

Influência das estações seca e chuvosa no plasma seminal (SDS-PAGE) e características do ejaculado de touros *Bos taurus indicus*

Influence of the dry and rainy seasons upon plasma seminal (SDS-PAGE) and characteristics of the ejaculate from bulls *Bos taurus indicus*

Marcelo George Mungai Chacur^{1*}; Andrea Marisol Novoa Castillo²; Luciana Machado Guaberto³

Resumo

O desequilíbrio na espermatogênese inclui diminuição na motilidade e aumento de espermatozoides alterados. O plasma seminal exerce efeito na função espermática. O objetivo foi avaliar a influência das estações seca e chuvosa nas características do sêmen e proteínas do plasma seminal. Onze touros *Bos taurus indicus* com 34 a 38 meses de idade foram submetidos cada um a 12 colheitas de sêmen com eletroejaculador, 6 na estação seca e 6 na chuvosa, a cada 14 dias, totalizando 144 amostras. Características qualitativas e quantitativas foram avaliadas, sendo as amostras centrifugadas (1.500 g / 15 min) e estocadas (-20°C). As proteínas foram extraídas e quantificadas para as eletroforeses. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Houve diferença entre estações para o vigor ($P < 0,01$), defeitos menores e totais ($P < 0,05$); e não para o volume, motilidade e defeitos maiores. A ocorrência do número de bandas esteve entre 6 e 125 kDa. A banda de 26 kDa esteve presente em 100% dos touros na estação chuvosa. As bandas de 6, 9 e 125 kDa mostraram alta frequência nas estações seca e chuvosa. Conclui-se que os resultados demonstraram variação na distribuição de bandas nas estações seca e chuvosa; e que as estações do ano alteram a qualidade do sêmen com melhoria do vigor e redução das patologias espermáticas na estação seca.

Palavras-chave: Touro *Bos taurus indicus*, estação, sêmen, plasma seminal, eletroforese

Abstract

Disruptions in sperm production include decreased sperm motility and increased of abnormal sperm. Seminal plasma appears to exert important effects on sperm function. The objective was to evaluate the dry and rainy season influence on the seminal characteristics and semen plasma proteins. Eleven bulls with ages ranging from 34 to 38 months were submitted each one to 12 semen collect with eletroejaculation 6 on dry season and 6 on rainy season with 14 days interval, totalizing 144 samples. Qualitative and quantitative semen characteristics were evaluated. Samples of semen were centrifuged (1.500 g / 15 minutes) and conditioned and stored (-20°C) until further processing. The proteins were extracted and quantified to electrophoresis performed. Variance analysis and Tukey test 5% was used. The semen vigor ($P < 0.01$), minor defects and total defects ($P < 0.05$) showed statistical difference between seasons, while the volume, motility and minor defects did not ($P > 0.05$). The number of bands occurred between 6 and 125 kDa. The molecular band of 26 kDa was present in 100% of bulls in rainy season. The molecular bands of 6, 9 and 125 kDa showed a high frequency in dry and rainy season. In conclusion, these results showed a band distribution variation throughout the season and the year

¹ Prof. do Setor de Reprodução Animal, FCA, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Medicina Veterinária, Rod. Raposo Tavares, km 572, Campus II, CEP: 19.067-175, Presidente Prudente, SP. E-mail: chacur@unoeste.br

² Pesquisadora - Ex-orientada de Mestrado em Ciência Animal, UNOESTE. E-mail: mrchacur@uol.com.br

³ Profª Farmácia e Bioquímica. UNOESTE. E-mail: rachel@unoeste.br

* Ator para correspondência

seasons changed the semen quality with increase sperm vigor and reduction of abnormal sperm on dry season.

Key words: Zebu bulls, season, sêmen, seminal plasma, electrophoresis

Introdução

A baixa eficiência reprodutiva em touros pode ser causada por mudanças climáticas que afetam a gametogênese (VALE FILHO, 2001). A variação sazonal foi abordada com enfoque nas características físicas e morfológicas espermáticas em bovinos criados nos trópicos, descrevendo que a queda na qualidade do sêmen pode ocorrer devido ao desconforto térmico dos animais frente às elevadas temperaturas (GALINA; ARTHUR, 1991).

