidade seminal (aspectos físicos e morfológicos do ejaculado). O teste hiposmótico é barato e de fácil execução e avalia uma característica fundamental nos processos de capacitação espermática, reação do acrossomo e fertilização. Este estudo teve como objetivo avaliar as relações entre os aspectos físicos e morfológicos do ejaculado com o teste hiposmótico em sêmen *in natura* de touros jovens e adultos da raça Nelore, classificados como aptos e inaptos à reprodução.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais, exame andrológico e classificação quanto a aptidão reprodutiva

Foram utilizados 626 animais, sendo 420 touros jovens e 206 touros adultos da raça Nelore. Os touros jovens utilizados das fazendas São Francisco e Cherubim, de propriedade da Agro-Pecuária

CFM Ltda, (municípios de Magda-SP e Américo de Campos-SP, respectivamente) foram submetidos a exame andrológico para a avaliação da aptidão reprodutiva, segundo os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os touros jovens com idades variando de 18 a 22 meses, com bom escore corporal criados em condição de pastagem, predominantemente de capim *Brachiaria decumbens* e colonião, até os 18 meses em média quando então passaram a ser criados em regime de confinamento e alimentados com silagem de milho e sorgo, sal mineral e água *ad libitum*. Os touros adultos, com idades variando de 3 a 10 anos, estavam sendo criados em regime de pastejo, predominantemente de capim *Brachiaria decumbens* e colonião, nas fazendas Lageado e São Francisco, de propriedade da Agro-Pecuária CFM Ltda, localizada no município de Dois Irmãos do Buriti – MS e Magda-SP, respectivamente. Os touros adultos foram submetidos a avaliação andrológica na mesma ocasião que os jovens.

Após a contenção individual dos animais em troncos especiais foram realizadas a palpação das glândulas vesiculares (avaliação de tamanho, simetria, lobulação e consistência para detecção de possíveis alterações) e as mensurações testiculares. O comprimento e a largura testicular foram medidos com o auxílio de um paquímetro. O comprimento foi tomado no sentido longitudinal da gônada (dorso-ventral) incluindo a cabeça e excluindo a cauda do epidídimo. A largura foi tomada na região mais larga da gônada, no sentido latero-medial com referência ao corpo do animal. O perímetro escrotal foi obtido com auxílio de uma fita métrica na região mais larga do escroto após leve tracionamento ventro-caudal das gônadas. Os ejaculados dos animais foram coletados pelo método de eletroejaculação, e submetidos à avaliação física e morfológica, e ao teste hiposmótico.

Após o exame andrológico, os animais foram classificados em aptos e inaptos para à reprodução. Foi utilizada a classificação preconizada pelo CBRA (1998), em que o potencial reprodutivo é predito por meio de valores registrados para as características físicas e morfológicas do sêmen, sendo: para motilidade espermática retilínea progressiva 70%; defeitos espermáticos maiores, inferiores a 15 %; e defeitos espermáticos totais, inferiores a 30 % de anomalias, obtendo-se duas classes de animais: 1 = animais aptos à reprodução e 2 = animais inaptos à reprodução. Os grupos de animais inaptos utilizados foram classificados somente quanto ao seu espermiograma, não sendo utilizado animais considerados inaptos por outro achado clínico reprodutivo, como: assimetria testicular, problemas de casco ou aprumos, baixo perímetro escrotal, vesiculite entre outros.

2.2 - Avaliação física e morfológica do sêmen

A avaliação física do sêmen foi feita analisando os seguintes aspectos: o volume, o turbilhonamento, a motilidade espermática retilínea progressiva (0-100%) e o vigor espermático (0-5). Uma gota de sêmen (10 μ L) foi colocada sobre uma lâmina previamente aquecida a 38°C e com aumento de 20X foi avaliado o turbilhonamento (o movimento de massa dos espermatozóides, variando de 0-5). A motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático foram avaliados com a deposição de 10 μ L de sêmen em uma lâmina e coberta por uma lamínula também previamente aquecida a 38°C, e feita a observação em aumento de 400X em microscopia óptica (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 1998).

Em um tubo contendo 1 mL de solução formol-salina tamponada (Hancoch, 1957) foi acondicionada uma alíquota do ejaculado suficiente para turvar a solução, para a análise morfológica dos espermatozóides por meio de preparação úmida e utilização de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000X (sob uma gota de óleo de imersão). Foram contabilizadas 400 células por ejaculado, e os defeitos espermáticos foram mensurados em percentagem segundo os critérios de classificação adotados por Blomm (1973) e preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998).

2.3 - Teste hiposmótico

O teste hiposmótico foi realizado no sêmen dos touros jovens conforme protocolo adotado por Revel e Mrode (1994). O teste consistiu em incubar 10 μ L de sêmen por 1 hora à 37 °C em 1mL de solução hiposmótica (Tabela 1). A solução hiposmótica com 150mOsm/kg teve a seguinte composição: 7,35g de citrato de sódio, 13,51g de frutose em 1 litro de água destilada. O teste hiposmótico em sêmen dos touros adultos foi realizado com uma quantidade de sêmen de 20 a 50 μ L em 1 mL de solução hiposmótica, dependendo do aspecto do sêmen (cremoso, leitoso, opalescente ou aquoso). Depois do período de incubação foram acrescentados 0,5 mL de solução de formol salina para a fixação dos espermatozóides e posteriormente feita a análise em microscopia de contraste de fase. Foram contados 100 espermatozóides em aumento de 1000 X e obtido o percentual de espermatozóides que tiveram seu flagelo curvando-se junto à membrana expandida (Figura 1), para depois ser calculada a percentagem de espermatozóides reativos subtraindo do percentual de defeitos de cauda registrado no sêmen *in natura* (Melo e Henry, 1999).



Figura 1. Espermatozóiide não reativo (A) e os principais tipos de dobramentos de cauda encontrados na realização do teste hiposmótico (B) (Fonte: arquivo pessoal do autor).

2.4 - Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SAEG versão 9.1.(SAEG-UFV, 2007). Análises descritivas quanto as médias, desvios-padrões e coeficientes de variação foram feitas para todas as variáveis estudadas. O teste Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias foi estudada, utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para se detectar as diferenças entre os animais aptos e inaptos à reprodução em relação as características físicas e morfológicas e o teste hiposmótico. As diferenças foram detectadas quando houve efeito pelo teste F (5%). O teste de Kruskal-Wallis (5%) foi realizado para a análise do efeito dos grupos andrológicos para todos os aspectos físicos estudados. Correlações simples de Pearson foram realizadas entre todas as variáveis estudadas.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Touros jovens

Após a classificação andrológica 83% dos touros jovens foram classificados em aptos à reprodução (350) e 17% inaptos (70). Não houve diferenças entre as médias das biometrias testiculares e perímetro escrotal dos aptos e inaptos à reprodução ($P>0,05$; Tabela 1), porque foram utilizados somente touros classificados como inaptos a reprodução com base no seu espermograma, não sendo utilizados animais considerados inaptos por outro achado clínico reprodutivo, como por exemplo, o baixo perímetro escrotal. O perímetro escrotal é um bom indicador da produção espermática diária e está correlacionado geneticamente com a idade à puberdade em machos e fêmeas, e a fertilidade das fêmeas aparentadas a estes machos (Gressler et al., 2000). O perímetro escrotal apresenta alta heritabilidade (Quirino e Bergmann, 1998) e tem mensuração fácil e de baixo custo. A média de perímetro escrotal foi de $33,54 \pm 2,21$ cm, média considerada muito boa para a faixa etária, segundo os critérios preconizados do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), e mais alta que as médias descritas por outros autores para a mesma faixa etária em touros jovens da raça Nelore (Trocóniz et al., 1991; Quirino e Bergmann, 1998; Valentim et al., 2002; Brito et al., 2004; Dias et al., 2007; Salvador et al., 2008). Isto é devido ao programa de melhoramento genético empregado pela empresa, para precocidade sexual, que tem como base o perímetro escrotal e a precocidade sexual das fêmeas aparentadas. Nas últimas décadas, a empresa substituiu a seleção indireta, a partir da medida do perímetro escrotal, e passa a identificar as fêmeas precoces introduzindo no seu programa de seleção uma nova DEP (Diferença Esperada de Progênie) denominada PP14 (probabilidade de prenhez de novilha aos 14 meses de idade). O perímetro escrotal teve um coeficiente de variação muito baixo (6,6), demonstrando ainda mais a uniformidade do plantel utilizado.

Houve diferenças entre as médias de todos os aspectos físicos e morfológicos do sêmen dos ejaculados estudados de touros jovens inaptos e aptos à reprodução ($P<0,05$; Tabela 1). As diferenças entre as médias de motilidade espermática progressiva retilínea, vigor e turbilhonamento de touros jovens aptos e inaptos à reprodução refletem o melhor funcionamento testicular e maturação epididimária, funções dependentes das concentrações de andrógenos nos testículos e epidídimos.

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão do perímetro escrotal, percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica, e aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros jovens da raça Nelore, classificados em aptos e inaptos à reprodução.

Parâmetro	Touros		
	Aptos	Inaptos	Média Total
N	350	70	420
PE (cm)	33,5±2,1 ^A	33,5±2,6 ^A	33,54 ± 2,2
Hipo (%)	43,9±21,1 ^a	43,6±19,3 ^a	43,9±20,8
Motilidade (%)	72 ± 8,6 ^A	55,4 ± 21 ^B	69 ± 13,9
Vigor (0-5)	3 ± 0,34 ^A	2,4 ± 0,6 ^B	2,9 ± 0,46
Turb (0-5)	1,3 ± 1,1 ^A	0,5 ± 0,8 ^B	1,2 ± 1,1
Cauda (%)	3 ± 2,2 ^B	8,4 ± 8,3 ^A	3,9 ± 4,4
Maiores (%)	11,6 ± 4,6 ^b	33,8 ± 18,5 ^a	15,3 ± 11,9
Menores (%)	3,7 ± 1,8 ^b	6,2 ± 4,9 ^a	4,1 ± 2,8
Totais (%)	15,3 ± 5,4 ^b	40,1 ± 20,4 ^a	19,4 ± 13,3

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste F a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. N = número de animais; PE (cm) = perímetro escrotal (cm); Hipo (%) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Motilidade (%) = motilidade espermática progressiva retilínea em percentual; Vigor (0-5) = vigor espermático; Turb (0-5) = turbilhamento ou movimento espermático de massa; Cauda (%) = defeitos de cauda dobrada em percentual; Maiores (%) = defeitos espermáticos maiores em percentual; Menores (%) = defeitos espermáticos menores em percentual; Totais (%) = defeitos espermáticos totais em percentual.

Brito et al. (2004) observaram média de motilidade espermática progressiva retilínea mais baixa (55%) em touros jovens da raça Nelore aptos à reprodução, mas obtiveram médias de percentuais de defeitos espermáticos maiores (16,8%), menores (8,8%) e totais (24,4%) muito semelhantes a este estudo. Dias et al. (2007) observaram médias inferiores em ejaculados de touros da raça Nelore aos 24 meses de idade, de motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático, e médias superiores de defeitos espermáticos maiores e totais, ao presente experimento. Salvador et al. (2008) ao utilizarem 163 touros jovens da raça Nelore com 24 meses aproximadamente, obtiveram médias inferiores de motilidade espermática progressiva retilínea. Ao se analisar somente os 55 touros jovens

da raça Nelore com 24 meses selecionados andrológicamente (Classificação Andrológica por Pontos) para a congelamento de sêmen, observaram 66,6±6% motilidade espermática progressiva retilínea, valor muito semelhante do presente experimento. Além da maior proporção de touros jovens da raça Nelore aptos à reprodução em comparação a outros autores (Trocóniz et al., 1991; Dias et al., 2007), os touros aptos à reprodução apresentaram bons ejaculados quanto aos aspectos físicos do sêmen.

Neste experimento foram observadas diferenças entre as médias do percentual de gotas citoplasmáticas proximais, anomalias acrossomais e cauda dobrada no sêmen de touros jovens aptos e inaptos ($P<0,05$) que foram os principais defeitos espermáticos observados nos touros inaptos. A gota citoplasmática proximal normalmente está associada a reduzido número de espermatozoides móveis, refletindo sinal de maturação espermática imperfeita, embora um processo degenerativo não possa ser excluído (Barth e Oko, 1989). Os percentuais de defeitos de cauda observados na análise morfológica do sêmen foram diferentes entre os grupos ($P<0,05$; Tabela 1) com um coeficiente de variação alto para a característica (112,8). A média dos resultados dos percentuais de defeitos espermáticos maiores dos touros jovens aptos à reprodução foram semelhantes aos valores obtidos por Brito et al. (2004) estudando maturidade sexual em touros jovens da raça Nelore. Dias et al. (2007) utilizando 808 touros jovens da raça Nelore com 24 meses de idade criados sob condições extensivas obtiveram menos que um terço dos touros jovens aprovados no exame andrológico como aptos à reprodução, com percentuais de defeitos maiores e totais no ejaculado superiores ao presente estudo.

Não foram detectadas diferenças entre as médias dos percentuais de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico de touros jovens aptos e inaptos à reprodução ($P>0,05$) (Tabela 1), o coeficiente de variação foi de 47,3 para esta variável. Mas quando se compara o percentual registrado de caudas dobradas na leitura da lâmina do teste hiposmótico sem subtrair do percentual de caudas dobradas observado na análise morfológica do sêmen, é verificada diferença entre os grupos de touros jovens aptos e inaptos à reprodução ($P<0,05$), juntamente com o percentual de caudas dobradas encontrado na análise morfológica do sêmen. O coeficiente de variação alto para percentual de caudas dobradas observado na análise morfológica do sêmen pode ser um limitante para o uso do teste hiposmótico em grande escala, por não conseguir detectar diferenças entre grupos de animais devido a grande variação de um dos valores utilizados no cálculo do teste hiposmótico. Estudos utilizando um número menor de touros adultos, doadores de sêmen em centrais de inseminação obtiveram médias superiores ao presente experimento. Borges (2008) verificou 66% de espermatozoides reativos no teste hiposmótico em sêmen *in natura* e Vera-Munoz et al. (2009) obtiveram média de 68,13 % de espermatozoides

reativos ao teste hiposmótico. O que é explicado pelo melhor funcionamento dos testículos e epidídimos na formação e maturação da membrana plasmática dos espermatozóides de touros adultos.

Outra questão é a maturação da membrana plasmática dos espermatozóides. Lunstra e Echterncamp (1982) observaram diferença entre a percentagem de espermatozóides anormais antes e depois da puberdade, mas não verificaram entre os espermatozóides viáveis no teste supravital. O teste supravital é um indicador de integridade física da membrana do espermatozóide. Ressalta-se que o grupo de touros jovens inaptos à reprodução, com idades variando entre 18 a 22 meses, a maioria dos touros encontravam-se na fase final de puberdade, onde se aproximavam da maturidade seminal e sexual. A sodomia e masturbação é também um fator a ser considerado quando se estuda plantéis de touros jovens nesta faixa etária (Guimarães, 2009 - comunicação pessoal), as frequências desses comportamentos podem influenciar a integridade bioquímica dos espermatozóides alterando o seu trânsito epididimário, não permitindo a sua completa maturação nos epidídimos, por exemplo.

A avaliação andrológica de touros jovens serve para mensurar o desenvolvimento corporal e reprodutivo e sua meta é classificar os animais em aptos e inaptos à reprodução na ocasião do exame, devido a sua fertilidade sob regime de monta natural está envolvida em questões de manejo reprodutivo utilizado no rebanho, fertilidade das fêmeas e nutrição (Ellis et al., 2005). O certificado andrológico tem validade de 60 dias para animais considerados aptos à reprodução (CBRA, 1998) (desde que não aja mudanças no manejo do animal), e os touros jovens sofrem mais em situações de estresse que adultos, influenciando a qualidade seminal e os resultados dos espermiogramas (Kennedy et al., 2002).

3.2 – Touros adultos

Após a classificação andrológica, 94% dos touros adultos foram classificados em aptos à reprodução (194) e 6% inaptos (12). Não houve diferença entre as médias das biometrias testiculares dos touros aptos e inaptos à reprodução ($P>0,05$; Tabela 2). A média do perímetro escrotal foi $38,5\pm 2,4$ cm, semelhante aos observados por Santos et al. (2004) e Chacón et al. (1999). Santos et al. (2004) observaram perímetro escrotal de 37,9cm em touros adultos da raça Nelore pré-selecionados para a estação de monta e Chacón et al. (1999) registraram $36,2\pm 4$ cm utilizando 598 touros adultos zebuínos com idade média de 4,2 anos. Lopes et al. (2009) trabalhando com 14 touros adultos da raça Nelore pré-selecionados para o regime de monta natural (Fazenda São Francisco-Magda-SP) com idade média de $50,5\pm 15,73$ meses, registraram $37,35\pm 1,5$ cm de perímetro escrotal.

Houve diferenças entre as médias de turbilhonamento, motilidade espermática e vigor espermático do ejaculado de touros adultos inaptos e aptos à reprodução ($P < 0,05$) (Tabela 2). As médias dos aspectos físicos foram semelhantes aos registrados por Santos et al. (2004), estes autores observaram 74,5% de motilidade espermática progressiva retilínea e 3,1 vigor espermático. Chacón et al. (1999) observaram média inferior a este experimento ($61 \pm 21\%$) em touros adultos da raça Nelore. Lopes et al. (2009) observaram $74,2 \pm 12,3\%$ de motilidade espermática retilínea progressiva, $2,5 \pm 1,3$ de turbilhonamento, e $3,0 \pm 0,9$ de vigor espermático, valores semelhantes ao presente experimento.

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão do perímetro escrotal, percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica, e aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros adultos da raça Nelore, classificados em aptos e inaptos à reprodução.

Parâmetro	Touros		
	Aptos	Inaptos	Média Total
N	194	12	206
PE (cm)	$38,5 \pm 2,4^a$	$39,1 \pm 2,6^a$	$38,5 \pm 2,4$
Hipo (%)	$38,4 \pm 17,9^a$	$39,5 \pm 16,4^a$	$38,5 \pm 17,8$
Motilidade (%)	$74,6 \pm 8,6^A$	$50 \pm 23,3^B$	$73,2 \pm 11,5$
Vigor (0-5)	$3,1 \pm 0,4^a$	$2,6 \pm 0,5^b$	$3,1 \pm 0,4$
Turb (0-5)	$2,1 \pm 1,2^a$	$0,9 \pm 1,1^b$	$2 \pm 1,1$
Cauda (%)	$2,6 \pm 2,44^B$	$15,4 \pm 13,9^A$	$3,3 \pm 5$
Maiores (%)	$10,4 \pm 5,7^B$	$35,1 \pm 18,7^A$	$11,8 \pm 9,1$
Menores (%)	$4,5 \pm 2,7^b$	$7,8 \pm 6,1^a$	$4,7 \pm 3,1$
Totais (%)	$14,9 \pm 6,1^b$	$42,9 \pm 21,4^a$	$16,5 \pm 10,1$

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste F a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. N = número de animais; PE (cm) = perímetro escrotal (cm); Hipo (%) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Motilidade (%) = motilidade espermática progressiva retilínea em percentual; Vigor (0-5) = vigor espermático; Turb (0-5) = turbilhonamento ou movimento espermático de massa; Cauda (%) = defeitos de cauda dobrada em percentual; Maiores (%) = defeitos espermáticos maiores em percentual; Menores (%) = defeitos espermáticos menores em percentual; Totais (%) = defeitos espermáticos totais em percentual.

Houve diferença entre as médias de todos os aspectos morfológicos entre touros adultos aptos e inaptos à reprodução ($P < 0,05$) (Tabela 2), sendo um dos principais critérios para a classificação andrológica (CBRA, 1998). Santos et al. (1999) e Lopes et al. (2009) observaram 13,8% e $9,5 \pm 8,05\%$ de defeitos totais em touros adultos da raça Nelore aptos à reprodução, médias inferiores ao presente experimento. Mas ao se analisar somente os touros aptos à reprodução as médias são semelhantes. Os principais defeitos espermáticos foram os de cauda dobrada e cauda dobrada com gota citoplasmática distal, onde foram verificadas diferenças entre as médias do sêmen de touros aptos e inaptos à reprodução ($P < 0,05$), corroborando com os achados de Chacón et al. (1999).

Não foi observada diferença entre as médias dos percentuais de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico do sêmen de touros adultos aptos e inaptos ao regime de monta natural ($P > 0,05$). A média do percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico foi muito baixa (Tabela 2), comparando com outros autores que utilizaram o teste hiposmótico em sêmen *in natura* de touros zebuínos. Vera-Munoz et al. (2009) obtiveram média de 68,13 % de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico no sêmen *in natura* de touros mestiços (taurinos x zebuínos). Borges (2008) utilizando touros doadores de sêmen em central de inseminação artificial da raça Nelore verificou 66% de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico. Uma hipótese para essa baixa média do percentual de espermatozoides reativos, pode estar relacionada com o tempo que estes animais estavam em repouso sexual. A cauda do epidídimo tem a função de manter os espermatozoides viáveis e fagocitar os defeituosos, os mortos liberam enzimas que podem interferir na viabilidade dos que irão permanecer no epidídimo (Marengo, 2008), o que causaria uma menor integridade bioquímica da membrana plasmática dos espermatozoides.

3.3 – Conclusão

Com estes resultados pode-se concluir que o teste hiposmótico não pode ser utilizado isoladamente para classificar touros jovens e adultos da raça Nelore em aptos e inaptos ao regime de monta natural, pois não houve diferença entre os percentuais de espermatozoides reativos do sêmen de touros jovens aptos e inaptos à reprodução, e não houveram relações com os principais aspectos de qualidade seminal.

EXPERIMENTO 2: Avaliação de proteínas e peptídeos aniônicos diferencialmente sintetizados em plasma seminal de touros adultos e jovens da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente sintetizadas em plasma seminal de touros jovens e adultos da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução. Após o exame andrológico, os touros jovens foram classificados em aptos (117) e inaptos (49) à reprodução, e os touros adultos (56), em aptos à reprodução. As amostras de plasma seminal, conservadas em palhetas finas sob -196°C, foram descongeladas à temperatura ambiente para serem realizadas as análises proteômicas. Foi realizada a MDLC *offline*, sendo a primeira dimensão a cromatografia de troca catiônica e a segunda a de fase reversa. Foram coletadas seis frações eluídas nas condições de equilíbrio (pH 7,0) na cromatografia de troca catiônica, que correspondem às frações de peptídeos e proteínas com caráter aniônico e neutro. As frações correspondentes aos picos eluídos obtidos na cromatografia de fase reversa foram analisadas em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF para a determinação da massa molecular das proteínas. Foram selecionados e analisados 96 eluatos coletados na cromatografia de fase reversa para a espectrometria de massa, com síntese protéica diferencial entre os tratamentos. Dezoito massas moleculares foram identificadas por espectrometria de massa, entre 4.233 e 13.560 Da. A proteína de 12.910 Da, com massa molecular e características semelhantes à aSFP (*acidic seminal fluid protein*), foi obtida em maior concentração nos touros aptos adultos, seguidos pelos aptos jovens e inaptos, consecutivamente. Os perfis cromatográficos protéicos foram diferentes entre os grupos, sugerindo que as proteínas aniônicas podem ser estudadas visando identificar marcadores protéicos para a aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore, pela análise proteômica do plasma seminal.

Palavras-chave: Proteínas, Plasma seminal, Cromatografia, Espectrometria de massa, *Bos indicus*

1 – INTRODUÇÃO

Após a fase puberal, ocorrem marcadas mudanças quantitativas e qualitativas da produção espermática, que posteriormente se estabilizam com a maturidade sexual do touro (Evans et al., 1995). A associação entre motilidade e morfologia espermática em tourinhos com bom desenvolvimento testicular e libido normais estão entre os principais critérios utilizados como marcadores andrológicos, para determinar a maturidade sexual e o potencial reprodutivo de touros adultos (Guimarães, 1999; Parkinson et al., 2004; Saacke, 2008). As proteínas do plasma seminal de touros e suas relações com a fertilidade estão sendo estudadas por diversos autores (Killian et al., 1993; Bellin et al., 1996; Moura et al., 2007), sendo o perfil protéico do plasma seminal mais um importante aspecto da qualidade seminal, que ainda tem muito a ser estudado (Rodríguez, 2003).

A detecção de moléculas com baixas massas moleculares e em baixas concentrações é um limitante das técnicas proteômicas, como a eletroforese bidimensional. Proteínas com massas moleculares menores que 10 kDa, geralmente, não são retidas na malha do gel e são, portanto, de difícil recuperação e identificação (Barggerman et al., 2003). Estas limitações têm sido superadas pela utilização de técnicas cromatográficas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC), usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas, que contêm partículas microporosas com grande pureza e formato esférico, que são permeáveis ao solvente e têm uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama. As análises são mais rápidas e a eficiência é muito mais elevada quando comparada à cromatografia clássica. A combinação de diferentes e independentes dimensões de separação, por meio da cromatografia líquida multidimensional (MDLC, do inglês *multidimensional liquid chromatography*) tem sido bastante utilizada nas análises proteômicas recentes. Na sua forma *offline*, na qual as diferentes dimensões de separação não são diretamente acopladas, é possível a coleta das frações entre as separações, permitindo uma melhor análise das amostras nativas. As frações podem ser biologicamente avaliadas antes da próxima dimensão de separação, aumentando a eficiência do processo de purificação, à medida que possibilita a melhor associação entre as dimensões de separação de acordo com as características de cada fração coletada. A separação protéica por MDLC, associada à identificação por espectrometria de massa, é uma poderosa ferramenta no estudo de moléculas protéicas nos diversos campos da biologia molecular e celular (Neverova et al., 2005).

Na espectrometria de massa, a energia é transferida à amostra para causar a sua ionização. O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa. Um dos tipos de espectrometria de massa muito utilizado para análise de macromoléculas

biológicas envolve a dessorção/ionização por laser assistida por matrix-tempo de vôo, conhecida pela sigla MALDI-TOF/MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight/mass spectrometry*). O princípio de operação do TOF-MS envolve a medida do tempo que um íon leva para viajar da fonte de íons até o detector. Os íons são separados no analisador de massa de acordo com a razão massa/carga (Baggerman et al., 2004).

A capacidade dessas tecnologias utilizadas conjuntamente em identificar e quantificar proteínas em soluções orgânicas complexas auxiliará, de forma marcante, no entendimento sobre os mecanismos bioquímicos celulares (Aebersold e Mann, 2003) e o processo de fertilização (Gadella, 2008). A utilização conjunta de técnicas de rotina e o desenvolvimento de técnicas complementares para a avaliação andrológica será uma importante ferramenta para avaliar os melhores animais, detectar animais subfértéis e melhorar estratégias de conservação espermática e outras biotecnologias da reprodução. O presente estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente expressas em plasma seminal de touros jovens e adultos da raça Nelore classificados em aptos e inaptos à reprodução.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais e coleta do plasma seminal

Foram utilizados 166 touros jovens e 56 touros adultos da raça Nelore das fazendas São Francisco e Lageado, de propriedade da Agro-Pecuária CFM Ltda, localizadas nos municípios de Magda-SP e Dois Irmãos do Buriti – MS, respectivamente. Após a contenção individual dos animais em troncos especiais, foi realizado o exame andrológico conforme descrito no experimento 1. Os ejaculados dos animais foram coletados pelo método de eletroejaculação, foram realizadas as avaliações física e morfológica do sêmen e, logo após, centrifugado a 1.500g por 15 minutos para obter o plasma seminal. A seguir, o plasma foi envasado em palhetas de inseminação artificial finas (0,25 mL) e conservado em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise proteômica (Jobim et al., 2003; Moura et al., 2007). Após o exame andrológico, os animais foram classificados em aptos e inaptos para a reprodução, conforme descrito no experimento 1. O grupo de animais inaptos utilizado foi classificado quanto ao seu espermiograma somente, não sendo utilizado animais considerados inaptos por outro achado clínico reprodutivo, assimetria testicular, problemas de casco ou aprumos, baixo perímetro escrotal, vesiculite, entre outros.

Cento e dezessete touros jovens foram classificados como aptos (jovens aptos, JA) e 49 inaptos (jovens inaptos, JI) à reprodução, conforme os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de

Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os touros jovens, com idades variando de 18 a 22 meses, com bom escore corporal, criados em condição de pastagem, predominantemente de capim *Brachiaria decumbens* e colômbio até os 18 meses em média, quando então passaram a ser criados em regime de confinamento e alimentados com silagem de milho e sorgo, sal mineral e água *ad libitum*. Todos os animais foram submetidos a exame andrológico para a avaliação da aptidão reprodutiva para futura venda como reprodutor quando considerados aptos ao regime de monta natural, segundo os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Os touros adultos foram criados em regime de pastejo, predominantemente de capim *Brachiaria decumbens* e colômbio. Os touros adultos, com idades variando de 3 a 10 anos, estavam sendo selecionados para a estação de monta na fazenda São Francisco (Magda-SP) e foram utilizados apenas touros adultos considerados aptos à reprodução (adultos aptos, AA) (CBRA, 1998).

2.2 - Preparo das amostras para a análise proteômica

As amostras de plasma seminal (conservadas em palhetas finas sob -196°C) foram descongeladas à temperatura ambiente, e foram reunidas em três grupos: touros jovens aptos (JA) e inaptos (JI) à reprodução, e touros adultos aptos à reprodução (AA). Foram utilizadas 117 amostras de plasma seminal de touros JA e 49 JI à reprodução, e 56 touros AA aptos à reprodução para a preparação das 3 amostras a serem realizadas as análises proteômicas. Depois de acondicionadas em microtubos (1,5 mL) e centrifugadas a 150g durante 10 min, para a completa remoção dos espermatozoides, foram novamente centrifugadas a 700g durante 10 min, para a remoção de debris celulares. O sobrenadante recuperado foi filtrado (0,22 μm) para posterior determinação da proteína total e as análises proteômicas.

2.3 - Determinação da proteína total

A proteína total das amostras de plasma seminal foi determinada utilizando o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (A_{595}), conforme Bradford (1976). A albumina sérica bovina (BSA) diluída em água ultrapura (0,2 mg/mL) foi utilizada como solução de proteína padrão na faixa de 2 a 8 μg de proteína, para estimar as concentrações das amostras em microplaca. As três amostras de plasma seminal previamente diluídas (5 μL de amostra de plasma seminal em 495 μL de água ultrapura) foram novamente diluídas 500, 1000 e 5000 vezes nos ensaios para a determinação das proteínas solúveis total das amostras. Foi utilizado um volume de reação de 200 μL , com 160 μL de amostra diluída com

40µL de reagente de trabalho. Após 15 minutos de reação, foi medida a absorvância das reações e estimou-se a concentração protéica das soluções com base na equação ajustada (Figura 1).

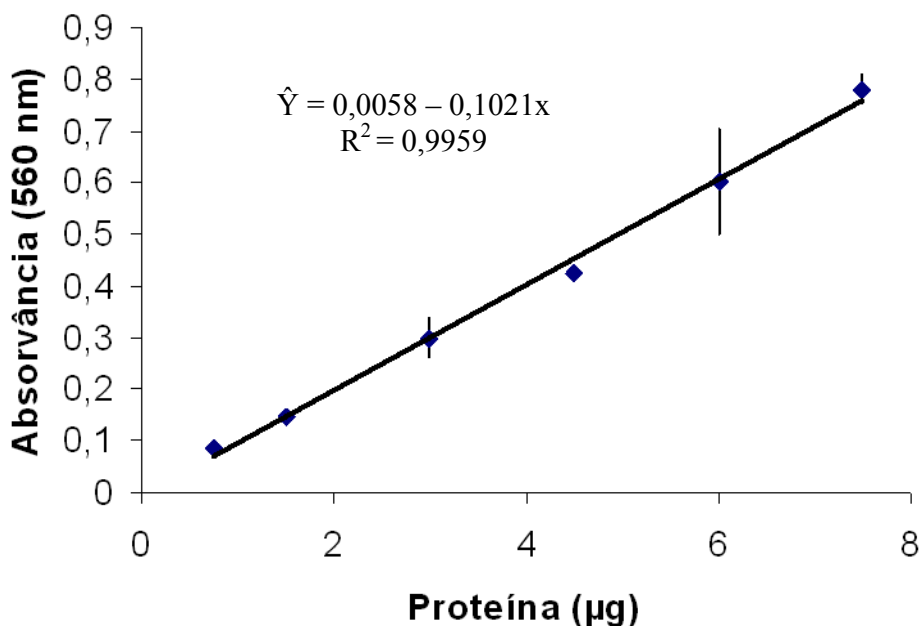


Figura 1 - Curva padrão ajustada para estimar a concentração protéica pelo método do Bradford.

2.4 - Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC) em HPLC

Foram realizadas as cromatografias de troca catiônica e de fase reversa, consecutivamente. Nas cromatografias de troca catiônica, foi utilizada a coluna Spherisorb® 5 µm SCX (WATERS CORPORATION) equilibrada com o tampão Tris-HCL 25mM, pH 7,0, e as proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de NaCl de 0 a 1 M, ao fluxo de 1,0 mLmin por 45 minutos. O plasma seminal dos grupos de touros (touros JA, JI e AA) foi diluído em Tris-HCL 25mM, pH7, com base nos resultados das concentrações de proteínas solúveis determinadas pelo método de Bradford (1976), sendo separada na coluna de troca catiônica 35µg para os diferentes grupos. Posteriormente os eluatos selecionados obtidos na troca catiônica foram separados por cromatografia de fase reversa. As cromatografias de fase reversa foram realizadas em coluna C18, Shim-Pack CLC-ODS (SHIMADZU CORPORATION) (C18-RP-HPLC), equilibrada em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). A eluição das proteínas foi com TFA 0,1% (v/v) na presença de um gradiente crescente de acetonitrila (0 a 80%) (v/v), ao fluxo de 1,0 mL/min, por 60 minutos. O volume da amostras injetado foi de 200µL, não sendo determinada a concentração de proteína total por amostra.

2.5 - Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

As frações correspondentes aos picos eluídos da C18-RP-HPLC foram analisadas em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Foi misturado 1 µL da amostra com 1 µL de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 5 µg/mL em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) no poço da placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (BRUKER DALTONICS®) do espectrômetro de massa. Alternativamente, a matriz de ácido sinapínico foi também utilizada para análises em diferentes condições de energia. Para que os espectros obtidos tenham maior precisão e confiabilidade, foi realizada a calibração externa com o padrão Peptide calibration standard II (BRUKER DALTONICS®), que foi alíquotado com a mesma matriz em outro poço da placa de aço. Esse padrão é composto pelas proteínas bradicinina (757 Da), angiotensina II (1.046 Da), angiotensina I (1.296 Da), substância P (1.347 Da), bombesina (1.619 Da), ACTH clip 1-17 (2.093 Da), ACTH clip 18-39 (2.465 Da) e somatostatina (3.147 Da). Os espectros foram editados manualmente usando o programa *FlexAnalysis* (BRUKER DALTONICS®), com seleção dos picos diferencialmente presentes após a C18-RP-HPLC entre os grupos de touros.

2.6 - Análise Estatística

Para a análise das diferenças na ocorrência na expressão das proteínas do plasma seminal entre os grupos de touros (jovens aptos, inaptos e adultos aptos à reprodução) foi utilizada uma análise descritiva em relação ao número de eluatos obtidos nas cromatografias e massas moleculares determinadas na espectrometria de massa.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal foi 37,6mg/mL, sendo 35,6mg/mL para touros JA, 38,5mg/mL para touros JI e 38,6mg/mL para touros AA. A concentração total das proteínas solúveis apenas não pode ser utilizada para predizer a qualidade seminal de reprodutores. Existem diferentes proteínas no plasma seminal com diversas funções no metabolismo espermático, o que torna necessária sua identificação, caracterização e quantificação relativa para se entender os resultados (Martins et al., 2006). A resina de troca catiônica, um forte trocador de iônico, permite a ligação das proteínas positivamente carregadas, enquanto que a fração protéica não ligada envolve as proteínas com caráter aniônico e neutro, a pH 7,0. A eluição destas proteínas ocorre no mesmo tampão de equilíbrio, anteriormente ao gradiente de sal usado na eluição. Os perfis de eluição

das proteínas do plasma seminal de touros JA, JI e AA na ausência de sal (proteínas aniônicas e neutras) foram parcialmente semelhantes, havendo sobreposição de alguns picos e de outros não, indicando a presença de proteínas e peptídeos diferentemente presentes entre os grupos (Figura 2). Foram coletadas seis frações (nomeadas TC1 a TC6), em tempos de eluição inferiores a 6 minutos, que correspondem às frações de peptídeos e proteínas com caráter aniônico e neutro, já que o gradiente de NaCl a 1 M desenvolveu após 10 minutos de corrida.

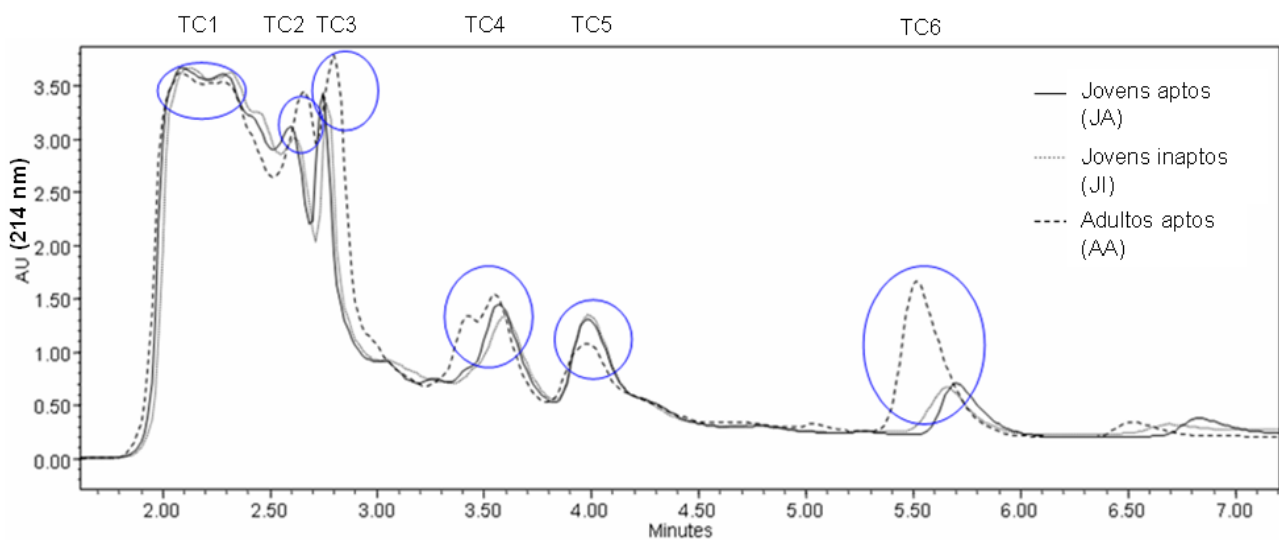


Figura 2. Perfis cromatográficos comparativos de troca catiônica em HPLC das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos (AA) à reprodução. Foi utilizada a coluna Spherisorb® SCX 5µm (WATERS CORPORATION). Os círculos indicam as regiões TC1 a TC6 em que foram obtidos os 18 eluatos que foram selecionados para a cromatografia de fase reversa.

Ao separar os 18 eluatos das cromatografias de troca catiônica (Figura 2) na coluna C18, foram selecionados 96 eluatos diferencialmente observados na cromatografia de fase reversa, e todos foram analisados por espectrometria de massa. Dezoito massas moleculares (MM) foram identificadas por espectrometria de massa (4.233-13.560 Da).