A queda da motilidade espermática progressiva, a redução da produção espermática e a elevação da porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas são causadas por uma moderada elevação da temperatura testicular (KASTELIC et al., 2001). Desequilíbrios na espermatogênese incluem diminuição na motilidade e aumento de espermatozoides morfológicamente alterados (MEYERHOEFFER; WETTERMANN; COLEMAN, 1985).

A interação ambiente-espermatogênese resulta na habilidade dos touros para produzir sêmen (TAYLOR et al., 1985). No Brasil, Koivisto, Nogueira e Costa (1998) relataram maior percentual de espermatozoides anormais perante altas temperaturas e umidade relativa do ar; e Silva (1981) em condições ambientais similares, observou um maior volume dos ejaculados nos períodos chuvosos.

A interação entre os espermatozoides e o plasma seminal, relacionada com a fertilização, começou a ser estudada na década de 60 para fins de seleção de reprodutores criados em diferentes climas (SKINNER; LOUW, 1966). Agregando-se esses conhecimentos anteriores, sugeriu-se que as proteínas do líquido seminal atuam no metabolismo espermático (KILLIAN, 1993, 1999; KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993) os

quais relataram a presença de quatro “*proteínas associadas com a fertilidade*”. São conhecidas as funções de várias proteínas presentes no plasma seminal, como as que colaboram com a capacitação espermática (BERGERON, 2004).

Como pesquisa aplicada, os perfis eletroforéticos em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica, em casos de infertilidade em touros (GASSET; SAIZ; LAINEZ, 1997; MORTARINO; TEDESCHI; NEGRI, 1998). A composição dos fatores ambientais, como época do ano, atuando na qualidade do sêmen, foram descritas por Martins, Souza e Chirinéa (2006) em cães; nos caprinos (CUNHA; SALVIANO; VIEIRA, 2006); em búfalos pelos pesquisadores Castro, Pires e Castro Junior (2006) e em reprodutores bovinos por Chacur, Machado Neto e Cristancho (2006a). Considerando a predominância da criação extensiva e a monta natural é importante investigar a influência das estações seca e chuvosa sobre as características seminais e constituição protéica do plasma seminal de touros mantidos no campo.

O objetivo do experimento foi estudar os efeitos das estações seca e chuvosa sobre as características físicas e morfológicas do sêmen e a composição protéica do plasma seminal por meio da eletroforese SDS-PAGE em touros da raça Tabapuã.

Material e Métodos

Animais e local do experimento

Foram utilizados 11 touros da raça Tabapuã, com idades variando entre 34 e 38 meses, criados extensivamente em pasto de *Brachiaria decumbens*, com sal mineral e água *ad libitum*. Os touros foram submetidos às avaliações clínicas e espermáticas, para efeito de seleção para monta natural (MANUAL..., 1998).

O município de Presidente Prudente, estado de São Paulo, onde o experimento foi realizado apresenta latitude 21°29'50''S; longitude 49°14'2''W e altitude de 475m. Em 2008, ano do experimento, a temperatura média foi de 23,1°C, com massas de ar Tropicais e Polares com uma estação de inverno fria e seca, e um verão quente e chuvoso com precipitação média anual de 1.244 mm. No período quente chuvoso a temperatura máxima média mensal variou de 35,1 a 38,2°C, a mínima de 14,1 a 16,4°C. Já no período frio seco foram respectivamente 30,1 e 34,0°C; 10,9 e 12,9°C. Tendo em vista a constância de temperaturas elevadas e a delimitação das precipitações pluviométricas no município, consideraram-se apenas duas estações climáticas anuais: chuvosa e seca.