Na cromatografia de fase reversa de TC1 (Figura 3), foram selecionados 18 eluatos para a espectrometria de massa de picos diferencialmente expressos entre os grupos. As três MM identificadas (12.178, 12.910 e 13.560 Da), nomeadas massas 1, 2 e 3 (Figura 3B) foram obtidas em um pico de absorvância alta em relação aos outros picos encontrados (Figura 3A). Foram observadas absorvâncias mais altas em touros AA, seguido dos touros JA e JI à reprodução (Figura 3B). A proteína de MM de

12910 Da (Figura 4A e 4B), considerando as características de eluição, tem características semelhantes às da proteína chamada aSFP (*acidic seminal fluid protein*), que possui 12,9 kDa e ponto isoelétrico de 4,8 (Romão et al., 1997; Moura et al., 2007), sendo uma proteína com característica aniônica. A maior absorvância do pico dos touros adultos é explicada pelos autores devido aos maiores níveis de testosterona, que melhoram o funcionamento dos epidídimos, ampolas e vesículas seminais, aumentando assim a secreção da aSFP por estes tecidos e concentração no plasma seminal. No presente estudo, os touros JA apresentaram o pico com maior absorvância em comparação ao de touros JI (Figura 3B), devendo ser observado que o grupo de animais inaptos utilizado foi classificado quanto ao seu espermiograma somente, não sendo utilizados animais considerados inaptos por outro achado clínico reprodutivo, em que todos os touros inaptos se encontravam no final da fase de puberdade seminal, levando em consideração os resultados dos espermiogramas e a faixa etária dos touros utilizados. As médias dos aspectos físicos do ejaculado dos touros inaptos foram $55,4 \pm 21$ % de motilidade espermática progressiva retilínea, $2,4 \pm 0,6$ de vigor espermático e $0,5 \pm 0,8$ de turbilhonamento. A média dos defeitos menores, maiores e totais foram $33,8 \pm 18,5\%$, $6,2 \pm 4,9\%$ e $40,1 \pm 20,4\%$, respectivamente.

A proteína ácida do fluido seminal (aSFP) é um polipeptídeo que é secretado pelas vesículas seminais, ampolas e muito pouco nos epidídimos (Wempe et al., 1992). Em touros em atividade sexual, a aSFP é uma das proteínas mais abundante do plasma seminal, variando a sua concentração no sêmen de 2 a 7mg/mL (Einspanier et al., 1993). Shoneck et al. (1996) demonstraram *in vitro* que a aSFP possui grande potencial para prevenir o estresse oxidativo, diminuindo a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, importante causa de danos à membrana plasmática dos espermatozoides. A aSFP, por ser uma proteína pouco glicosilada, provavelmente não participa na interação entre os gametas, tendo maior importância na proteção do espermatozoides a danos à membrana plasmática e ao metabolismo espermático (Romão et al., 1997; Moura et al., 2007). Jobim et al. (2004), trabalhando com plasma seminal de 16 touros adultos doadores de sêmen em uma central de inseminação artificial, observaram que esta proteína estava presente em todos os ejaculados, mas com maior concentração em touros classificados como bons no processo de criopreservação de sêmen. Ao se analisar amostras complexas, há interferentes não protéicos (hormônios, açúcares, vitaminas, dentre outros) e protéicos. Dentre os interferentes protéicos, observam-se a alta concentração de proteínas que não são de interesse e a degradação proteolítica. A degradação proteolítica pode degradar as moléculas de interesse ou gerar outros peptídeos que não são de interesse, interferindo na detecção das massas de moléculas de importância e presentes em baixas concentrações (Baggerman et al., 2004).

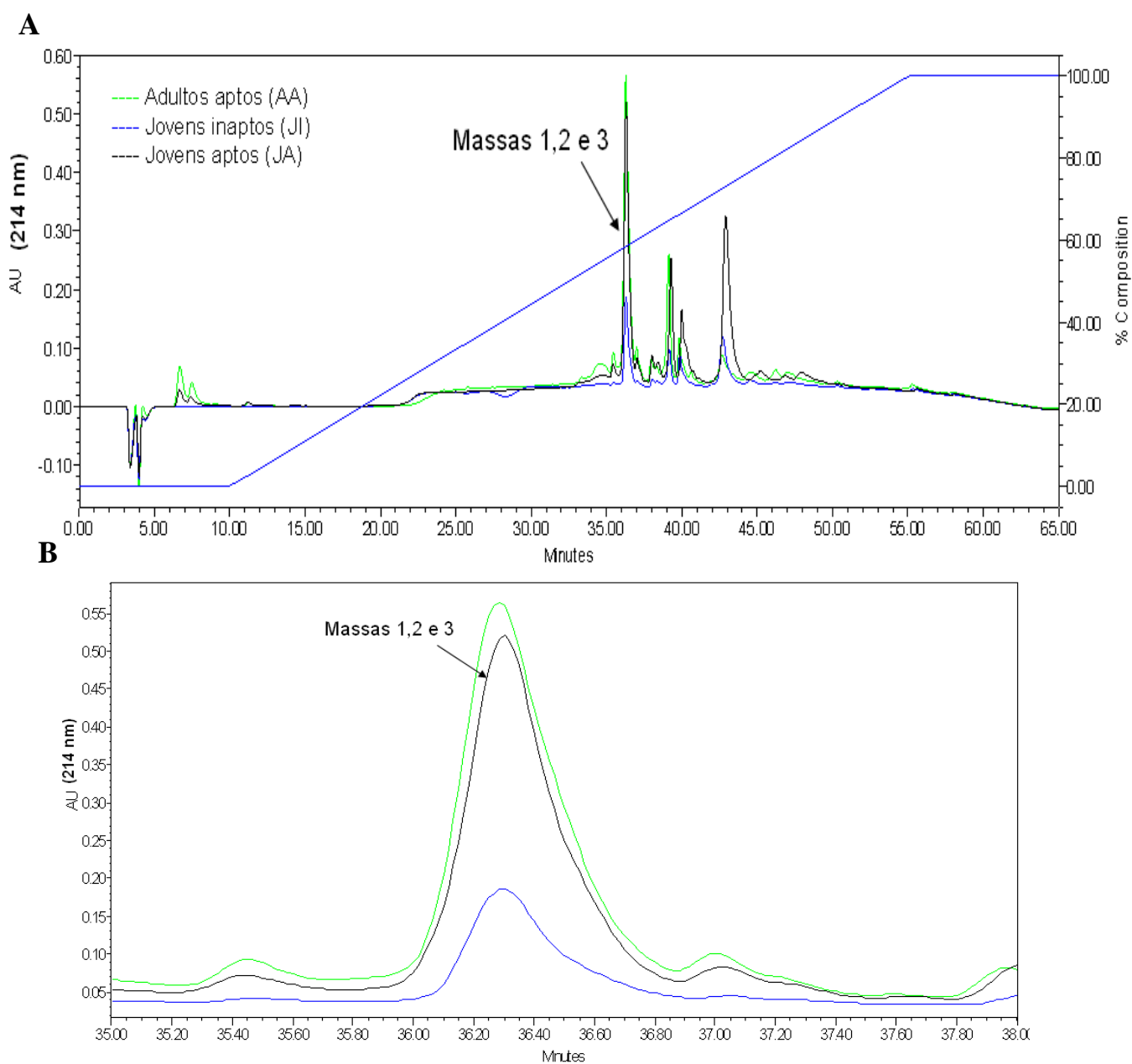


Figura 3. A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), absorvância a 214nm (AU) e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da primeira fração da troca catiônica (TC1). B) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal (as setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa).

O espectro de massa apresenta um sinal pouco intenso, quando utilizou-se a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, porém evidencia a MM de 12.910 Da oriunda da TC1 dos JA após a cromatografia de fase reversa (Figura 4A). Ao se analisar os espectros de massa utilizando a matriz

ácido sinapínico encontraram-se as massas moleculares de 12178, 12910 e 13560Da com melhor resolução e energia. A massa encontrada de 6.455Da corresponde à molécula de 1290Da duplamente carregada, visto que, o resultado é avaliado pela razão massa/carga (Figura 4B). A matriz de ácido sinapínico é mais adequada para proteínas de maior peso molecular, e a de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico para peptídeos e proteínas de baixo peso molecular (Baggerman et al., 2004).

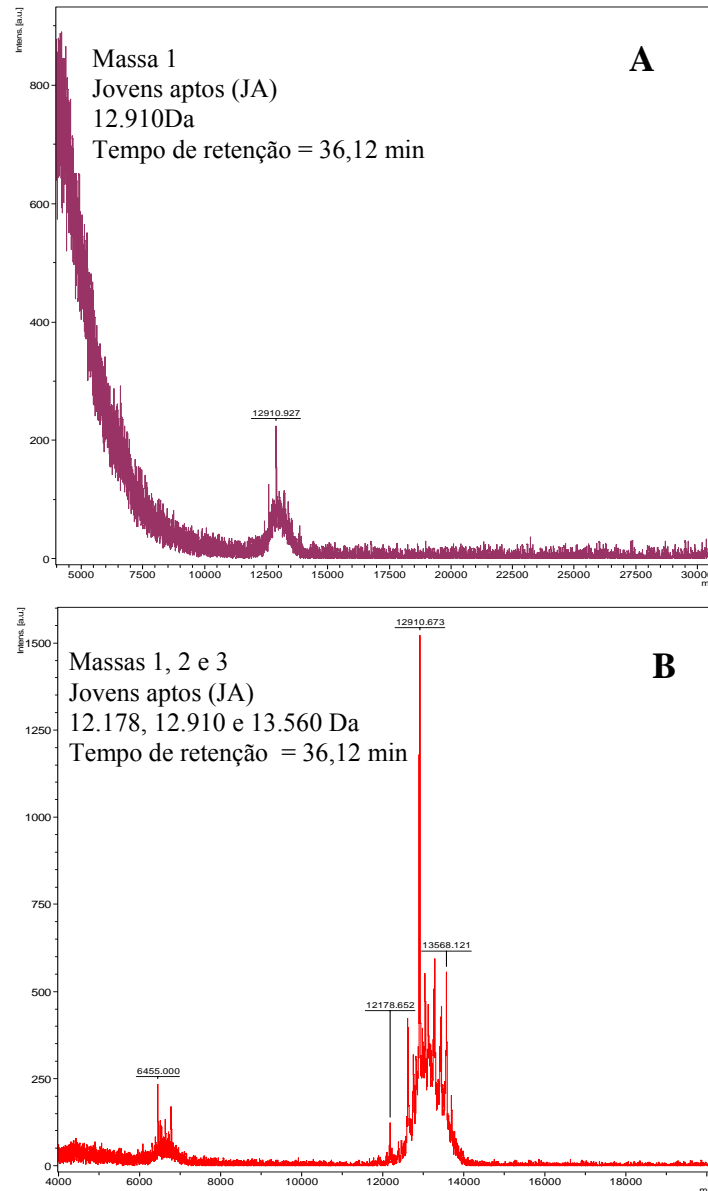


Figura 4. A) Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) do pico diferencial do plasma seminal de touros jovens aptos à reprodução (JA) provenientes da cromatografia de fase reversa da primeira fração da troca catiônica (TC1) utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e B) ácido sinapínico.

Na cromatografia de fase reversa da TC2 foram selecionados 11 eluatos para a espectrometria de massa de picos diferenciais entre os grupos. Os espectros de massa foram encontrados em picos de baixa absorvância e baixa resolução (Figura 5A e 5B). Foram encontrados três espectros com massas moleculares semelhantes (7.370, 7.371 e 7.372Da) entre os três grupos (JA, JI e AA) em uma região do gradiente de acetonitrila muito semelhante. As Massas 4, 5 e 6 correspondem provavelmente ao mesmo peptídeo presente no plasma seminal dos três grupos (Figura 6), expressas em concentrações diferentes, o que pode evidenciar uma molécula peptídica de interesse após futura identificação.

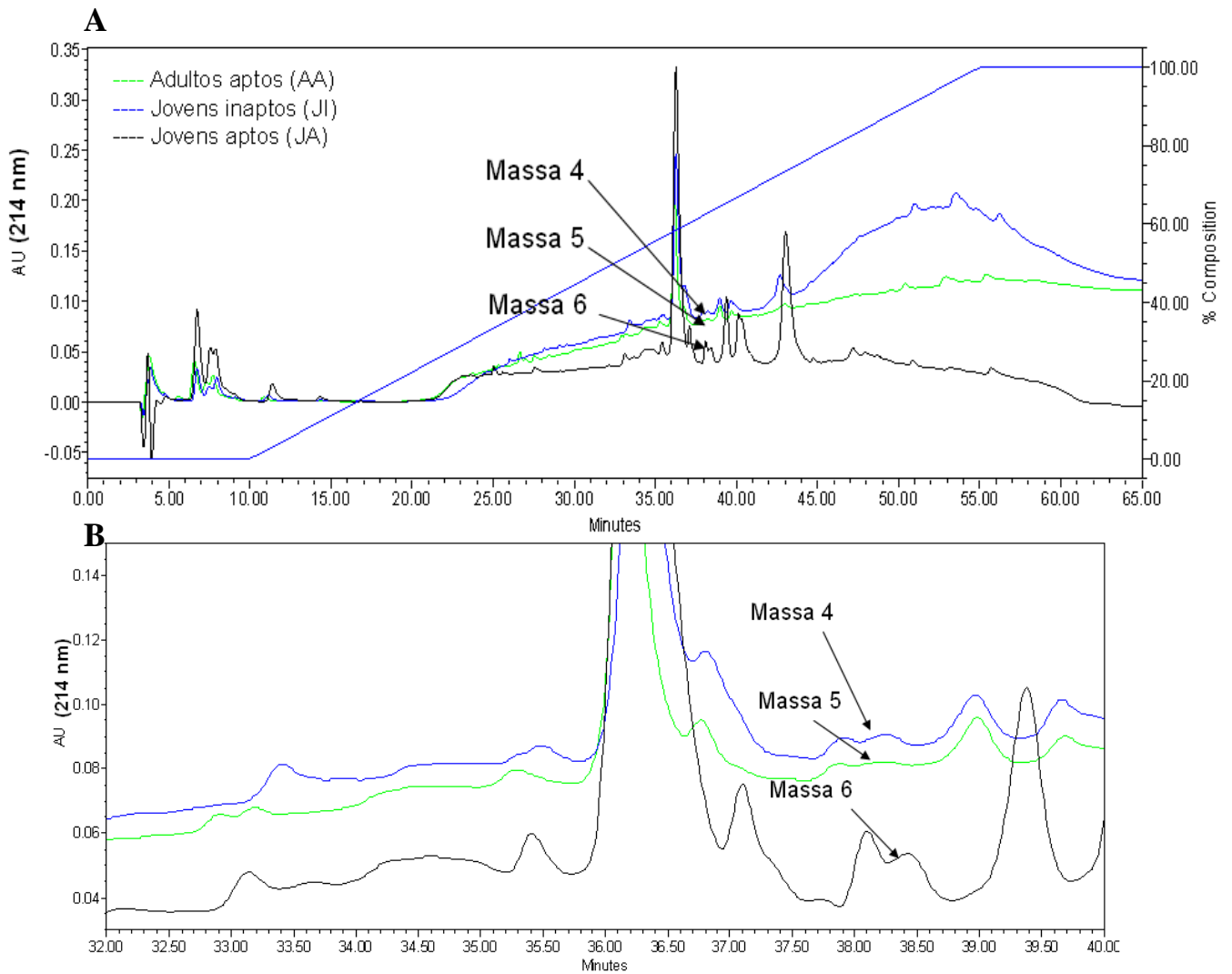


Figura 5. A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), a absorvância a 214nm (AU) e o gradiente de acetonitrila (linha azul), da segunda fração da troca catiônica (TC2). B) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal (as setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa).

Os espectros de massa oriundos da TC2 dos JA, JI e AA após a cromatografia de fase reversa utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico foi de alta resolução e energia (Figura 6), provavelmente por serem picos com menor concentração relativa protéica.

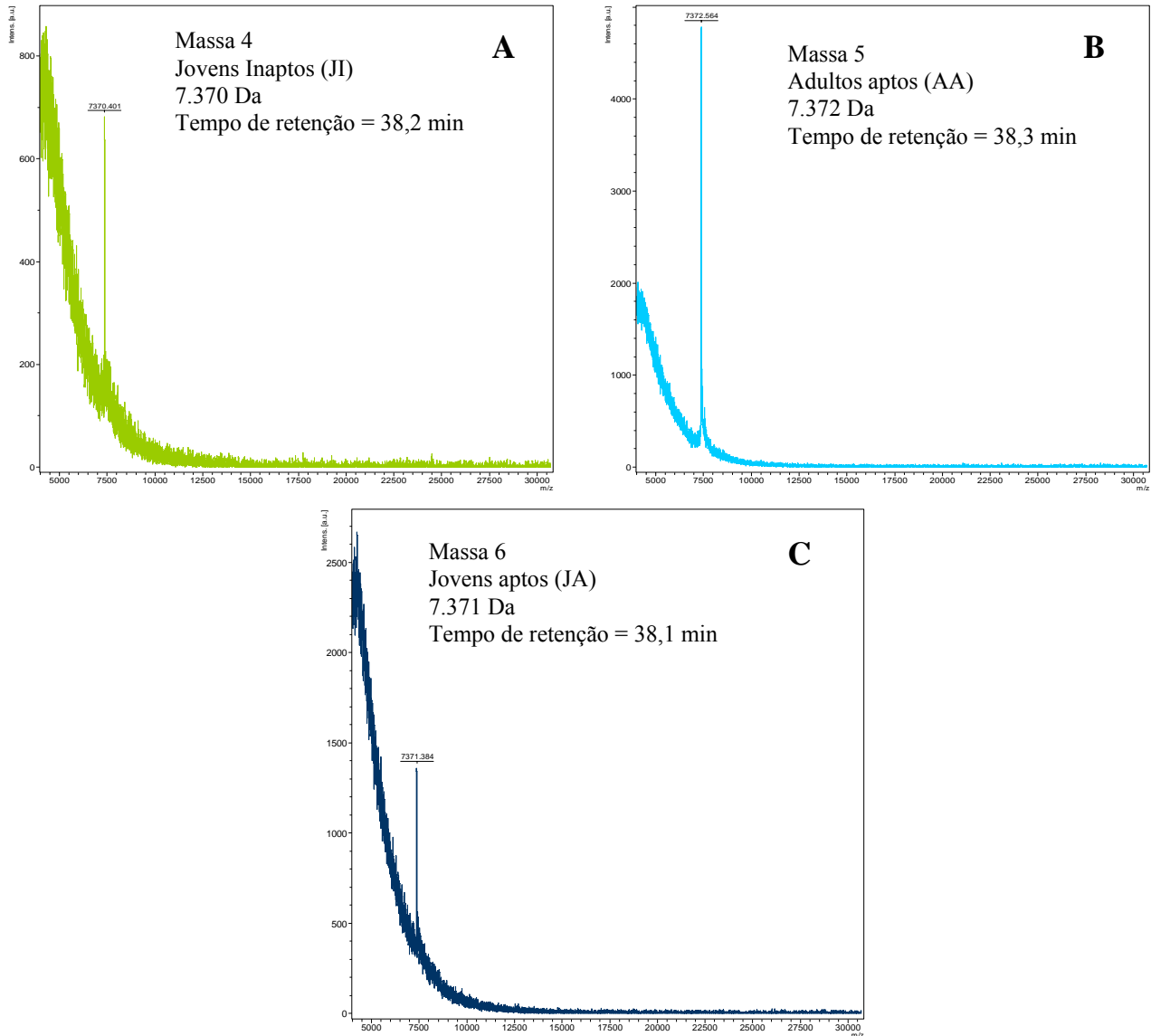


Figura 6. Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais do plasma seminal de touros jovens aptos (JA) (C), jovens inaptos (JI) (A) e touros adultos aptos à reprodução (AA) (B), proveniente da cromatografia de fase reversa da segunda fração da troca catiônica (TC2), utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Na cromatografia de fase reversa da TC3, foram selecionados 33 eluatos para a espectrometria de massa de picos diferenciais entre os grupos. As MM foram detectadas em diferentes gradientes de acetonitrila (Figura 7A) em picos de baixa absorvância (Figuras 7B, 7C e 7D). Foram encontradas sete

massas moleculares (4.233, 4.430, 4.461, 5.429, 7.441, 8.603 e 10.162 Da) (Figura 8) entre os três grupos (JA, JI e AA).

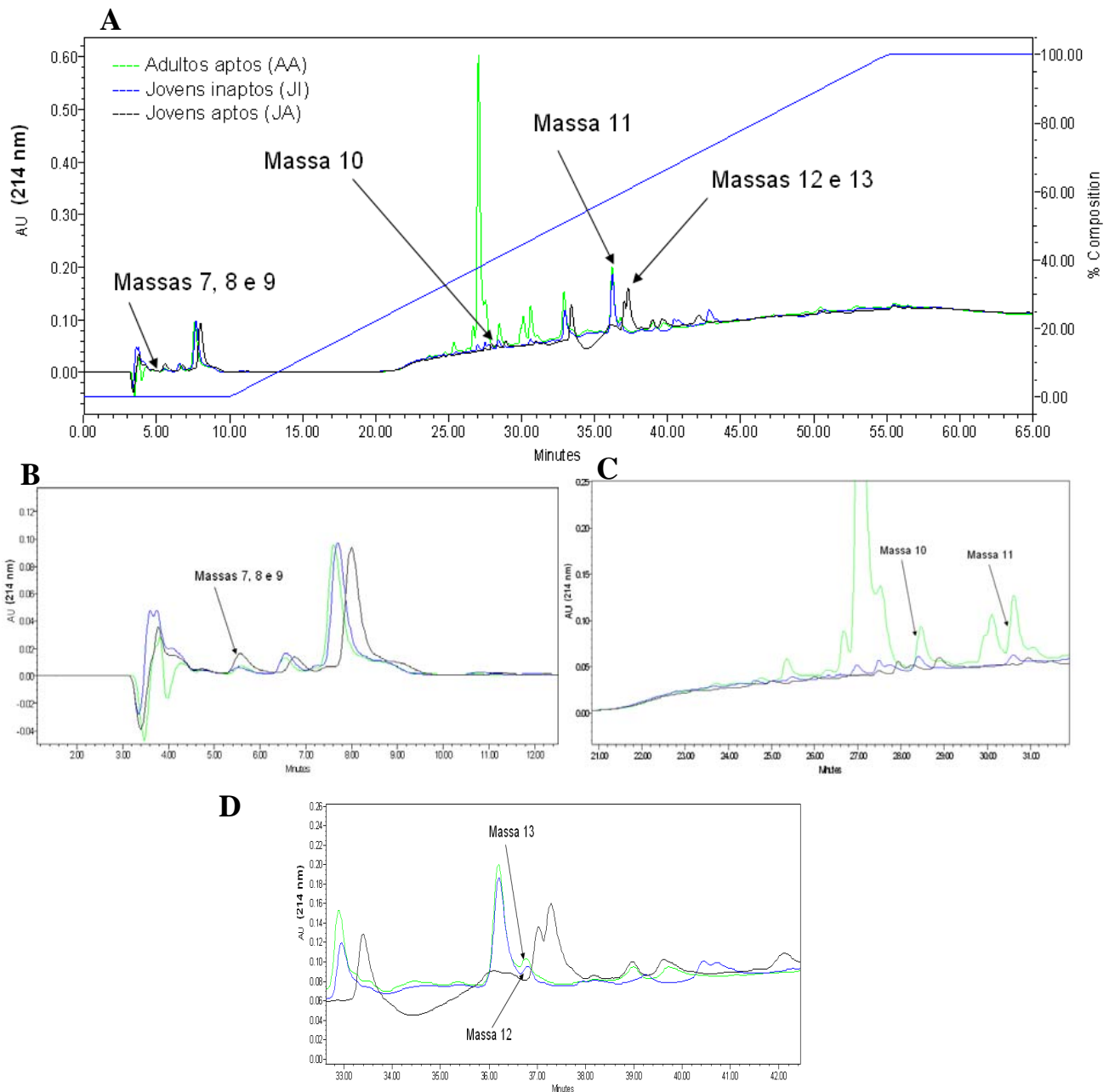


Figura 7. A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), absorvâncias a 214nm (AU), e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da terceira fração da troca catiônica (TC3). B, C, D) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal. As setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa.

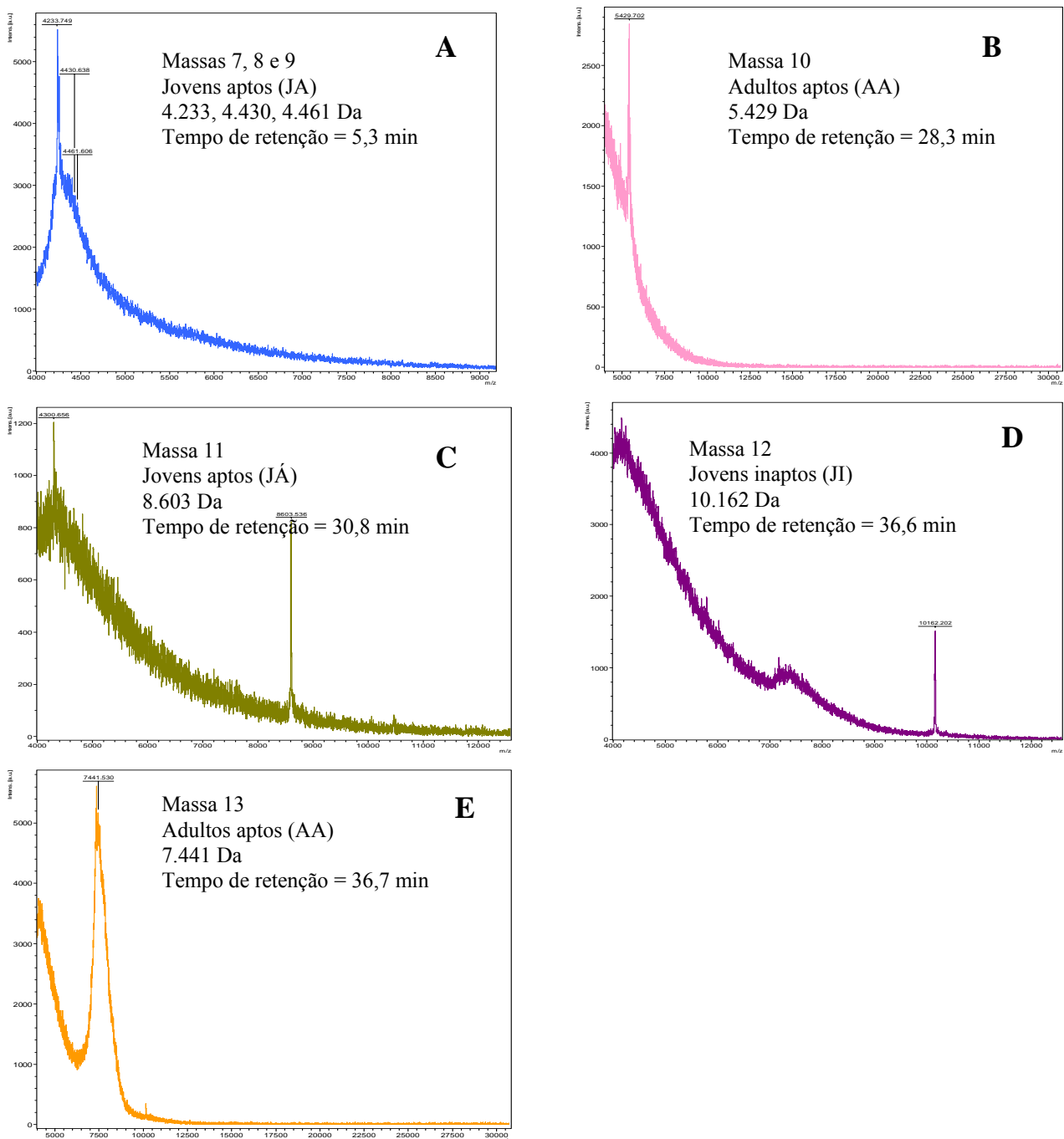


Figura 8. Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais do plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e touros adultos aptos à reprodução (AA), provenientes da cromatografia de fase reversa da terceira fração da troca catiônica (TC3) utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Na cromatografia de fase reversa da TC4 foram selecionados 17 eluatos para a espectrometria de massa de picos diferenciais entre os grupos. Os espectros de massa foram encontrados em picos de

baixa absorvância (Figuras 9A, 9B e 9C) e 5B). Quatro massas moleculares foram obtidas 7.578, 8.445, 7.596 e 7.321 Da entre os JA e AA (Figura 10).

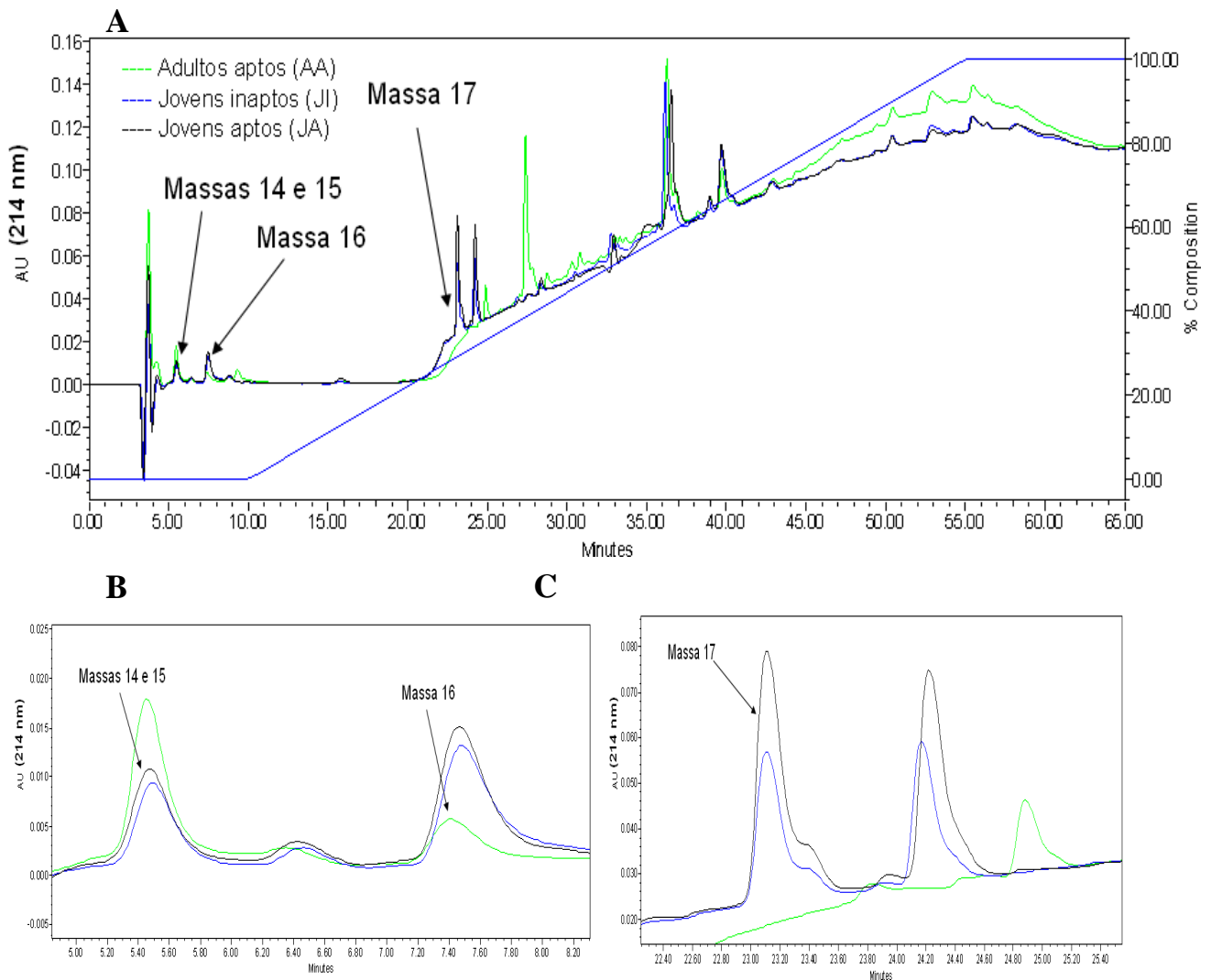


Figura 9. A) Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes) e a absorvância a 214nm (AU), e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da quarta fração da troca catiônica (TC4). B, C) Destaque dos picos diferenciais expressos no plasma seminal. As setas indicam os picos da cromatografia que foram encontrados espectros de massa.

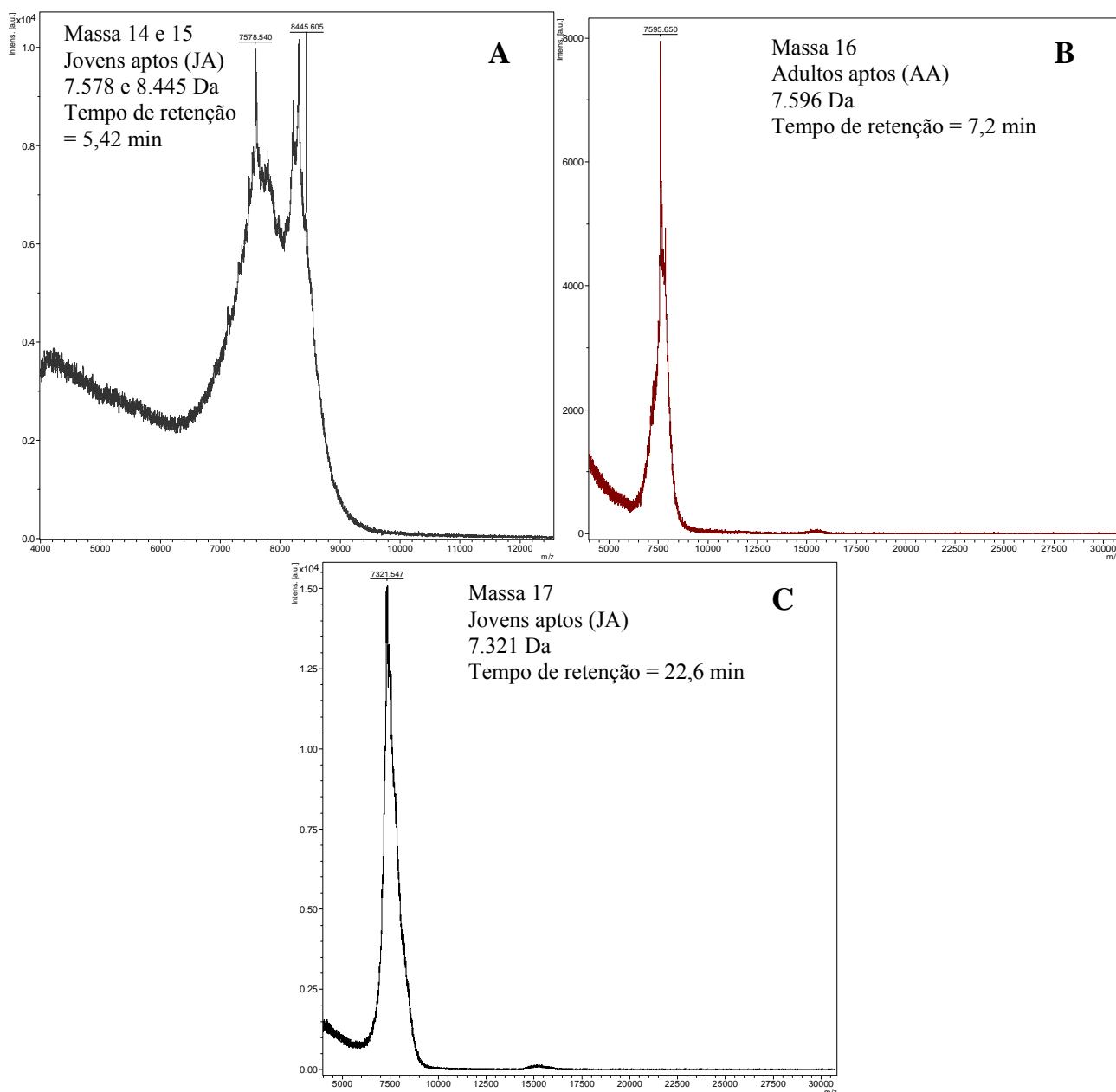


Figura 10. Espectros de massas moleculares (MALDI-TOF/TOF) dos picos diferenciais do plasma seminal de touros jovens aptos (JA) (A e C), e touros adultos aptos à reprodução (AA) (B), proveniente da cromatografia de fase reversa da quarta fração da troca catiônica (TC4) utilizando a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Na cromatografia de fase reversa da TC5 foram selecionados oito eluatos para a espectrometria de massa de picos diferenciais entre os grupos. Uma massa molecular foi identificada nos JI, encontrada em um pico de absorvância mais alta (Figura 11), sugerindo que a molécula peptídica com 4.821 Da (Figura 12) pode estar negativamente associada à aptidão reprodutiva.

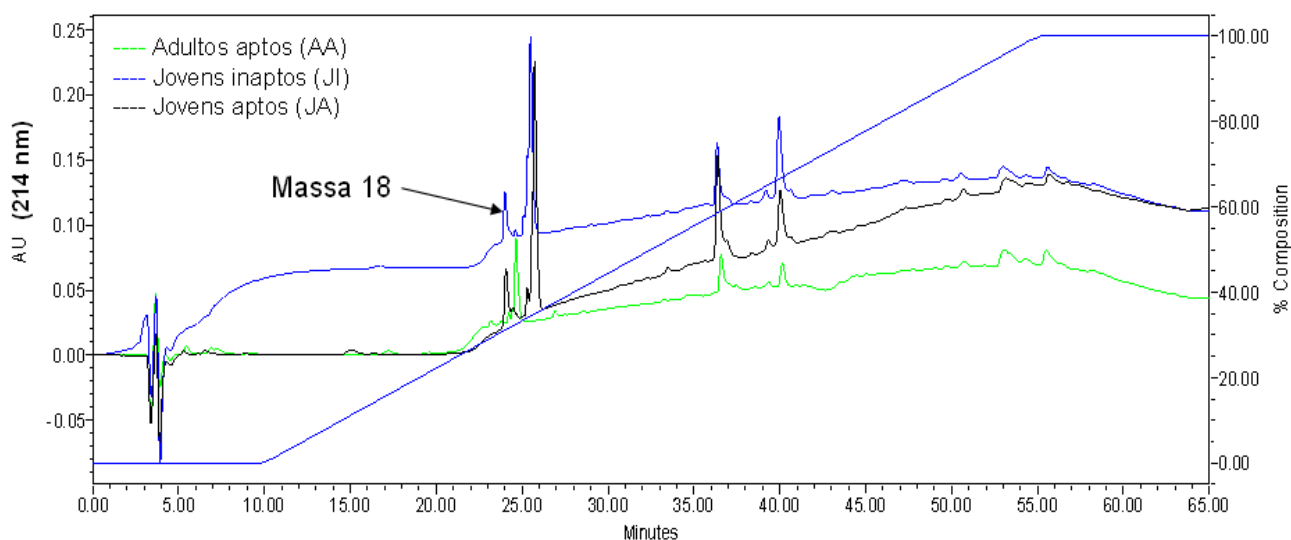


Figura 11. Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), a absorvâncias a 214nm (AU) e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da quinta fração da troca catiônica (TC5).

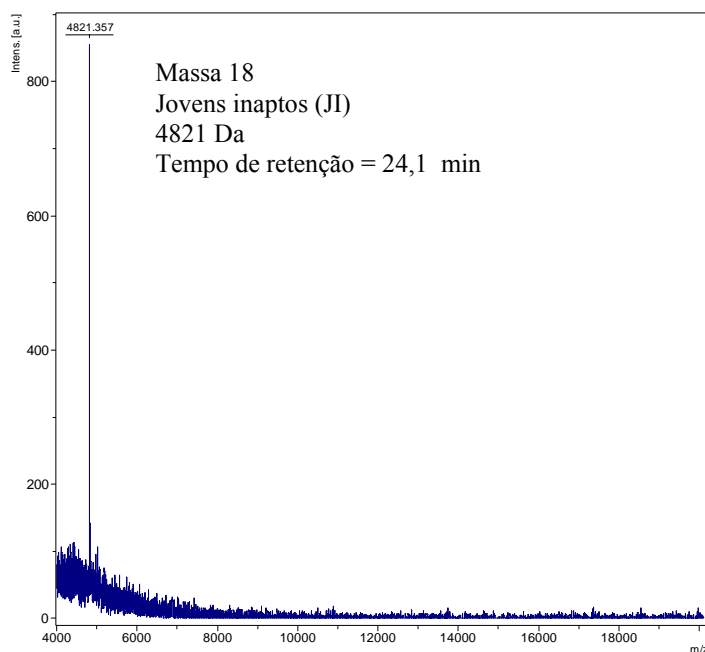


Figura 12. Espectro de massa molecular (MALDI-TOF/TOF) do pico do plasma seminal de touros jovens inaptos (JI), provenientes da cromatografia de fase reversa da quinta fração da troca catiônica (TC5) utilizando a matriz de ácido sinapínico.