Análises realizadas

Doze colheitas de sêmen por meio de eletroejaculador automático foram efetuadas em cada um dos 11 touros, perfazendo 144 amostras analisadas, sendo seis colheitas na estação seca (meses entre maio e julho) e seis na estação chuvosa (meses entre outubro e dezembro), com intervalos de 14 dias entre as mesmas. Após as avaliações qualitativas e quantitativas do sêmen (MANUAL..., 1998), realizadas na propriedade e no Laboratório de Reprodução Animal da UNOESTE, Pres. Prudente-SP, as amostras foram centrifugadas a 1.500g/15 min, separando e estocando 1 mL do plasma seminal em criotubos de 1,5 mL, devidamente identificados e armazenados a -20°C para posterior realização das eletroforeses em SDS-PAGE, com extrações das proteínas (LAEMILLI, 1970) e quantificações (BRADFORD, 1976) das mesmas em espectrofotômetro (PF-901 Chemistry Analyser Labsystems).

A extração das proteínas foi realizada com a utilização de tampão composto por: *buffer* A – TRIS HCl (6,0 mL) pH 6,8 (4,0 mL), glicerol (6,4 mL), SDS 10% (6,4 mL), mercaptoetanol (1,6 mL) e água destilada (13,6 mL). Empregou-se uma relação de

2:1, colocando em tubo de ensaio 200µL de amostra e 1000µL do tampão de extração para cada amostra, mantendo por 3 minutos em ebulição. Após, as proteínas foram quantificadas em espectrofotômetro com solução contendo: Bradford (4,5 mL); NaCl 0,15 M (0,45 mL) e amostra de proteína (0,05 mL).

As amostras foram aplicadas em cuba eletroforética vertical 20x20cm (Omniphor®) ligada a (50V x 50mA/30min; e 300V x 16mA / 4 a 6h) uma fonte elétrica de 0 a 1000W (PWSYS EI®). A revelação das bandas protéicas foi feita em solução a 2% de *Comassie Brilliant Blue G-250*, com captura, visualização e processamento das imagens em transminador (Doc-IT-LS® 6.0 software). Os dados foram submetidos a análise de variância e posteriormente aplicou-se o teste de Tukey, a 5%, conforme Banzatto; Kronka (2006). A análise foi realizada por meio do software SAS (2005).

Resultados e Discussão

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para as características do sêmen: volume, motilidade espermática e defeitos maiores dos espermatozoides entre a estação seca e chuvosa. Para o vigor espermático, defeitos menores (14,99% e 20,84%) e defeitos totais (25,14% e 32,81%) dos espermatozoides, houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as estações seca e chuvosa, respectivamente (Tabela.1). O efeito das estações do ano, nas características do sêmen foi descrito em cães, revelando maior motilidade espermática na estação da primavera, com menor temperatura ambiente, em relação ao verão mais quente (MARTINS; SOUZA; CHIRINÉA, 2006). Na espécie caprina, a motilidade e o vigor espermático foram superiores na estação chuvosa em relação à estação seca (CUNHA; SALVIANO; VIEIRA, 2006). Diante de temperaturas amenas, no outono, melhor qualidade espermática foi obtida em búfalos (CASTRO; PIRES; CASTRO JUNIOR, 2006); e em bovinos da raça Nelore a motilidade foi superior na

estação chuvosa quando comparada à estação seca (OLIVEIRA; DUARTE; NASCIMENTO, 2006).

Em touros europeus e zebus, mantidos em Central de Inseminação Artificial na região Sudeste, Anchieta, Vale Filho e Colosimo (2005) observaram efeito negativo da estação chuvosa, descrita como a mais quente, sobre a motilidade espermática. Fields, Burns e Warnick (1979) na região considerada semi-tropical nos EUA, relataram para as duas subespécies bovinas maior motilidade espermática no período outono-inverno.

Touros da raça Nelore e Holandesa apresentaram maior vigor espermático na estação chuvosa em relação à seca (OLIVEIRA; DUARTE; NASCIMENTO, 2006). Em reprodutores zebus, na Índia, maior vigor espermático foi verificado na estação seca (TOMAR; KANAUIA, 1970).