Na cromatografia de fase reversa da TC6 foram selecionados nove eluatos para a espectrometria de massa de picos diferenciais entre os grupos e nenhuma massa molecular foi identificada (Figura 13).

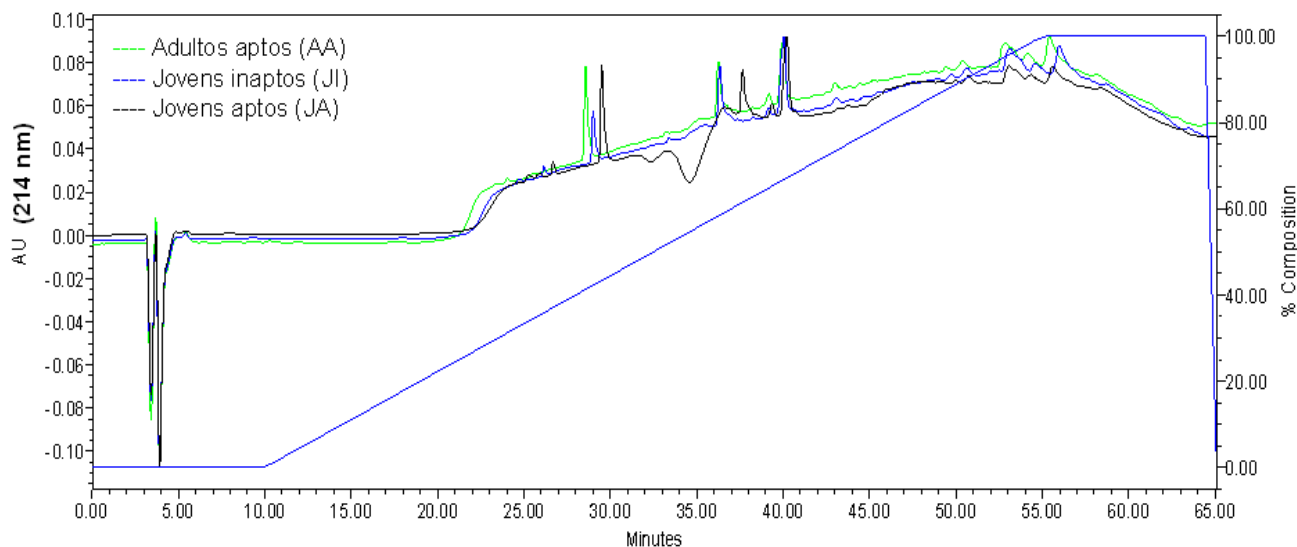


Figura 13. Perfis cromatográficos de fase reversa das amostras de plasma seminal de touros jovens aptos (JA), jovens inaptos (JI) e adultos aptos à reprodução (AA), com o tempo de retenção (Minutes), absorvância a 214nm (AU), e o gradiente de acetronitrila (linha azul), da sexta fração da troca catiônica (TC6).

Proteínas e peptídeos vêm sendo identificados em plasma seminal de touros por eletroforese bidimensional por diversos autores. Jobim et al. (2004) relataram que bandas protéicas de 11-12kDa foram as principais proteínas encontradas no seu estudo, porque estão presentes em todos os ejaculados, mas com maior concentração em touros doadores de sêmen de touros classificados como bons no processo de criopreservação de sêmen. Foram encontradas no presente estudo quatro valores de massas moleculares neste intervalo (10.162, 12.178, 12.910 e 13.560 Da), sendo que a massa de 10.162 foi também encontrada em um pico nos JI (TC3), e as outras nos JA (TC1). Chacur et al. (2006) utilizando a eletroforese bidimensional em plasma seminal de touros adultos da raça Nelore, observaram que as proteínas entre 9 e 12 kDa mostraram uniformidade de expressão nos touros com quadros espermáticos satisfatórios, segundo os critérios adotados pelo CBRA(1998). As bandas protéicas de 12 e 13kDa estavam presentes no plasma seminal de todos os animais considerados aptos à reprodução. Os autores ainda relatam que as bandas protéicas de 10kDa estão relacionadas com a baixa qualidade seminal. As visualizações de moléculas com baixas MM e em baixas concentrações é um

limitante da eletroforese bidimensional (Barggerman et al., 2003), sendo a MDLC uma técnica alternativa para a análise de peptídeos e de proteínas de MM baixa. Embora muito trabalhosa, permite recuperar proteínas nativas purificadas, que podem ser usadas para ensaios biológicos e na confirmação do envolvimento de proteínas envolvidas no metabolismo celular (Aebersold e Mann, 2003). Cerezo et al. (2007) utilizando touros holandeses coletados com uso de vagina artificial, submeteram o plasma seminal à cromatografia de afinidade por glicoproteínas para depois identificar massas moleculares por espectrometria de massa. Estes autores utilizaram o ácido sinapínico como matriz e encontraram massas de 4-90 kDa, classificando em seis grupos: 5,5-8,0 kDa, 10-12 kDa, 23,2-23,7 kDa, 26,1-27,5 kDa, 38-40 kDa e 90 kDa, sendo o grupo das proteínas de 10-12 kDa as que possuem maior concentração no sêmen e a 90 kDa a menor. Com os resultados deste experimento concluímos que os perfis cromatográficos protéicos foram diferentes entre os grupos, sugerindo que as proteínas aniônicas podem ser estudadas visando identificar marcadores protéicos para a aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore, pela análise proteômica do plasma seminal.

CAPÍTULO 2

TESTE HIPOSMÓTICO E QUALIDADE DO SÊMEN *IN NATURA* E CONGELADO/DESCONGELADO DE TOUROS ADULTOS DA RAÇA NELORE

EXPERIMENTO 3: Utilização de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempo de incubação na realização do teste hiposmótico e sua relação com a qualidade e congelabilidade de sêmen de touros da raça Nelore

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes osmolaridades e tempos de incubação ao se realizar o teste hiposmótico e suas correlações com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. Foram utilizados 30 ejaculados de seis touros adultos da raça Nelore. No sêmen *in natura* foi feita avaliação física e morfológica, a coloração supravital e o teste hiposmótico. Para o teste hiposmótico foram utilizadas soluções de citrato de sódio e frutose com osmolaridades de 60, 100, 150 mOsm/Kg e água destililada (19 mOsm/Kg) com 15, 30 e 60 minutos de período de incubação a 37 °C. Após a criopreservação, as amostras foram descongeladas e foram realizados os testes hiposmótico, coloração supravital, teste de termoresistência lento e a coloração fluorescente. Os valores médios e desvios padrões do percentual de espermatozóides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado foram $60,3 \pm 21,6$ e $30,8 \pm 11,8$, respectivamente. Não foram detectadas interações entre os tempos e as osmolaridades ($P > 0,05$), apenas a água destilada apresentou diferença em relação aos valores médios obtidos no teste hiposmótico realizado no sêmen *in natura* ($P < 0,05$). Não houve diferenças para os valores médios de espermatozóides reativos incubados nas diferentes soluções com diferentes osmolaridades para o sêmen congelado/descongelado ($P > 0,05$). Não houve diferença entre os valores médios de espermatozóides reativos incubados com diferentes tempos de incubação tanto no sêmen *in natura* e congelado/descongelado ($P > 0,05$). O teste hiposmótico correlacionou-se com as principais características de qualidade seminal e com os valores obtidos nos testes complementares ($P < 0,05$). Conclui-se que o teste hiposmótico pode ser realizado com 15 minutos de incubação e com uma solução que varie a osmolaridade de 60 a 150 mOsm/kg tanto em sêmen *in natura* como em congelado/descongelado, e que o teste hiposmótico é uma ferramenta complementar que pode ser utilizada na avaliação do sêmen *in natura* e criopreservado. Nenhum dos testes complementares

utilizados foi capaz de mostrar diferenças na qualidade seminal e na congelabilidade do sêmen dos touros nas condições experimentais do presente estudo.

Palavras-chave: Teste hiposmótico, *Bos indicus*, Criopreservação, Sêmen, Testes complementares

1 – INTRODUÇÃO

O teste hiposmótico avalia a atividade bioquímica da membrana plasmática intacta, devido ao influxo de água para o interior das células, vários autores têm reportado em sêmen *in natura* e congelado/descongelado que a integridade funcional da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico é uma importante ferramenta complementar para predizer a capacidade de fertilização do sêmen de bovinos (Revell e Mrode, 1994; Correa et al., 1997b; Bacinoglu et. al., 2008). Colorações com eosina/nigrosina e trypan-blue, também chamadas de colorações vitais, tem sido por décadas utilizadas para a avaliação da integridade física das membranas dos espermatozóides. Recentemente a coloração fluorescente tem sido empregada para a avaliação da integridade física da membrana plasmática. A microscopia de epifluorescência é mais específica e possui maior acurácia que a microscopia óptica (colorações vitais), sendo uma boa opção conjuntamente com o teste hiposmótico para a rotina em laboratórios de análise de sêmen (Brito et al., 2003; Vera-Munoz, 2009).

No entanto, não se entende completamente os resultados obtidos no teste hiposmótico, como também não existe uma padronização do protocolo para a realização da técnica em relação ao tempo de incubação e a osmolaridade da solução para sêmen de bovinos. Vários tempos de incubação em soluções hiposmóticas são relatados em estudos anteriores, 5 minutos (Correa et al., 1997a; Rota et al., 2000), 20 minutos (Tartaglione e Ritta, 2004), 30 minutos (Mocé e Graham, 2008) e principalmente 60 minutos (Revell e Mrode, 1994; Correa et al., 1997b; Brito et al., 2003; Bacinoglu et al., 2008; Vera-Munoz et al., 2009). Em relação a solução hiposmótica, a osmolaridade de 150mOsm/kg é a mais utilizada para a realização do teste no sêmen *in natura* (Revell e Mrode, 1994), e 100mOsm/kg para o sêmen congelado/descongelado (Revell e Mrode, 1994; Correa e Zavos, 1994). Mas esses autores utilizaram animais taurinos da raça holandesa de centrais de inseminação artificial. Existe a necessidade de padronização da técnica, principalmente para uma melhor comparação entre os autores. O teste hiposmótico avalia um importante aspecto de qualidade dos espermatozóides, mas não é utilizado como rotina nas avaliações andrológicas porque não existem parâmetros estabelecidos para a classificação de reprodutores. Vários estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão dos seus resultados, mas a falta de padronização da técnica é prejudicial, principalmente para a comparação dos resultados de diversos autores. Este estudo teve como objetivo avaliar diferentes osmolaridades e tempos de incubação na realização do teste hiposmótico e suas relações com a qualidade e congelabilidade do sêmen *in natura* e congelado/descongelado (medidos pelos testes de termo-resistência, supravital e coloração fluorescente) de touros adultos da raça Nelore criados em condições extensivas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais e criopreservação do sêmen

Foram utilizados neste experimento seis touros adultos das raça Nelore com idades variando de quatro a sete anos criados em condições extensivas no Setor de Gado de Corte da Universidade Federal de Viçosa. Foram obtidos pelo método de eletroejaculação, cinco ejaculados por touro. No sêmen *in natura* foram feitas as avaliações física e morfológica (já descritas no Experimento 1, itens 2.2 e 2.3), a coloração supravital e o teste hiposmótico. Posteriormente, cada ejaculado foi diluído em meio diluidor utilizado para a criopreservação (Tabela 1) e congelado em palhetas de polietileno (0,25 mL) com 30 milhões de espermatozoides total por dose e congeladas conforme protocolo preconizado por Morrow (1986). Foram utilizadas 5 horas de período de equilíbrio em geladeira a 4 °C, e 15 minutos a -80 °C (vapor do nitrogênio líquido) para posterior submersão e estocagem em nitrogênio líquido (-196 °C). Três amostras de cada partida criopreservada foram descongeladas para realização dos testes complementares (hiposmótico, coloração supravital, coloração fluorescente e teste de termo-resistência lento).

Tabela 1 - Composição química do diluente para a criopreservação de sêmen bovino (citrato-gema).

Componentes	Quantidade
Solução de citrato de sódio (2,94% em água tridestilada)	73 mL
D-Frutose	1,0g
Sulfato de estreptomicina	0,1 g
Penicilina G Sódica	100.000 UI
Gema de ovo	20 mL
Glicerol	7 mL
Total	100 mL

Fonte: Morrow (1986)

2.2 – Teste hiposmótico com diferentes soluções e tempos de incubação

Para o teste hiposmótico foram utilizadas soluções de citrato de sódio e frutose com osmolaridades de 60, 100, 150 mOsm/kg (Tabela 2) e água destilada (19 mOsm/kg) com 15, 30 e 60 minutos de período de incubação a 37 °C. As osmolaridades foram ajustadas e aferidas pelo método crioscópico (Henriques e Rosado, 1999), acrescentando mais água destilada. Depois do período de incubação foram acrescentados 0,5 mL de solução de formol salina para a fixação dos espermatozoides

e posteriormente feita a análise em microscopia de contraste de fase. Foram contabilizados 100 espermatozoides em aumento de 1000X e obtido o percentual de espermatozoides que tiveram seu flagelo curvando-se junto à membrana expandida, para depois ser calculada a percentagem de espermatozoides reativos, subtraindo do percentual de defeitos de cauda registrado no sêmen *in natura* (Melo e Henry, 1999). O mesmo procedimento foi utilizado para a realização do teste hiposmótico do sêmen congelado/descongelado.

Tabela 2 – Quantidades de citrato de sódio e frutose das diferentes soluções hiposmóticas utilizadas em sêmen bovino *in natura* e congelado/descongelada.

Componentes	Osmolaridades		
	60mOsm/kg	100mOsm/kg	150mOsm/kg
D-Frutose	5,4g	9g	13,5g
Citrato de sódio	2,9g	4,9g	7,3g
Água destilada	1000mL	1000mL	1000mL

2.3 – Coloração Supravital (Eosina-nigrosina)

A coloração supravital foi utilizada para a avaliação da integridade física da membrana plasmática, utilizando solução de Eosina (1 %) e Nigrosina (5 %) conforme descrito por Swanson e Bearden (1951). Após homogeneizar 10 µL de sêmen *in natura* com 10 µL de corante foi confeccionado um esfregaço sobre lâmina e após 30 segundos analisado em microscopia óptica com aumento de 400X. Foram contabilizadas 100 células espermáticas, onde as células íntegras permaneceram sem corar e as com danos a membrana coraram-se de rosa avermelhadas. O mesmo procedimento foi realizado para a avaliação do sêmen congelado/descongelado.

2.4 – Teste de termo-resistência lento

O teste de termo-resistência lento consiste em submeter o sêmen ao estresse térmico durante determinado tempo. Foi utilizado um banho-maria com circulador de água (Tecnal) a 37 °C durante três horas. O sêmen congelado em palhetas de 0,25 mL após seu descongelamento a 37 °C por 30 segundos foram acondicionados e homogeneizados em tubos plásticos de 1,5 mL. Durante o período de incubação, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos aspectos de motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático nos intervalos de 0, 60, 120, 180 minutos (Siqueira et. al., 2007).

2.5 – Coloração fluorescente

A coloração fluorescente foi realizada utilizando-se dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo, segundo a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990). Foram contabilizados 100 espermatozóides e classificados em íntegros, semi-lesados e lesados. Os espermatozóides íntegros coram-se pelo diacetato de carboxifluoresceína (verdes em toda extensão), os semi-lesados, o acrossomo e a membrana coram-se pelo diacetato de carboxifluoresceína, mas o núcleo se cora com o iodeto de propídeo (vermelho), e os lesados se coram de vermelho (Figura 1).

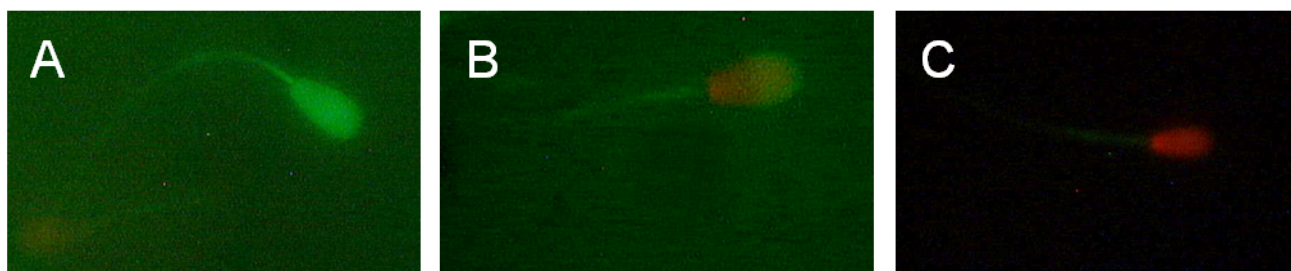


Figura 1. Espermatozóides íntegros (A), semi-lesados (B) e lesados (C) sob a microscopia de epifluorescência utilizando diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo (Fonte: arquivo pessoal do autor).

2.6 – Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o software SAEG versão 9.1.(SAEG-UFV, 2007). Os dados foram arranjados em fatorial com 2 tipos de sêmen, 3 tempos de incubação e quatro osmolaridades das soluções hiposmóticas, sendo 24 tratamentos por ejaculado. Análises descritivas quanto as médias, desvios-padrões e coeficientes de variação foram feitas para todas as características estudadas. O teste Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias entre grupos de tratamento foi estudada, utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para avaliar o efeito dos tempos de incubação e osmolaridade da solução hiposmótica no teste hiposmótico. Foram avaliados os efeitos entre touros e do mesmo touro sobre os aspectos físicos e morfológicos do sêmen, teste hiposmótico e de termo-resistência lento. Quando foi detectado efeito pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste t e o teste de Tukey (5%). O teste de Kruskal-Wallis (5%) foi realizado para a análise do efeito dos touros para as características turbilhonamento, concentração espermática do ejaculado, e o percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico. Correlação simples de Pearson foi realizada entre as características seminais e os testes

complementares empregados. Testaram-se as interações entre os tipos de sêmen (congelado/descongelado e *in natura*), três tempos de incubação e quatro osmolaridades de solução hiposmótica.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os touros foram classificados como aptos à reprodução segundo os critérios preconizados pelo CBRA (1998), apresentando ejaculados de boa qualidade durante todo período experimental. Os valores de circunferência escrotal ($34,4 \pm 2,6$ cm) e peso corporal (688 ± 122 Kg) foram normais para o manejo utilizado e idade. Em relação aos aspectos físicos do sêmen *in natura*, os valores médios da motilidade progressiva retilínea e vigor espermático apresentaram variação entre os touros ($P < 0,05$), mas o turbilhonamento e a concentração espermática por mL não apresentaram variação (Tabela 2). As médias dos percentuais de defeitos espermáticos maiores, de cauda e totais ($P < 0,05$) foram diferentes entre os touros (Tabela 2). Borges (2008) observou médias superiores de turbilhonamento, concentração espermática por mL em milhões e vigor (4,2, 1.468 e 4,4 respectivamente), mas uma média semelhante de motilidade espermática retilínea progressiva (76,8%) no sêmen *in natura*. As médias de defeitos maiores, de cauda e totais diferiram entre os animais ($P < 0,05$), mas todos os ejaculados apresentaram o percentual de patologias espermáticas dentro dos padrões aceitáveis para a criopreservação (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998). Borges (2008) observou médias superiores de defeitos espermáticos maiores (15,1%), menores (4,7%) e totais (19,9%) no sêmen *in natura*. Ao congelar sêmen de touros mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*), Vera-Munoz et al. (2009) observaram 21,4% de defeitos totais na análise morfológica do sêmen *in natura*. Brito et al. (2002) analisando a qualidade seminal de 68 touros zebuínos de central de inseminação artificial no Brasil, observaram uma motilidade espermática progressiva retilínea do ejaculado menor do que este experimento (59,3%), mas resultados muito semelhantes em relação a morfologia espermática (12,3% de defeitos maiores, 5% de defeitos menores e 17% de defeitos totais).

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros adultos da raça Nelore, criados em condições extensivas.

Touros	Motilidade	Vigor	Turb	Conc	Maiores	Menores	Totais
1	84,0 ± 4,1 ^a	3,7 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,4 ^A	792 ± 213 ^A	4,7 ± 1,4 ^c	1,9 ± 1,2 ^a	6,6 ± 1,6 ^b
2	81,2 ± 4,1 ^{ab}	3,3 ± 0,2 ^{ab}	2,0 ± 0,7 ^A	710 ± 343 ^A	7,7 ± 1,8 ^{bc}	2,1 ± 0,4 ^a	9,8 ± 1,7 ^{ab}
3	79,0 ± 6,5 ^{ab}	3,2 ± 0,4 ^{ab}	3,1 ± 0,7 ^A	890 ± 383 ^A	12,7 ± 2,7 ^{ab}	3,7 ± 2,7 ^a	16,4 ± 5,4 ^a
4	79,0 ± 5,4 ^{ab}	3,0 ± 0,1 ^b	2,6 ± 0,6 ^A	518 ± 126 ^A	14,7 ± 4,1 ^a	2,0 ± 1,6 ^a	17,5 ± 5,6 ^a
5	69,0 ± 10,2 ^b	3,2 ± 0,4 ^{ab}	2,5 ± 1,7 ^A	908 ± 713 ^A	11,6 ± 2,7 ^{ab}	3,1 ± 1,7 ^a	14,7 ± 3,8 ^a
6	79,0 ± 8,2 ^{ab}	3,0 ± 0,3 ^b	2,6 ± 0,8 ^A	700 ± 201 ^A	11,7 ± 3,9 ^{ab}	3,4 ± 2,1 ^a	15,1 ± 3,4 ^a
Média	78,5 ± 7,7	3,2 ± 0,3	2,6 ± 0,9	753 ± 372	10,5 ± 4,3	2,8 ± 1,7	13,3 ± 5,3

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Tukey a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. Motilidade = motilidade espermática progressiva retilínea (%); Vigor = vigor espermático (0-5); Turb = turbilhonamento ou movimento espermático de massa (0-5); Conc = concentração espermática por milhão em 1mL; Maiores = defeitos espermáticos maiores (%); Menores = defeitos espermáticos menores (%); Totais = defeitos espermáticos totais (%).

Corroborando com os resultados de Borges (2008) e Vera-Munoz et al. (2009) o percentual de espermatozoides reativos no teste hiposmótico do sêmen *in natura* foi maior que o congelado/descongelado (P<0,05) (Tabela 3), demonstrando os danos causados à membrana plasmática pelo processo de criopreservação. Borges (2008) verificou 66% de espermatozoides reativos no teste hiposmótico em sêmen *in natura* e 50% em sêmen congelado/descongelado. Vera-Munoz et al. (2009) obtiveram média de 68,1 % de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico no sêmen *in natura* e 48,8 % para sêmen congelado/descongelado de touros mestiços. No presente estudo foi observada após o processo de criopreservação, uma perda de 40% da motilidade progressiva retilínea espermática, valor aceitável conforme Watson (2000). Houve uma perda de 33,5% dos espermatozoides íntegros encontrados no teste supravital, e 49% no teste hiposmótico após o processo de criopreservação. O processo de criopreservação promove danos às membranas plasmáticas dos espermatozoides alterando seus domínios e função de várias proteínas (proteínas transportadoras de íons, por exemplo) importantes no metabolismo espermático. As mudanças de temperatura, estresse osmótico e toxicidade devido ao uso dos crioprotetores (exemplo glicerol), formação e dissolução dos cristais no ambiente extracelular, são as principais causas de injúrias subletais e letais aos espermatozoides (Watson, 2000).

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão do teste supravital e percentual de espermatozóides reativos após incubação em solução hiposmótica em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.

Touros	Supravital (N)	Hipo (N)	Supravital (C/D)	Hipo (C/D)
1	81 ± 4,9 ^a	52,2 ± 20,7 ^c	59,6 ± 9,1 ^a	25,1 ± 7,4 ^C
2	77,4 ± 6,1 ^a	64,6 ± 16,4 ^b	57,6 ± 12,7 ^a	33,6 ± 7,4 ^{AB}
3	82,8 ± 3,4 ^a	62,5 ± 21,0 ^b	36,6 ± 5,8 ^a	31,8 ± 9,1 ^B
4	74 ± 11,1 ^a	50,6 ± 19,8 ^c	55 ± 16 ^a	26,5 ± 7,8 ^{BC}
5	73,2 ± 13,4 ^a	52,3 ± 18,9 ^c	38,2 ± 14,1 ^a	27,2 ± 15,6 ^C
6	75,2 ± 7,1 ^a	79,0 ± 17,7 ^a	61,4 ± 18,1 ^a	40,4 ± 13,4 ^A
Média	77,2 ± 8,4	60,3 ± 21,6	51,4 ± 15,8	30,8 ± 11,8

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Tukey a 5%; ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. Supravital (N) = coloração com eosina-nigrosina do sêmen *in natura* (%); Hipo (N) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Supravital (C/D) = coloração com eosina-nigrosina do sêmen congelado/descongelado (%); Hipo (C/D) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico.

Os aspectos físicos (motilidade progressiva retilínea e vigor espermático) pós-descongelamento não diferiram entre os ejaculados obtidos dos diferentes touros (P>0,05) (Tabela 4). As médias da motilidade progressiva retilínea espermática do sêmen congelado e após a realização do teste de termoresistência lento foram mais baixas que as observadas por outros autores em touros adultos da raça Nelore. Siqueira et al. (2007) e Borges (2008) observaram 53,4% e 52,1% para a motilidade espermática progressiva retilínea ao descongelamento, e 33,04% e 34,44% após a realização do teste de termoresistência lento. Isto se deve ao fato que 23,3% das partidas não serem classificadas como aptas ao uso em programas de inseminação artificial segundo os critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), e esses autores utilizaram touros da raça Nelore de centrais de inseminação artificial. Mocé e Graham (2008) observaram uma pequena diminuição da motilidade progressiva retilínea espermática (de 47,6% para 41%) após as 3 horas de incubação no teste de termoresistência em sêmen de touros da raça holandesa. No presente estudo não foram detectadas diferenças entre as médias dos aspectos físicos do sêmen dos touros após a realização do teste de termo-resistência (P>0,05) (Tabela 4).

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de touros adultos da raça Nelore congelado/descongelado e após 3 horas de incubação (teste de termoresistência).

Touros	Motilidade	Vigor	Motilidade 3ª hora	↓ Motilidade	Vigor 3ª hora	↓ Vigor
1	54 ± 6,5 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	36 ± 5,4 ^a	18 ± 10,3 ^a	2,8 ± 0,4 ^a	0,4 ± 0,6 ^a
2	49 ± 9,6 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	27 ± 6,7 ^a	22 ± 10,4 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,4 ^a
3	44 ± 9,6 ^a	2,7 ± 0,2 ^a	20 ± 13,6 ^a	24 ± 17,1 ^a	2 ± 0,7 ^a	0,7 ± 0,6 ^a
4	46 ± 11,9 ^a	3,0 ± 0,1 ^a	25 ± 16,5 ^a	21 ± 6,5 ^a	1,8 ± 1,1 ^a	1,2 ± 1 ^a
5	39 ± 14,7 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	11 ± 16,7 ^a	28 ± 2,7 ^a	1,2 ± 1,3 ^a	1,4 ± 1 ^a
6	51 ± 17,8 ^a	3,2 ± 0,4 ^a	32 ± 17,8 ^a	19 ± 8,9 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	0,6 ± 0,4 ^a
Média	47,1 ± 12,2	2,9 ± 0,3	25,1 ± 14,9	22 ± 9,9	2,1 ± 0,9	0,8 ± 0,7

^{a,b,c} = letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey a 5%. Motilidade = motilidade espermática progressiva retilínea (%); Vigor = vigor espermático (0-5); Motilidade 3ª hora = motilidade espermática progressiva retilínea após 3 horas de incubação (%); ↓ Motilidade = diminuição da motilidade espermática progressiva retilínea após 3 horas de incubação; Vigor 3ª hora = vigor espermático após 3 horas de incubação (0-5); ↓ Vigor = diminuição do vigor espermático após 3 horas de incubação.

O percentual de células espermáticas viáveis registradas no teste supravital em sêmen congelado/descongelado (51,4%) (Tabela 3) foi menor do que o registrado por Tanghe et al. (2002) (69,5%) em touros taurinos. Tanghe et al. (2002) obtiveram uma média menor que a deste experimento em relação à motilidade espermática progressiva retilínea (47,1%). Estes autores observaram após o descongelamento, o percentual de espermatozóides íntegros no teste supravital foi maior nos touros com alta fertilidade na produção de embriões *in vitro*. No presente estudo não foram observadas diferenças nos percentuais de células íntegras no teste supravital entre os ejaculados dos diferentes touros, no sêmen *in natura* e no sêmen congelado/descongelado ($P > 0,05$) (Tabelas 3 e 5).

A média de espermatozóides reativos no teste hiposmótico foi semelhante a média descrita por Siqueira et al. (2007) (37,89%), que utilizaram sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore. Mocé e Graham (2008) obtiveram uma média de 44,69% espermatozóides reativos após o teste hiposmótico em sêmen de touros da raça holandesa. Correa et al. (1997b) e Bacinoglu et al. (2008) utilizando touros da raça holandesa classificados de baixa e alta fertilidade em programas de inseminação artificial, não observaram diferenças na motilidade espermática retilínea progressiva após o descongelamento entre as classes de touros. Correa et al (1997b) verificaram diferenças entre as médias dos percentuais de espermatozóides reativos no teste hiposmótico dos touros classificados como de baixa e alta fertilidade, sendo 31,7% para touros classificados como de baixa fertilidade e 41,9% para touros classificados como de alta fertilidade. Bacinoglu et al. (2008) não verificaram diferenças nos resultados do teste hiposmótico entre touros de baixa e alta fertilidade.

Foram detectadas diferenças entre os animais em relação ao teste hiposmótico no sêmen *in natura* e congelado/descongelado ($P < 0,05$). O touro 6 foi superior em relação ao hiposmótico no sêmen *in natura* e congelado ($P < 0,05$) (Tabela 3) e apresentou valores intermediários dos aspectos físicos e morfológicos do ejaculado (Tabelas 1 e 2), e os testes complementares utilizados no sêmen congelado (Tabela 5). Apenas os touros 1, 2 e 6 apresentaram todos os ejaculados e congelamentos dentro dos critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), sendo considerados touros de alta congelabilidade. Os touros 3 e 4 tiveram 20% das partidas de sêmen congelado fora dos padrões preconizados pelo CBRA (1998), e o touro 5 apresentou 80% das amostras congeladas fora do padrão, sendo o animal que apresentou os piores resultados de congelamento ($P < 0,05$). O touro 5 pode ser considerado de baixa congelabilidade, devido aos resultados durante o período experimental. O teste hiposmótico no sêmen *in natura* foi capaz de mostrar a superioridade do touro 6 ($P < 0,05$) e não foi verificada superioridade dos touros 1 e 2, sendo o touro 1 semelhante ao touro 5 (baixa congelabilidade do sêmen).

As médias dos resultados dos testes complementares tanto em sêmen *in natura* e congelado/descongelado dos touros 1 e 5 não diferiram (Tabelas 3, 4 e 5), mas quando se compara a frequência de congelamentos de acordo com as normas de qualidade (CBRA, 1998) o touro 1 é muito superior ($P < 0,05$).

Borges (2008) verificou um percentual de 41,5% de espermatozóides viáveis na coloração fluorescente, sendo superiores ao presente experimento (Tabela 5). Corroborando com Borges (2008) e Brito et al. (2003) foram observados valores inferiores de espermatozóides viáveis na coloração fluorescente em relação aos testes supravital e hiposmótico. Brito et al. (2003) afirma a maior especificidade e sensibilidade em detectar os danos físicos a membrana plasmática em relação ao teste supravital com eosina-nigrosina, mas ressalta que o teste hiposmótico analisa outra característica (integridade funcional da membrana plasmática), devendo ser utilizado ambos como rotina na avaliação de sêmen congelado/descongelado (Brito et al., 2003).

Tabela 6 - Valores médios e desvios-padrão dos resultados dos testes supravital, hiposmótico e coloração fluorescente em sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.

Touros	Supravital (C/D)	Hipo (C/D)	Epifluorescência		
			Intacto	Parcialmente lesado	Lesado
1	59,6 ± 9,1 ^a	25,1 ± 7,4 ^C	24 ± 8,7 ^{ab}	23,2 ± 8,4 ^a	52,8 ± 13,9 ^{ab}
2	57,6 ± 12,7 ^a	33,6 ± 7,4 ^{AB}	12,8 ± 9,1 ^b	23,2 ± 7,5 ^a	64,1 ± 12,6 ^{ab}
3	36,6 ± 5,8 ^a	31,8 ± 9,1 ^B	33,8 ± 11,1 ^a	21,4 ± 8,2 ^a	44,8 ± 7,7 ^{ab}
4	55,0 ± 16 ^a	26,5 ± 7,8 ^{BC}	23,5 ± 12,8 ^{ab}	16,5 ± 6,7 ^a	60,1 ± 19,4 ^{ab}
5	38,2 ± 14,1 ^a	27,2 ± 15,6 ^C	15,2 ± 5,7 ^{ab}	20 ± 12,1 ^a	64,8 ± 11,2 ^a
6	61,4 ± 18,1 ^a	40,4 ± 13,4 ^A	28,4 ± 9,9 ^{ab}	34,2 ± 7,9 ^a	37,4 ± 16,9 ^b
Média	51,4 ± 15,8	30,8 ± 11,8	22,9 ± 11,5	23,3 ± 9,5	53,75 ± 16,33

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. Supravital (C/D) = coloração com eosina-nigrosina do sêmen congelado/descongelado (%); Hipo (C/D) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico; Intacto = percentual de espermatozóides com a membrana intacta após a técnica de fluorescência; Parcialmente lesado = percentual de espermatozóides com a membrana parcialmente lesada após a técnica de fluorescência; Lesado = percentual de espermatozóides com a membrana lesada após a técnica de fluorescência.

Revell e Mrode (1994) ao testarem diferentes osmolaridades e tempos de incubação do teste hiposmótico concluíram que a osmolaridade de 150mOsm/kg com o tempo de incubação de 1 hora é a mais adequada para a realização do teste no sêmen *in natura*, e 100mOsm/kg com 1 hora de incubação para o sêmen congelado/descongelado. Corroborando com Revell e Mrode (1994) Correa e Zavos (1994) utilizando 20 partidas de sêmen congelado de dois touros taurinos, testaram diferentes osmolaridades de solução hiposmótica (variando de 50 a 300mOsm/Kg) e também concluíram que 100mOsm/Kg é a melhor osmolaridade a ser utilizada no teste hiposmótico no sêmen congelado/descongelado. Entretanto no presente estudo não foi detectada diferença entre os valores médios obtidos no teste hiposmótico empregando-se as osmolaridades de 60, 100 e 150 mOsm/kg para o sêmen *in natura* ($P > 0,05$), apenas diferindo os valores médios obtidos no teste hiposmótico empregando-se a água destilada (19mOsm/kg) ($P < 0,05$). Da mesma forma, não foram detectadas diferenças para os valores médios de espermatozóides reativos incubados em soluções com diferentes osmolaridades para o sêmen congelado/descongelado ($P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 7 - Valores médios e desvios-padrão do percentual de espermatozóides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore, após incubação em solução hiposmótica em diferentes osmolaridades.

Osmolaridade	Hipo (N)	Hipo (C/D)
19	42,8 ± 17,2 ^b	31,1 ± 11,2 ^a
60	62,2 ± 19,8 ^a	31,7 ± 12,8 ^a
100	67,1 ± 20,4 ^a	31,3 ± 11,8 ^a
150	69,4 ± 18,2 ^a	31,6 ± 10,9 ^a
Média Geral	60,3 ± 21,6	30,8 ± 11,8

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Tukey a 5%; Hipo (N) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Hipo (C/D) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico.

Não foram observadas diferenças entre os tempos de incubação para o sêmen *in natura* e o congelado/descongelado (P>0,05) (Tabela 7), indicando que os espermatozóides reativos dobram a cauda no início da incubação, não necessitando mais que 15 minutos para a realização do teste hiposmótico. Os resultados do presente experimento não corroboram com os achados de Revell e Mrode (1994), que observaram diferenças entre 20 minutos de incubação em solução hiposmótica e 1 hora, e preconizaram como ideal a incubação por 1 hora.

Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão do percentual de espermatozóides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore, após incubação em solução hiposmótica em diferentes tempos de incubação.

Tempo (minutos)	Hipo (N)	Hipo (C/D)
15	61,4 ± 21,2 ^a	30,7 ± 11,6 ^a
30	60,5 ± 22,1 ^a	31,1 ± 11,8 ^a
60	59,1 ± 21,6 ^a	30,6 ± 12,1 ^a
Média Geral	60,3 ± 21,6	30,8 ± 11,8

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (p<0,05) pelo teste de Tukey a 5%; Hipo (N) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Hipo (C/D) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico.

Correlações positivas e médias foram observadas do teste supravital realizado em sêmen *in natura* com a motilidade espermática progressiva retilínea (0,56) e o turbilhonamento (0,35), e

correlações positivas e altas foram observadas do teste supravital em sêmen congelado/descongelado com a motilidade progressiva retilínea e vigor espermático após o descongelamento (0,75 e 0,62, respectivamente) e a motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático após as 3 horas de incubação no teste de termoresistência (0,82 e 0,69, respectivamente). A integridade física da membrana plasmática tem uma relação com a qualidade do ejaculado e de amostras congeladas/descongeladas.

Os percentuais de espermatozóides reativos no teste hiposmótico em sêmen congelado se correlacionaram com a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático após o descongelamento com valores positivos e médios (0,38 e 0,34, respectivamente), corroborando com os achados de Borges (2008) (0,49) e Siqueira et al. (2006) (0,21), sendo inferiores aos de Vera-Munoz et al. (2009) com correlação alta e positiva (0,96). A motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático após as 3 horas de incubação no teste de a termoresistência correlacionaram-se com o teste hiposmótico com valores médios e positivos (0,41 e 0,37, respectivamente), diferente de Siqueira et al (2006) que registraram uma correlação alta e positiva (0,64). O teste supravital em sêmen congelado correlacionou-se com valores médios e positivos com o teste hiposmótico (0,39), corroborando com os achados de Brito et al., (2003), e o percentual de espermatozóides íntegros na coloração fluorescente em sêmen congelado (0,40). Brito et. al. (2003) obtiveram um valor alto e positivo (0,63) de correlação entre os resultados do teste hiposmótico e a coloração fluorescente. Correlações médias e negativas foram observadas entre o percentual de espermatozóides lesados na coloração fluorescente em sêmen congelado e o teste supravital (-0,32) e a motilidade espermática progressiva retilínea após as 3 horas de incubação no teste de termoresistência (-0,30). A integridade física da membrana plasmática (teste supravital) mostrou-se uma ferramenta importante na avaliação da qualidade do sêmen congelado/descongelado, visto a sua alta correlação com o principal teste complementar de qualidade de sêmen congelado (teste de termo-resistência lento), segundo as normas de comercialização publicada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, portaria nº 005/1996 (CBRA, 1998). O teste hiposmótico e a coloração fluorescente não se correlacionaram entre si, discordando dos resultados de Brito et al. (2003), mas se correlacionaram com coeficientes médios com os principais aspectos de qualidade seminal do sêmen congelado, corroborando com os achados de Borges (2008).

Os resultados do teste hiposmótico tanto em sêmen *in natura* e congelado/descongelado não foram eficientes em classificar os touros zebuínos quanto à congelabilidade do sêmen. Os testes de integridade física da membrana plasmática não foram capazes de classificar os touros quanto a

congelabilidade do sêmen. O teste hiposmótico e a coloração fluorescente podem ser importantes ferramentas para avaliação de sêmen bovino congelado/descongelado, haja vista a relação observada neste estudo com as principais características de qualidade seminal e testes complementares já utilizados como rotina na avaliação da qualidade seminal (teste de termo-resistência e supravital). Neste estudo se conclui que o teste hiposmótico pode ser realizado com 15 minutos de incubação e com uma solução que varie a osmolaridade de 60 a 150 mOsm/kg tanto em sêmen *in natura* como em congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.