Durante a primavera e o verão, com altas temperaturas, a porcentagem de defeitos espermáticos em zebus e europeus esteve elevada (KOIVISTO; NOGUEIRA; COSTA, 1998). Não houve diferença ($P>0,05$) para os defeitos maiores entre as estações seca e chuvosa para touros Nelore e Gir; bem como para os defeitos menores na raça Nelore (OLIVEIRA; DUARTE; NASCIMENTO, 2006). Na estação chuvosa, reprodutores da raça Holandesa apresentaram maiores porcentagens de defeitos totais (OLIVEIRA; DUARTE; NASCIMENTO, 2006). Em touros Nelore, na estação seca, os defeitos espermáticos maiores estiveram entre 15,9 a 17,4%; menores entre 18,1 e 23,1% e totais entre 25,4 e 30,2% (CHACUR et al., 2010).

Tabela 1. Médias das características do sêmen na estação seca (ES): meses entre maio e julho; e chuvosa (EC): meses entre outubro e dezembro, em touros da raça Tabapuã criados extensivamente.

ESTAÇÃO	VOLUME (mL)	MOT (%)	VIGOR (1 a 5)	DEF. M (%)	DEF. m (%)	DEF. T (%)
ES	3,89 a	56,00 a	2,09 a	19,05 a	14,99 b	25,14 b
EC	5,51 a	49,61 a	1,76 b	22,93 a	20,84 a	32,81 a

Em cada característica do sêmen, letras diferentes na coluna, indicam valores diferentes pelo teste de Tukey ($P<0,05$).
Legenda: DEF. M – defeitos maiores; DEF. m – defeitos menores; DEF. T – defeitos totais.

A variação sazonal foi abordada com enfoque nas características físicas e morfológicas espermáticas em bovinos criados nos trópicos, descrevendo que a queda na qualidade do sêmen pode ocorrer devido ao desconforto térmico dos animais frente às elevadas temperaturas (GALINA; ARTHUR, 1991). Houve diferença ($P<0,05$) significativa entre as estações seca e chuvosa para os defeitos menores, obtendo-se maior porcentagem na estação chuvosa. Diferença essa que pode estar relacionadas com a adaptação individual do processo espermatogênico e do transporte, maturação e armazenamento dos

gametas nos epidídimos.

No presente estudo, o volume do ejaculado, a motilidade espermática progressiva e os defeitos maiores dos espermatozoides não mostraram diferenças significativas entre as estações do ano. Essas representam algumas das características necessárias para tornar os espermatozoides hábeis para a fertilização (SANCHEZ-PARTIDA; WINDSOR; EPPLESTON, 1999; TARDIF et al., 1999). Dessa forma, sugere-se que o sêmen produzido na época da seca, apresenta melhores condições para ser processado e utilizado em

biotécnicas como a criopreservação.

A análise dos géis (Tabela 2) mostrou a seguinte distribuição: os pesos moleculares das bandas protéicas variaram entre 6 e 125 kDa. Do total de 15 bandas identificadas, nove (60%) apresentaram pesos moleculares abaixo de 50 kDa, das quais as de 6 e 20 kDa foram identificadas com porcentagens similar e igual, respectivamente, durante a estação seca e chuvosa. As bandas de 13, 17, 26, 35 e 44 kDa estiveram presentes com maiores variações na porcentagem de ocorrência entre as estações, onde somente a banda de 13 kDa revelou maior incidência na seca.

Doze bandas protéicas entre 15 e 26 kDa foram observadas por Jobim et al. (2003) em touros sem

relacioná-las com a estação do ano. São conhecidas as funções de várias proteínas presentes no plasma seminal, como a de 13 kDa que participa da capacitação espermática (BERGERON, 2004).

Bandas de alto peso molecular 55 e 105 kDa predominaram na seca e as de 66 e 80 kDa na estação chuvosa (Tabela 2) similar ao relato de Chacur, Machado Neto e Cristancho (2006a) em reprodutores da raça Limousin para a banda de 55 kDa na seca; diferindo das de 66 e 80 kDa que também revelaram maior incidência nessa época. Oberst et al. (2002) verificaram a presença das bandas de 55 e 66 kDa em reprodutores de origem taurina e zebuína, imunoidentificadas como osteopontina e albumina, respectivamente.