EXPERIMENTO 4: Relação da concentração de sêmen no teste hiposmótico com a qualidade do sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estudar diferentes proporções sêmen: solução hiposmótica na realização do teste hiposmótico e suas relações com a congelabilidade do sêmen de touros zebuínos. Foram utilizados 15 ejaculados de 3 touros adultos da raça Nelore. No sêmen *in natura* realizou-se a avaliação física e morfológica, a coloração supravital e o teste hiposmótico. Para o teste hiposmótico foi utilizada uma solução com osmolaridade de 100 mOsm/Kg com 15 minutos de período de incubação a 37 °C, tanto em sêmen *in natura* e congelado/descongelado. Foram utilizadas quatro quantidades de sêmen em 1mL de solução hiposmótica, 10, 20, 50 e 100µL. As amostras criopreservadas foram descongeladas e foram realizados os testes hiposmótico, coloração supravital, teste de termo-resistência lento e a coloração fluorescente. Os valores médios e desvios padrões do percentual de espermatozoides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado foram $69,3 \pm 11,8$ e $20,5 \pm 6,8$, respectivamente. Não houve correlação do teste hiposmótico com os aspectos físicos e morfológicos e os testes complementares realizado em sêmen *in natura* e congelado/descongelado. Correlações médias e positivas foram observadas entre os resultados do teste supravital e os o teste de termo-resistência em sêmen congelado/descongelado. Os resultados da microscopia de epifluorescência se correlacionaram com os resultados do teste de termo-resistência com valores positivos e médios. Nenhum teste de integridade de membrana plasmática dos espermatozoides foi capaz de classificar os touros quanto a sua congelabilidade do sêmen. Com os resultados deste experimento conclui-se que o teste hiposmótico pode ser realizado com 20-100µL em sêmen *in natura*, e 10 a 100 µL de sêmen congelado/descongelado em 1mL de solução hiposmótica, sem interferir em seus resultados, mas deve-se optar por 100µL tanto para sêmen *in natura* e congelado/descongelado, porque melhora consideravelmente a leitura das lâminas.

Palavras-chave: Teste hiposmótico, *Bos indicus*, Criopreservação, Macho, Testes complementares

1 - INTRODUÇÃO

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides deve ser utilizada como rotina na avaliação de sêmen congelado/descongelado, além de ter relações altas com a fertilidade de amostras de sêmen bovino congeladas em programas de inseminação artificial (Revell e Mrode, 1994; Correa et al., 1997b; Bacinoglu et al., 2008), é também outra informação no espermiograma, um outro aspecto de qualidade da membrana plasmática quando comparada aos testes de integridade física. O teste hiposmótico é utilizado em vários laboratórios com a finalidade de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática, mas com diferentes protocolos.

A falta de padronização do teste hiposmótico em relação a concentração do sêmen incubada com a solução hiposmótica, pode ser um problema na visualização dos espermatozoides da lâmina em microscopia de contraste de fase, tanto em sêmen *in natura* e congelado/descongelado. Revell e Mrode (1994) recomendaram a utilização de 5-10 μ L de sêmen *in natura* (dependendo da concentração do ejaculado) em 1 mL de solução hiposmótica, mas se o ejaculado estiver com aspecto aquoso ou opalescente a leitura da lâmina em contraste de fase se torna difícil devido a quantidade pequena de espermatozoides por campo. Isto se torna mais problemático quando se trata de amostras congeladas/descongeladas. Correa et al. (1997b), Siqueira et al. (2007) e Borges (2008) utilizaram 20 μ L de sêmen congelado/descongelado em 1 mL de solução hiposmótica, enquanto Correa e Zavos (1994), Correa et al. (1997a) e Vera-Munoz et al. (2009) utilizaram 100 μ L de sêmen congelado/descongelado em 1mL de solução hiposmótica. Outros autores utilizaram diferentes proporções de sêmen congelado/descongelado e solução hiposmótica (Revell e Mrode, 1994; Brito et al., 2003). Este estudo teve como objetivo avaliar as diferentes proporções sêmen: solução hiposmótica na realização do teste hiposmótico e suas relações com a qualidade e congelabilidade do sêmen *in natura* e congelado/descongelado (medidos pelos testes de termo-resistência, supravital e coloração fluorescente) de touros adultos da raça Nelore criados em condições extensivas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais e criopreservação do sêmen

Foram utilizados neste experimento três touros adultos das raça Nelore, com idades variando de 4 a 5 anos, criados em condições extensivas. Os ejaculados foram obtidos pelo método de eletroejaculação, cinco ejaculados por touro, totalizando 15 ejaculados. Para o sêmen *in natura* foi feita avaliação física e morfológica (conforme descrito no experimento 1, itens 2.1), a coloração supravital e

o teste hiposmótico. O procedimento de criopreservação foi o mesmo que o descrito no experimento 4, apenas foi utilizado o diluidor para criopreservação de sêmen bovino Bioxcell® (Tabela 1). Três amostras de cada partida criopreservada foram descongeladas para realização dos testes complementares (hiposmótico, coloração supravital, coloração fluorescente e teste de termo-resistência lento).

Tabela 1 - Composição química do diluidor base (Bioxcell® - IMV).

Componentes	Quantidade
Tris	2,3g
Citrato de sódio	6,2g
Cloreto de potássio	0,8g
Frutose	1,2g
Lactose monohidratada	0,8g
Glicina	0,2mL
Glicose anidra	0,5g
Taurina	0,005g
Sulfato de gentamicina	0,24mL
Tartrato de tilosina	0,33g
Linconspectina 100	0,38g
Glicerol	40,2mL
Hidrato de lactato de cálcio	0,7g
Lecitina de soja	1,5g
Ácido cítrico monohidratado	2,5g
Água ultra pura q.s.p.	1000 mL

Fonte: IMV® - BRASIL

2.2 – Teste hiposmótico com diferentes proporções sêmen: solução hiposmótica

Para o teste hiposmótico foi utilizada uma solução de citrato de sódio e frutose com osmolaridade de 100 mOsm/Kg com 15 minutos de período de incubação a 37 °C, tanto em sêmen *in natura* e congelado/descongelado (Martins et al., 2009). Foram utilizadas quatro quantidades de amostra de sêmen em 1mL de solução hiposmótica, 10, 20, 50 e 100µL. As osmolaridades foram ajustadas e aferidas pelo método crioscópico (Henriques e Rosado, 1999). Depois do período de incubação foram acrescentados 0,5 mL de solução de formol salina para a fixação dos espermatozóides e posteriormente feita a análise em microscopia de contraste de fase. Foram contabilizados 100

espermatozoides em aumento de 1000X e obtido o percentual de espermatozoides que tiveram seu flagelo curvando-se junto à membrana expandida, para depois ser calculada a porcentagem de espermatozoides reativos subtraindo do percentual de defeitos de cauda registrado no sêmen *in natura* (Melo e Henry, 1999). O mesmo procedimento para o sêmen *in natura* em relação ao teste hiposmótico foi realizado no sêmen congelado/descongelado.

2.3 – Coloração Supravital (Eosina-nigrosina)

A coloração supravital foi realizada como descrito no experimento 4, item 2.3.

2.4 – Teste de termo-resistência lento

O teste de termo-resistência lento foi realizada como descrito no experimento 4, item 2.4.

2.5 – Coloração fluorescente

A coloração fluorescente foi realizada como descrito no experimento 4, item 2.5.

2.6 – Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SAEG versão 9.1. (SAEG-UFV, 2007). Os dados foram arrançados em fatorial de 2 tipos de sêmen (*in natura* e congelado/descongelado), 4 quantidades de sêmen em 1mL (10, 20, 50 e 100 μ L) na realização do teste hiposmótico, sendo 8 tratamentos por ejaculado. Análises descritivas quanto as médias, desvios-padrões e coeficientes de variação foram feitas para todas as características estudadas. O teste Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas. A homogeneidade das variâncias para cada grupo de tratamento foi estudada, utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para avaliar o efeito das diferentes concentrações de sêmen na realização do teste hiposmótico. Foram também avaliados os efeitos dos touros e ejaculados nos aspectos físicos e morfológicos, teste hiposmótico, termo-resistência lento, e coloração fluorescente. Quando foi detectado efeito pelo teste F, os dados foram comparados pelo teste t e o teste de Tukey (5%). O teste de Kruskal-Wallis (5%) foi realizado para a análise do efeito dos touros para vigor espermático após realizado o teste de termoresistência no sêmen congelado/descongelado. Correlação simples de Pearson foi realizada para verificar as relações das características seminais entre os testes realizados. Testaram-se as interações entre os tipos de sêmen (congelado/descongelado e *in natura*) e quatro concentrações de sêmen na realização do teste hiposmótico.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os touros foram classificados como aptos à reprodução segundo os critérios preconizados pelo CBRA (1998), apresentando ejaculados de boa qualidade durante todo período experimental. Os valores de circunferência escrotal ($35,1 \pm 3,5$ cm) e peso corporal (686 ± 92 Kg) foram normais para o manejo utilizado e idade. Ao se analisar os aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura*, os animais apenas diferiram entre si em relação aos defeitos espermáticos maiores ($P < 0,05$) (Tabela 2). Borges (2008) observou médias superiores de turbilhonamento, concentração espermática por mL em milhões e vigor (4,2, 1.468 e 4,4 respectivamente), mas uma média semelhante de motilidade espermática retilínea progressiva (76,8%) no sêmen *in natura*. Borges e Brito et al. (2002) observaram médias superiores de defeitos espermáticos maiores, menores e totais no sêmen *in natura*. As médias dos aspectos físicos e morfológicos foram muito semelhantes ao experimento 4, mas observou-se uma pequena diminuição no turbilhonamento e concentração espermática por mL.

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* de touros adultos da raça Nelore, criados em condições extensivas.

Touros	Motilidade	Vigor	Turb	Conc	Maiores	Menores	Totais
1	$78 \pm 5,7^a$	$3,2 \pm 0,2^a$	$0,8 \pm 0,6^a$	686 ± 114^a	$10,9 \pm 2,4^{ab}$	$1,4 \pm 0,9^a$	$12,3 \pm 2,5^a$
2	$77 \pm 7,5^a$	$3,5 \pm 0,1^a$	$2,1 \pm 0,9^a$	680 ± 198^a	$15,9 \pm 5,3^a$	$2,9 \pm 1,3^a$	$18,8 \pm 6,5^a$
3	$77 \pm 2,7^a$	$3,3 \pm 0,3^a$	$1,8 \pm 1,1^a$	760 ± 461^a	$7,9 \pm 2,3^b$	$2,8 \pm 2,3^a$	$10,7 \pm 3,6^a$
Média	$77,3 \pm 5,1$	$3,3 \pm 0,3$	$1,6 \pm 1,1$	682 ± 283	$11,5 \pm 4,8$	$2,4 \pm 1,6$	$13,9 \pm 5,5$
CV	6,8	7,3	64,8	41,5	41,2	70,2	39,7

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. Motilidade = motilidade espermática progressiva retilínea (%); Vigor = vigor espermático (0-5); Turb = turbilhonamento ou movimento espermático de massa (0-5); Conc = concentração espermática por milhão em 1mL; Maiores = defeitos espermáticos maiores (%); Menores = defeitos espermáticos menores (%); Totais = defeitos espermáticos totais (%).

Como no Experimento 4, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os de Borges (2008) e Vera-Munoz et al. (2009) onde o percentual de espermatozóides reativos no teste hiposmótico do sêmen *in natura* foi maior que o congelado/descongelado ($P < 0,05$) (Tabela 3), demonstrando os danos causados à membrana plasmática pelo processo de criopreservação. Após o processo de criopreservação, houve uma perda de 50% da motilidade progressiva retilínea espermática, valor aceitável conforme Watson (2000). Mas se observou uma perda de 52% do teste supravital e 70% do teste hiposmótico de células viáveis. O processo de criopreservação promove danos às membranas

plasmáticas dos espermatozoides alterando os domínios e função de várias proteínas (proteínas transportadoras de íons, por exemplo) importantes no metabolismo espermático, causando injúrias subletais e letais aos espermatozoides (Watson, 2000). As perdas no processo de criopreservação nos resultados de motilidade progressiva retilínea espermática, percentuais de espermatozoides viáveis nos teste de avaliação de membrana plasmática foram maiores que as observadas no Experimento 4.

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão do teste supravital e percentual de espermatozoides reativos após incubação em solução hiposmótica em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros da raça Nelore.

Touros	Supravital (N)	Hipo (N)	Supravital (C/D)	Hipo (C/D)
1	80,8 ± 5,5 ^a	68,3 ± 16 ^a	35,4 ± 12,8 ^a	19,3 ± 8,6 ^a
2	82,6 ± 8,9 ^a	70,9 ± 7,1 ^a	47,2 ± 5,4 ^a	23,3 ± 5,3 ^a
3	85 ± 3,2 ^a	68,8 ± 13,4 ^a	37 ± 10,1 ^a	25 ± 6,9 ^a
Média	82,8 ± 6,1	69,3 ± 11,8	39,8 ± 10,6	20,5 ± 6,8

^{a,b,c} = letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%; Supravital (N) = coloração com eosina-nigrosina do sêmen *in natura* (%); Hipo (N) = percentual de espermatozoides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Supravital (C/D) = coloração com eosina-nigrosina do sêmen congelado/descongelado (%); Hipo (C/D) = percentual de espermatozoides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico.

Assim como no Experimento 4, os aspectos físicos (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) pós-descongelamento não diferiram entre os ejaculados obtidos dos diferentes touros ($P > 0,05$) (Tabela 4). As médias da motilidade espermática progressiva retilínea do sêmen congelado/descongelado e após a realização do teste de termoresistência lento foram mais baixas que as observadas por outros autores em touros adultos da raça Nelore (Siqueira et al., 2006; Borges 2008). Neste estudo 60% das partidas de sêmen congeladas foram classificadas como aptas para uso em programas de inseminação artificial, segundo os critérios preconizados pelo CBRA (1998). O animal 2 apresentou os melhores congelamentos, com 100% das partidas de sêmen congelado aptas para uso em programas de inseminação artificial, enquanto que os outros dois animais apenas com 40% de suas partidas aprovadas. Não foram observadas diferenças das médias dos touros de motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático após a realização do teste de termo-resistência ($P > 0,05$). Mas, diferente do Experimento 4, foram observadas diferenças entre as médias dos touros na diminuição da motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático após a realização do teste de termo-resistência ($P < 0,05$). O touro 2 teve a menor perda da motilidade progressiva retilínea e

vigor espermáticos durante o teste de termo-resistência ($P < 0,05$) (Tabela 4), sendo o teste de termo-resistência o único teste complementar que mostrou diferenças entre as médias dos touros de alta (touro 2), média e/ou baixa (touros 1 e 3) congelabilidade do sêmen. Vianna et al. (2009) utilizando em um programa de inseminação artificial amostras de sêmen congelado/descongelado reprovadas pelo teste de termo-resistência lento (0% de motilidade espermática progressiva retilínea após o término do teste), observou taxas de gestação semelhantes as amostras congeladas/descongeladas que apresentaram acima de 40% de motilidade progressiva retilínea espermática após a realização do teste. O teste de termo-resistência lento é capaz de avaliar touros e ejaculados com boa congelabilidade, mas não consegue prever a capacidade fecundante em programas de inseminação artificial (Vianna et al., 2009).

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos do sêmen de touros adultos da raça Nelore congelado/descongelado e após 3 horas de incubação (teste de termo-resistência).

Touros	Motilidade	Vigor	Motilidade 3ª hora	↓ Motilidade	Vigor 3ª hora	↓ Vigor
1	$38 \pm 5,7^a$	$3,1 \pm 0,2^a$	$13 \pm 7,5^a$	25 ± 5^a	$2,4 \pm 0,5^A$	$0,7 \pm 0,6^{AB}$
2	$39 \pm 6,5^a$	$3,4 \pm 0,2^a$	$29 \pm 7,4^a$	$10 \pm 6,1^b$	$3,1 \pm 0,2^A$	$0,3 \pm 0,2^B$
3	$40 \pm 11,7^a$	$3,6 \pm 0,4^a$	$17 \pm 23,8^a$	$23 \pm 12,5^{ab}$	$1,3 \pm 1,7^A$	$2,3 \pm 1,4^A$
Média	$39 \pm 7,83$	$3,3 \pm 0,3$	$19,6 \pm 15,6$	$19,3 \pm 10,4$	$2,2 \pm 1,2$	$1,1 \pm 1,2$

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%. ^{A,B,C} = letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. Motilidade = motilidade espermática do sêmen congelado/descongelado (%); Vigor = vigor espermático do sêmen congelado/descongelado (0-5); Motilidade 3ª hora = motilidade espermática do sêmen congelado/descongelado após 3 horas de incubação (%); ↓ Motilidade = diminuição da motilidade espermática após 3 horas de incubação; Vigor 3ª hora = vigor espermático do sêmen congelado/descongelado após 3 horas de incubação (0-5); ↓ Vigor = diminuição do vigor espermático após 3 horas de incubação.

A média do percentual de células espermáticas viáveis registradas no teste supravital (39,8%) (Tabela 3) foi menor do que o verificado no Experimento 4 (51,4%), e Tanghe et al. (2002) (69,5%) com touros taurinos. Tanghe et al. (2002) obtiveram uma média maior que a deste experimento (47,1%) em relação à motilidade espermática progressiva retilínea após o descongelamento (39%) (Tabela 4). No presente estudo, não foram observadas diferenças nos percentuais de células íntegras nos testes supravital e hiposmótico entre os ejaculados dos diferentes touros, no sêmen *in natura* e no congelado/descongelado ($P > 0,05$) (Tabela 3).

A média de espermatozóides reativos no teste hiposmótico foi inferior a Siqueira et al. (2008) (37,89%), que utilizou sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore. Correa et al. (1997b), Bacinoglu et al. (2008) e Mocé e Graham (2008) observaram médias superiores ao presente experimento (Tabela 5) utilizando touros taurinos.

A média dos percentuais dos espermatozóides íntegros avaliados sob microscopia de epifluorescência foi muito baixa em relação a outros autores (Brito et al., 2003; Borges, 2008), e ao Experimento 4. Corroborando com Borges (2008) e Brito et al. (2003) foram observados valores inferiores de espermatozóides viáveis na coloração fluorescente em relação aos testes supravital e hiposmótico em sêmen congelado/descongelado. Não houve diferenças entre as médias dos percentuais de espermatozóides íntegros na coloração fluorescente dos touros ($P > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão dos resultados dos testes supravital, hiposmótico e coloração fluorescente em sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore.

Touros	Supravital (C/D)	Hipo (C/D)	Epifluorescência		
			Intacto	Parcialmente lesado	Lesado
1	35,4 ± 12,8 ^a	19,3 ± 8,6 ^a	9,4 ± 4,5 ^a	13,6 ± 5,7 ^a	75,0 ± 8,7 ^a
2	47,2 ± 5,4 ^a	23,3 ± 5,3 ^a	11,6 ± 5,9 ^a	19,0 ± 8,9 ^a	69,4 ± 11,3 ^a
3	37,0 ± 10,1 ^a	25,0 ± 6,9 ^a	10,0 ± 5,5 ^a	11,2 ± 7,3 ^a	76,8 ± 10,3 ^a
Média	39,8 ± 10,6	20,5 ± 6,8	10,3 ± 5	14,6 ± 7,6	73,7 ± 9,9

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%. Supravital (C/D) = coloração com eosina-nigrosina do sêmen congelado/descongelado (%); Hipo (C/D) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hiposmótico; Intacto = percentual de espermatozóides com a membrana intacta após a técnica de fluorescência; Parcialmente lesado = percentual de espermatozóides com a membrana parcialmente lesada após a técnica de fluorescência; Lesado = percentual de espermatozóides com a membrana lesada após a técnica de fluorescência.