Tabela 2. Distribuição da frequência (%) nas estações seca (ES): meses entre maio e julho; e chuvosa (EC): meses entre outubro e dezembro para as bandas protéicas do plasma seminal de acordo com o peso molecular (kDa) em touros da raça Tabapuã criados extensivamente.

TOUROS	BANDAS (kDa)	ES (n=144)	EC (n=144)
a, b, c, d, e, f, h, i, j, k,	6	9/11 (81,81%)	10/11(90,90%)
a, b, c, d, e, f, g, h, j, k	9	10/11(90,90%)	8/11(72,72%)
d, e, f, h, i, j, k	12	7/11(63,63%)	5/11(45,45%)
a, b, c, d, e	13	5/11(45,45%)	1/11(9,09%)
a, b, c, e, f, g, j	17	3/11(27,27%)	7/11(63,63%)
a, d, e, f, j	20	3/11(27,27%)	3/11(27,27%)
a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k	26	6/11(54,54%)	11/11(100%)
a, b, c, e, f, h, i, j, k	35	4/11(36,36%)	7/11 (63,63%)
a, b, e, f, g, h, j, k	44	2/11(18,18%)	8/11(72,72%)
a, c, d, e, f, h, i, j	55	7/11(63,63%)	3/11(27,27%)
b, d, h, i, k	66	2/11(18,18%)	4/11(36,36%)
a, c, d, e, f, i, j, k	75	6/11(54,54%)	6/11(54,54%)
a, b, c, i	80	1/11(9,09%)	4/11(36,36%)
a, c, f, i, j	105	4/11(36,36%)	3/11(27,27%)
a, b, c, e, f, g, h, i, j, k	125	9/11 (81,81%)	10/11(90,90%)

Legenda: estação seca (ES); estação chuvosa (EC).

Dentre as bandas protéicas identificadas nas estações do ano, as porcentagens de ocorrência estiveram entre 9,09% e 100%, com variações entre os animais estudados. Na seca, em 81,81% dos touros esteve presente a proteína de 6 kDa e na estação chuvosa em 90,90% dos animais (Tabela 2). Wempe, Wagner e Kammer (1990) relataram que a proteína “seminalplasmin” de 6 kDa tem atividade antimicrobiana, capta íons Ca^{2+} para o espermatozóide nos epidídimos dos bovinos e inibe a proliferação de linfócitos.

Supõe-se que a banda protéica de 9 kDa presente em 90,90% dos touros e de 12 kDa em 63,63% dos animais, sejam do grupo das espermadesinas, tendo essas duas bandas uma maior incidência na seca, estação onde todos os touros apresentaram quadro espermático satisfatório, concordando com os relatos de Romão (2002) colaborando com a alta fertilidade dos reprodutores. Na estação chuvosa, as porcentagens inferiores de animais que revelaram a presença das bandas de 9 e 12 kDa foram respectivamente de 72,72% e 45,45% (Tabela 2), podendo as porcentagens superiores na seca de 90,90% e 63,63% estar relacionadas com o vigor espermático significativamente maior encontrado nessa estação.

A banda de 13 kDa foi observada em 45,45% dos animais na estação seca e em 9,09% na chuvosa. Supõe-se que a presença dessa banda protéica tenha contribuído para a melhoria da qualidade do sêmen na seca, concordando com Desnoyers (1994) descrevendo a proteína de 13 kDa como PDC-109, conferindo alta fertilidade aos touros.

Uma banda protéica de 17 kDa foi visualizada na seca em 27,27% dos animais e na época chuvosa em 63,63%. Conforme Vierula e Rajaniemi (1983) essa proteína atua como fator decapacitante para o espermatozóide, levando à queda na fertilidade em bovinos. Tendo como base esse relato, sugere-se que a alta percentagem de presença da banda de 17 kDa no verão possa estar relacionada ao aumento significativo ($p < 0,05$) dos defeitos menores

espermáticos e a queda do vigor espermático, observados nessa estação do ano.

Em taurinos, a proteína de 20 kDa esteve presente em 100% das amostras de plasma seminal em reprodutores Limousin, nas mesmas estações do ano (CHACUR; MACHADO NETO; RABESQUINE, 2004; CHACUR; MACHADO NETO, 2007). Provavelmente, o metabolismo espermático dos touros zebuínos dependa menos da proteína de 20 kDa, devido a maior adaptação ao calor, em relação às raças de origem européia.

O gel revelou a presença de uma proteína de 26 kDa, identificada em 54,54% das amostras na estação seca e em 100% na chuvosa. Houve incidência similar no inverno e inferior no verão para a proteína de 26 kDa em relação a descrita por Chacur e Machado Neto (2007) em taurinos. Essa proteína tem sido alvo de estudos por conferir baixa fertilidade aos touros de origem européia (KILLIAN, 1999); e no Brasil nas raças Limousin (CHACUR; RABESQUINE; MACHADO NETO, 2003) e Nelore das variedades padrão e mocho (CHACUR; MARTINEZ; MACHADO NETO, 2006b). Essa incidência de 100% durante a época chuvosa pode estar relacionada com a queda na qualidade do sêmen observada nos touros da raça Tabapuã.

Outra banda protéica revelada, apresentou peso de 44 kDa, estando presente em 18,18% dos touros na seca e em 72,72% na estação chuvosa. Vierula e Rajaniemi (1983) relataram que as proteínas de 40 e 44 kDa participam da reação acrossômica (RA), pois estão aderidas na membrana interna do acrossomo, colaborando com o influxo de cálcio no processo da RA.

A banda de 55 kDa esteve presente em 63,63% dos animais na época seca, reduzindo sua presença na estação chuvosa para 27,27%. Ação benéfica da proteína de 55 kDa sobre a qualidade do sêmen foi descrita, pertencendo ao grupo das osteopontinas identificada como uma das proteínas de fertilidade em touros (MOURA; KOC; CHAPMAN, 2006); e

modula a função celular pelos receptores, além de modificar as características da membrana plasmática do espermatozóide, participa da capacitação e favorece a fertilidade (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993; MORANI, 1998; CANCEL, 1999; GERENA; IRIKURA; EUCHI, 2000). A banda protéica de 55 kDa, esteve ausente na seca e presente em 44,44% dos touros Limousin na época chuvosa (CHACUR; MACHADO NETO; RABESQUINE, 2004, CHACUR; MACHADO NETO; CRISTANCHO, 2006a). A maior incidência na estação seca pode ter colaborado para a melhoria das características do sêmen, como vigor e morfologia espermática. Segundo Jobim et al. (2002) a osteopontina de 55 kDa está presente nas células de Sertoli e no epitélio dos túbulos seminíferos.

Uma banda com 66 KDa foi identificada em dois touros na seca e em quatro animais no período chuvoso. A literatura descreve essa banda e a denomina albumina, atuando no potencial gametogênico dos testículos (MORANI, 1998; KILLIAN, 1999) e atua na gametogênese colaborando com a nutrição celular da linhagem espermatozôica (JOBIM et al., 2002).

A eletroforese revelou a existência de uma proteína de 80 kDa, provavelmente a lactoferrina presente em um touro (9,09%) na estação seca e em quatro animais (36,36%) na chuvosa; a qual foi encontrada comumente no plasma seminal de garanhões (INAGAKI, 2002) e atua como antioxidante, protegendo a membrana plasmática dos espermatozoides (FOUCHECOURT; MÉTAYER; LOCATELLI, 2002).

Observou-se banda de 105 kDa em quatro touros (36,36%) na seca e em três (27,27%) na época chuvosa. A motilidade e o vigor espermático são parâmetros diretamente relacionados com o metabolismo do espermatozóide, sendo ambos os parâmetros superiores na presença dessa banda protéica. Gatti, Druart e Guérin (1999) identificaram proteínas do epidídimo, sendo a de

105 kDa relacionada com a melhoria da motilidade espermática.