Na tabela 6 observa-se as diferenças entre as médias das concentrações de sêmen *in natura* na realização do teste hiposmótico ($P < 0,05$), apenas a utilização de 10µL foi diferente ($P < 0,05$). Pode ser a influencia de uma diluição excessiva dos componentes do plasma seminal na preservação da integridade funcional da membrana plasmática durante a incubação hiposmótica (Maxwell e Johnson, 1999). Isto não foi observado no sêmen congelado/descongelado, pois não houveram diferenças entre as proporções de sêmen: solução hiposmótica na realização do teste hiposmótico em sêmen congelado:descongelado ($P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios e desvios-padrão do percentual de espermatozóides reativos em sêmen *in natura* e congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore, após incubação em solução hipoosmótica com diferentes quantidades de sêmen em 1 mL de solução hiposmótica.

Amostra de sêmen	Hipo (N)	Hipo (C/D)
10 µL	69,3 ± 11,8 ^b	22,5 ± 7,0 ^a
20 µL	76,6 ± 8,1 ^{ab}	21,4 ± 7,4 ^a
50 µL	82,2 ± 3,6 ^a	20,4 ± 7,3 ^a
100 µL	78,4 ± 6,6 ^a	17,8 ± 5,1 ^a
Média	69,3 ± 11,8	20,5 ± 6,8

^{a,b,c} = letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Tuckey a 5%; Hipo (N) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen *in natura* após o teste hiposmótico; Hipo (C/D) = percentual de espermatozóides reativos do sêmen congelado/descongelado após o teste hipoosmótico.

Nenhuma correlação foi observada do teste hiposmótico com os aspectos físicos, morfológicos e os testes complementares realizado em sêmen *in natura* e congelado/descongelado. Foi observada uma correlação média e positiva entre o teste supravital realizado em sêmen *in natura* e o turbilhonamento (0,45), este importante aspecto físico na avaliação da qualidade do ejaculado de ruminantes (CBRA, 1998). Correlações médias e positivas foram observadas entre o teste supravital em sêmen congelado/descongelado e o vigor espermático após o descongelamento (0,47) e a motilidade espermática progressiva retilínea após a realização do teste de termo-resistência (0,48), como também uma correlação média e negativa com a diminuição da motilidade espermática progressiva retilínea durante o teste de termo-resistência (-0,44), que demonstra a importância do supravital em prever a congelabilidade do sêmen congelado/descongelado. Correlações positivas e médias também foram observadas do percentual de íntegros após a coloração fluorescente realizada em sêmen congelado/descongelado com a motilidade espermática progressiva retilínea após o descongelamento (0,5) e após a realização do teste de termo-resistência (0,52). De maneira geral características se correlacionam com valores médios, devido aos inúmeros fatores que influenciam a sobrevivência dos espermatozóides após o processo de criopreservação do sêmen.

Nenhum teste de integridade de membrana plasmática dos espermatozóides foi capaz de classificar os touros quanto à congelabilidade do sêmen. A coloração fluorescente pode ser uma importante ferramenta complementar para avaliação de sêmen bovino congelado/descongelado, haja vista a relação observada neste estudo com as principais características de qualidade seminal e testes complementares já utilizados como rotina na avaliação da qualidade seminal (teste de termoresistência

e supravital). Pode-se concluir que o teste hiposmótico pode ser realizado com 20-100 μ L em sêmen *in natura*, e 10 a 100 μ L de sêmen congelado/descongelado em 1mL de solução hiposmótica, sem interferir em seus resultados, mas deve-se optar por 100 μ L tanto para sêmen *in natura* e congelado/descongelado, porque melhora consideravelmente a leitura das lâminas.

CONCLUSÕES GERAIS

O teste hipósmótico não pode ser utilizado para predizer o potencial reprodutivo de touros da raça Nelore. Mas por avaliar outro aspecto da membrana plasmática dos espermatozóides e as suas relações com os principais aspectos da qualidade seminal e outros testes complementares, deve ser estudado para uma melhor compreensão dos resultados. A microscopia de epifluorescência é mais específica e sensível que a microscopia óptica, detectando um maior número de espermatozóides com danos a membrana plasmática.

Os perfis cromatográficos foram diferentes entre touros adultos aptos, jovens aptos e jovens inaptos à reprodução mostrando que a análise das proteínas de caráter aniônico pode ser utilizada para predizer a aptidão reprodutiva de touros da raça Nelore. A análise proteômica do plasma seminal em associação à avaliação andrológica pode ser uma ferramenta promissora para predizer a aptidão reprodutiva em touros, mas diversos experimentos deverão ser realizados para se compreender melhor os seus resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R. ; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.
- BACINOGLU, S.; TAS, M.; CIRIT, U.; OZDAS, B., O.; AK, K. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. **An. Repr. Sci.**, v.104, p. 38-46, 2008.
- BAGGERMAN, G., VERLEYEN, P. ; CLYNEN, E. ; HUYBRECHTS, J. J. De LOOF, A. ; SCHOOF, L. Peptidomics. **J. Chr. B**, v. 803, p. 3-16, 2004.
- BARTH, A., D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State University, 1989. p. 285.
- BELLIN, E.; OYARZO, N.; HAWKINS, E.; OYARZO, J. N. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **J. An. Sci.**, v. 76, p. 2032-2039, 1996.
- BERGMANN, J., A., G. Seleção de zebuínos para precocidade sexual. In: I SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1999, Viçosa. **Anais...** Viçosa, p.51-64, 1999.
- BLOMM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **Nor. Vet. Méd.**, v. 25, p. 383-39, 1973.
- BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. 2008. 70p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Jaboticabal, 2008.
- BRADFORD, M., .M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRITO, L .F.; SILVA, A. E.; UNANIAN, M. M.; DODE, M. A., N. ; BARBOSA, R. T. ; KASTELIC, J. P. Sexual development in early and latematuring *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriog.**, v.62, p.1198-1217, 2004.
- BRITO, L. F. C. ; SILVA, A. E. D. F. ; RODRIGUES, L. H. ; VIEIRA, F. V. ; DERAGON, L. A. G. ; KASTELIC, J. P. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriog.**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, PANICH, S. P. L. KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriog**, v. 60, p. 1539–1551, 2003.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.
- CEREZO, A. S. ; GIUDICISSI, S. L. ; ERRA-BALSELLS, R. ; SATO, Y. ; NONAMI, H. ; MARQUINEZ, A. C. ; WOLFENSTEIN-TODEL, C. ; CEREZO, J. M. S. Direct UV-MALDI-TOF MS analysis of (glyco)proteins of fractions of bovine seminal plasma. **Envir. Contr. Bio.**, v. 45, p. 267-290, 2007.
- CHACÓN, J.; PÉREZ, E. ; MULLER, E. ; SODERQUIST, L. ; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriog**, v. 52, p. 221-231, 1999.
- CHACUR, M. G. M. ; MARTINEZ, A. I. S. ; NETO, N. B. M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Vet. Not.**, v. 12, p. 87-93, 2006.
- CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. **Theriog.**, v. 44, p. 963-971, 1995.
- CORREA, J. R. ; HEERSCHKE, G. ; ZAVOS, P. M. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. **Theriog.**, v. 47, p. 715-721, 1997a.
- CORREA, J. R. ; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test : it's employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriog.**, v. 42, p. 351-360, 1994.
- CORREA, J. R.; PACE, M. M; ZAVOS, P. M. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriog.**, v. 48, p. 721-731, 1997b.
- CROSS, N.. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol. Repr.**, v. 59, p. 7-11, 1998.
- CUNEO, M. F.; VICENTI, L. M.; MARTINI, A. C.; PONCE, A. A.; RUIZ, R. D. Effects of PDC-109 on sperm functional activity in presence or absence of heparin. **Theriog.**, v. 62, p. 207-216, 2004.

- DACHEUX, JEAN-LOUIS ; BELLEANNÉE, C. ; JONES, R. ; LABAS, V. ; BELGHAZI, M. ; GUYONNET, B. ; DRUART, X. ; GATTI, J., L. ; DACHEUX, F. Mammalian epididymal proteome. **Mol. Cell. Endo.**, v. 306 p. 45-50, 2009.
- de GRAAF, S. P. ; LEAHY, T. ; MARTI, J. ; EVANS, G. ; MAXWELL, W. M. C. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. **Theriog**, v. 70, p. 1360-1363, 2008.
- DEN DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **An. Repr. Sci.**, v. 28, p. 87-94, 1992.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insuline-like growth factor-II. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 5776-5780, 1994.
- DIAS, J. C. ; ANDRADE, V. J. ; DO VALE FILHO, V. R. ; E SILVA, M. A. Biometria testicular e aspectos andrológicos de touros Nelore (*Bos taurus indicus*), de dois e três anos de idade, criados extensivamente. **Vet. Not.**, v. 13, p. 31-37, 2007.
- DREVIUS, L. O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **J. Reprod. Fert.**, v. 28, p. 41-54, 1972.
- EINSPANIER, R. ; AMASELGRUBER, W. ; SINOWATZ, F. ; HENLE, T. H. ; ROPKE, R. ; SHAMS, D. Localization and concentration of a new bioactive acidic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus*). **J. Reprod. Fert.**, v. 98, p. 241-244, 1993.
- ELLIS, R. W.; RUPP, G. P.; CHENOWETH, P. J.; CUNDIFF, L. V.; LUNSTRA, D. D. Fertility of yearling beef bulls during mating. **Theriog**. 64:657-678, 2005.
- EVANS, A. C. O.; DAVIES, F. J.; NASSER, L. F. ; BOWMAN, P. ; RAWLINGS, N. C. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls and changes in semen characteristics at puberty. **Theriog.**, v. 43, p. 569-578, 1995.
- FAHMI, H. A., HUNTER, A. G., MARKHAM, J. F. B., SEGUIN, E. Immunosuppressive activity of bovine seminal plasma on bovine lymphocytes *in vitro*. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 2315-2321, 1985b.
- FAHMI, H. A.; HUNTER, A. G.; MARKHAM, J. F. B.; SEGUIN, E. Identification of an immunosuppressive protein in bovine seminal plasma with activity against bovine lymphocytes. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 2322-2328, 1985a.
- FRASER, L. R. The role of small molecules in sperm capacitation. **Theriog.**, v. 70, p. 1356-1359, 2008.

- FRASER, L. R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.; BAXENDALE, R. W.; Samra MEDEDOVIC, S.; OSIGUWA, O. O. First messenger regulation of mammalian sperm function via Adenylyl Cyclase/cAMP. **J. Reprod. Develop.**, v. 51, p. 37-46, 2005.
- FRENETTE, G.; LESSARD, C.; MADORE, E.; FORTIER, M. A.; SULLIVAN, R. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 1586-1592, 2003.
- GADELLA, B. M. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 43, p. 12-19, 2008.
- GADELLA, M. B.; COLENBRANDER, B.; CARDOZO, L. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 381-386, 1991.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G.; MARSHALL, C. E.; DEJARNETTE, J.,M.; ALLEN, C. H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriog.**, v. 56, p. 31-40, 2001.
- GRESSLER, S. L.; BERGMANN, J. A. G.; PEREIRA, C. S.; PENNA, V. M.; PEREIRA, J. C. C.; GRESSLER, M. G. M. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas Nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, 2000.
- GUIMARÃES, J. D. Maximização do uso de touros à campo. In: I SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1999, Viçosa. **Anais...** Viçosa, p.296, 1999.
- GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; MUELLER, J. L. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biol. Reprod.**, v. 75, p.501-507, 2006.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 513.
- HANCOCH, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Royal Microscopic Society**, v. 76, p. 84-97, 1957.
- HARRISON, R. A.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.88, p.343-52, 1990.
- HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J. F.; GRIEL, L. C. Jr. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 390-397, 1995.
- HENRIQUES, G. S.; ROSADO, G. P. Formulação de dietas enterais artesanais e determinação da osmolaridade pelo método crioscópico. **Rev. Nutr. Camp.**, v. 12, p. 225-232, 1999.

- HOEFLICH, A.; REICHENBACH, H. D.; SCHWARTZ, J.; GRUPP, T.; WEBER, M. M.; FOLL, J.; WOLF, E. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. **Dom. An. Endocr.**, v. 17, p. 39-51, 1999.
- JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B. TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriog.**, v. 61, p. 255-266, 2004.
- KENNEDY, S. P. ; SPITZER, J. C. ; HOPKINS, F. M. ; HIGDON, H. L. ; BRIDGES, W. C. Breeding soundness evaluation of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. **Theriog.** v. 58, p. 947-961, 2002.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- LARSSON, B. ; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility ? **An. Reprod. Sci.**, v. 61, p. 327-336, 2000.
- LOPES, F. G.; GUIMARÃES, J. D.; DA COSTA, E. P.; DE CARVALHO, G. R.; NETO, T. M. Avaliação andrológica por pontos e comportamento sexual em touros da raça Nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 38, p. 1018-1025, 2009.
- LUNSTRA, D. D.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **J. An. Sci.**, v. 55, p. 638-648, 1982.
- MANJUNATH, P.; SOUBEYRAND, S.; CHANDONNET, L., ROBERTS, K. D. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. **Bioch. J.**, v. 49, p. 121-128, 1994.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **J. Reprod. Immun.** v. 53, p. 109-119, 2002.
- MARENGO, S. R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **An. Reprod. Sci.**, v. 105, p. 52-63, 2008.
- MARTINS, L. F.; PEREIRA, M. C. B.; GUIMARÃES J. D.; DA COSTA, E. P.; SILVEIRA, T. S.; TORRES, C. A, A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Rev. Brás. Zootec.**, v.35, n.4, p.1651-1657, 2006.
- MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; PARAIZO, R. M.; DE OLIVEIRA, R. R.; GUIMARÃES, J. D.; CASTILHO, E. F.; NEVES, J. G. S.; DA SILVA, P. T. Relação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempo de incubação no teste hiposmótico com a congelabilidade de sêmen

- de touros da raça Nelore. In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, v. XX, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.
- MATOUSEK, J.; KLAUDY, J. Qualitative and quantitative analyses of seminal ribonuclease in reproductive tract fluids of bulls. **An. Reprod. Sci.**, v. 51, p. 111-118, 1998.
- MAXWELL, W. M, C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. **Theriog.**, v. 52, p. 1353-1362, 1999.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. **Arq. Brás. Vet. Zootec.**, v.51, n.1. p.71-78, 1999.
- MOCÉ, E. ; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **An. Reprod. Sci.**, v. 105, p. 104-118, 2008.
- MORROW, D., A. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders 1986, p. 1143.
- MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J. Andr.**, v. 27, p. 201–211, 2006.
- MOURA, A. M. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **An. Reprod.**, v.2, n.1, p. 3-10, 2005.
- MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A. ; KOC, H. ; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **An. Reprod. Sci.**, v. 98, p. 169-188, 2007.
- MUIÑO, R. ; TAMARGO, C. ; HIDALGO, C. O. ; PEÑA, A. I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls : Effects of cryopreservation and between-bull variation. **An. Reprod. Sci.**, v. 109, p. 27-39, 2008.
- MUIÑO-BLANCO, T. ; PÉREZ-PÉ, R. ; PÉREZ-CEBRIÁN, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reprod. Dom. An.**, v. 43, p. 18-31, 2008.
- NAGY, Z. P. Sperm centriole dysfunction and sperm immotility. **Mol. Cell. Endocr.**, v. 166, p. 59-62, 2000.
- NEVEROVA, I.; VAN EYKB, J. E. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. **J. Chrom B**, v. 815, p. 51-63, 2005.
- PANGAWKAR, G. R.; SHARMA, R. D.; SHARMA, R. Phosphatase and transaminase activity in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of sêmen. **Theriog.**, v. 29, p. 1393-1399, 1988.

- PRATHALINGAM, N. S. ; HOLT, W. V. ; REVELL, S. G. ; MIRCZUK, S. ; FLECK, R. A. ; WATSON, P. F. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. **Theriog.**, v. 66, p. 1894-1900, 2006.
- QUIRINO, C. R.; BERGMANN, J. A., G. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in Nelore bulls using uni and bivariate animal models. **Theriog.**, v. 48, p. 1398-1396., 1998.
- REVELL, S. G., MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **An. Reprod. Sci.**, v. 36, p. 77-86, 1994.
- REYES-MORENO, C. ; BOILARD, . ; SULLIVAN, R. ; SIRARD, MARC-ANDRÉ. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 159-166, 2002.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment ? **Reprod. Dom. An.**, v. 41, p. 2-10, 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and Prediction of Fertility : still utopia ? **Reprod. Dom. An.**, v. 38, p. 312-318, 2003.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In : Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, **Anais...** Goiânia : CBRA, 2005. p. 1-9.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriog.**, v. 68S, S138-146, p. 2007.
- ROMÃO, M, J. ; KOLLN, I. ; DIAS, J. M. ; CARVALHO, A. R. ; VARELA, P. F. ; SANZ, L. ; TOPFER-PETERSEN, E. ; CALVETE, J. J. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution : a bovine polypeptide of the spermadhsin family. **J. Mol. Biol.**, v. 274, p. 650-660.
- ROTA, A. ; PENZO, N. ; VINCENTI, L. ; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriog.**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.
- SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncomensable traits in semen. **Theriog.**, v. 70, p. 473-478, 2008.
- SAEG. **Sistema de análise estatística e genética – SAEG versão 9.1.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados, 2007. p.68.
- SAEZ, F. ; FRENETTE, G. ; SULLIVAN, R. Epididymosomes and prostasomes : their roles in post-testicular maturation of the sperm cells. **J. Andr.**, v. 24, p. 149-154, p. 2003.

- SALVADOR, D. F. ; ANDRADE, V. J. ; VALE FILHO, V. R. ; DIAS, J. C. ; NOGUEIRA, L. A. G. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). **Arq. Brás. Vet. Zootec.** v. 60, p. 587-593, 2008.
- SANTOS, M. D.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R., M.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA FILHO, J. M. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro: vaca. **Arq. Brás. Vet. Zootec.** v. 56, p. 497-503, 2004.
- SHONECK, C. BRAUN, J. EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriog.**, v. 45, p. 633-642, 1996.
- SINSINTHY, S.; BHARGAVA, P. M.; SCHEIT, K. H. Immunological identification of seminalplasmin in tissue extract of sex glands of bull. **Biol. Reprod.**, v. 30, p. 1237-1241, 1984.
- SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; Marc HENRY, TORRE, C. A. A.; da SILVA, M. V. G. B.; NETO, T. M.; SILVEIRA, T. da SILVA; LOPES, F. G. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 36, p. 387-395, 2007.
- SMIKLE, C. B. ; TUREK, P. J. Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 47, p. 200-203, 1997.
- SWANSON, E, W.; BEARDEN, H, J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **J. An. Sci.**, v. 10, p. 981-987, 1951.
- TANGHE, S. ; VAN SOOM, A. ; STERCKX, V. ; MAES, D. ; de KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reprod. Dom. An.**, v. 37, v. 127-137, 2002.
- TARTAGLIONE, C. M. ; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriog.**, v. 62, p. 1245-1252, 2004.
- THERIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 590-598, 1999.
- TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from boer goat spermatozoa. **Theriog.**, v. 42, p. 547-555, 1994.
- VAISBERG, C. N. ; JELEZARSKY, L. V. ; DISHLIANOVA, B. ; CHAUSHEV, T. A. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. **Theriog.**, v. 64, p. 416-428, 2005.

- VALENTIM, R. ; ARRUDA, R. P. ; BARNABÉ, R. C. ; ALENCAR, M. M. Biometria testicular de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) e touros cruzados Nelore-europeu (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) aos 20 e 24 meses. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.**, v. 39, p. 113-120, 2002.
- VERA-MUNOZ, O. ; AMIRAT-BRIAND, L. ; DIAZ, T. ; VÁSQUEZ, L. ; SHCMIDT, E. ; DESHERCES, S. ; ANTON, M. ; BENCHARIF, D. ; TAINTURIER, D. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender : Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. **Theriog.**, v. 71, p. 895-900, 2009.
- VIANNA, F. P. ; PAPA, F. O. ; ZHAB, F. S. ; MELO, C. M. ; DELL'AQUA Jr. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **An. Reprod. Sci.**, v. 113, p. 279-282, 2009.
- VISCONTI, P. E. ; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1-6, 1998.
- WATSON, P. F. The causes of fertility with cryopreserved semen. **An. Reprod. Sci.**, v. 61, p. 481-492, 2000.
- WEMPE, F. ; EINSPANIER, R. ; SHCEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma : acidic seminal fluid protein. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 183, p. 232-237, 1992.