A eletroforese identificou uma proteína de 125 kDa, presente em 81,81% dos touros no período seco e em 90,90% no chuvoso. A literatura consultada não traz relatos dessa proteína. Devido à alta frequência de distribuição, sua ação deve ser efetiva na maioria dos touros, independentemente das épocas avaliadas.

As bandas de 6, 9 e 125 kDa apresentaram nas duas estações as maiores percentagens de frequência dentre todas as bandas identificadas, o mesmo ocorrendo com a de 26 kDa no verão. Vale salientar que a atividade antimicrobiana da banda de 6 kDa nas duas épocas estudadas; bem como a presença da banda de 26 kDa em 100% dos animais na estação chuvosa, parece ter marcada influência nas características qualitativas e quantitativas do sêmen.

Conclusão

Novas investigações nas diferentes raças, faixas etárias e épocas do ano são necessárias para uma melhor compreensão dos fatores que levam à oscilação na frequência de observação das proteínas do plasma seminal na espécie bovina.

As características do sêmen: vigor e defeitos espermáticos menores e totais sofreram influência das estações, apresentando melhor qualidade na época de clima seco em relação ao clima chuvoso, possibilitando, nesse período, uma alternativa para intensificar o emprego do sêmen em biotécnicas. A distribuição da frequência das bandas protéicas provavelmente relacionadas com a fertilidade variou nas estações seca e chuvosa, sugerindo haver oscilação na fertilidade dos touros da raça Tabapuã.

O projeto de pesquisa do qual se originou o presente trabalho científico tramitou e foi APROVADO para execução junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNOESTE, protocolo 051/08, sendo o parecer emitido em 27/06/2008.

Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio financeiro e à UNOESTE pelo apoio logístico.

Referências

- ANCHIETA, M. C.; VALE FILHO, V. R.; COLOSIMO, E. Descarte e congelabilidade de sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 196-204, 2005.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. *Experimentação agrícola*. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 247 p.
- BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal plasma of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro: Ceres, v. 1, 2004. p. 226. (Resumo).
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, n. 3, p. 248-254, 1976.
- CANCEL, A. M. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biology of Reproduction*, New York, v. 60, n. 3, p. 454-460, 1999.
- CASTRO, T. A. M. G.; PIRES, R. M. I.; CASTRO JUNIOR, F. G. Seasonal effects on semen quality of Murrah buffalo bulls. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 250, 2006.
- CHACUR, M. G. M.; AURÉLIO, P. T. F.; OBA, E.; LAPOSY, C. B.; SCALON JÚNIOR, O.; INAGUE, L.; KRONKA, S. N. Influência de um nutracêutico no sêmen, testosterona, cortisol, eritrograma e peso corpóreo em touros jovens *Bos taurus indicus*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 2, p. 439-450, 2010.
- CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B.; CRISTANCHO, D. R. Winter-spring and summer influence upon seminal plasma proteins in bulls. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 251, 2006a.
- CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. *Veterinária Notícias*, Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 47-53, 2007.
- CHACUR, M. G. M.; MACHADO NETO, N. B.; RABESQUINE, M. M. Season influence upon seminal plasma proteins in bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro: Ceres, v. 1, 2004. p. 236. (Resumo).
- CHACUR, M. G. M.; MARTINEZ, A. I. S.; MACHADO NETO, N. B. 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*). *Veterinária Notícias*, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 87-93, 2006b.
- CHACUR, M. G. M.; RABESQUINE, M. M.; MACHADO NETO, N. B. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal: correlação com o quadro espermático. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 185-186, 2003.
- CUNHA, L. A. L.; SALVIANO, M. B.; VIEIRA, R. J. Climatic seasonality influence on physical and morphological aspects of goat semen. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 3, n. 3, p. 249, 2006.
- DESNOYERS, L. Characterization of the mayor proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Molecular Reproduction & Development*, London, v. 37, n. 4, p. 425-43, 1994.
- FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. *Journal of Animal Science*, Quebec, v. 48, n. 3, p. 1299-1304, 1979.
- FOUCHECOURT, S.; MÉTAYER, S.; LOCATELLI, A. F. Mammalian lipocalin - type prostaglandin D2 synthesis in the fluids of the male genital tract: Putative biochemical and physiological functions. *Biology of Reproduction*, New York, v. 66, n. 3, p. 468-477, 2002.
- GALINA, C. S.; ARTHUR, G. H. Review of cattle reproduction in tropics. Part 6. The male. *Animal Breeding Abstracts*, Sidney, v. 59, n. 1, p. 403-412, 1991.
- GASSET, M.; SAIZ, J. L.; LAINEZ, J. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *European Journal of Biochemistry*, London, v. 250, n. 4, p. 735-744, 1997.
- GATTI, J. L.; DRUART, X.; GUÉRIN, Y. Kilodalton protein in epididymal fluids of domestic mammals in angiotensin - I covering enzyme (ACE) evidence that sperm are the source of this ace. *Biology of Reproduction*, New York, v. 60, n. 1, p. 937-945, 1999.
- GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; EUCHI, N. Immunocytochemical localization of lipocalin. Type prostaglandin D synthase in the bull testis and epididymis on ejaculated sperm. *Biology of Reproduction*, New York, v. 62, n. 2, p. 547-556, 2000.
- INAGAKI, M. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. *Journal of*

- Veterinary Medical Science*, Tokyo, v. 64, n. 1, p. 75-77, 2002.
- JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; MATTOS, R. C. Albumin and osteopontin-proteins seminal plasma related with semen freezability. *Brazilian Journal of Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 26, n. 2, p. 296-305, 2002.
- _____. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 21-30, 2003.
- KASTELIC, J.; COOK, R. B.; PIERSON, R. A.; COULTER, G. H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production and seminal quality in 129 beef bulls. *Canadian Journal Veterinary Research*, Quebec, v. 65, n. 2, p. 111-115, 2001.
- KILLIAN, G. J. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, New York, v. 49, n. 2, p. 1202-1207, 1993.
- _____. The role of marker protein in reproductive efficiency. *Journal of Veterinary Science*, Seoul, v. 29, n. 2, p. 1112-1120, 1999.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, New York, v. 49, n. 3, p. 1202-1207, 1993.
- KOIVISTO, M. B.; NOGUEIRA, G. P.; COSTA, M. T. A. Seasonal variations of morphological abnormalities in bovine spermatozoa. In: SEMINAR ON ANIMAL REPRODUCTION AND BITECHNOLOGY FOR LATIN AMERICA, 4., 1998, Belém, PA. *Proceedings...* Belém, PA: Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, v. 2, p. 50-56, 1998.
- LAEMILLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, n. 2, p. 680-685, 1970.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.
- MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; CHIRINÉA, V. H. The effect of season on seminal characteristics in dogs. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 248, 2006.
- MEYERHOEFFER, D. C.; WETTERMANN, R. P.; COLEMAN, S. W. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *Journal of Animal Science*, Quebec, v. 60, n. 4, p. 352, 1985.
- MORANI, C. V. Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações na precocidade sexual em bovinos da raça Nelore doadores de sêmen. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.33, n. 2, p. 1015-1021, 1998.
- MORTARINO, M.; TEDESCHI, G.; NEGRI, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis*, Berlim, v. 19, n. 3, p. 797-801, 1998.
- MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology*, Washington, v. 27, n. 4, p. 201-211, 2006.
- OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; CIMAROSTI, H. I.; SOUZA, D. O.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; MATTOS, R. C. Iminoidentificação de albumina e osteopontina no plasma seminal de reprodutores taurinos e zebuínos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, n. 1, p. 21-28, 2002.
- OLIVEIRA, K. M.; DUARTE, A. M.; NASCIMENTO, M. R. B. M. Influência das estações seca e chuvosa sobre as características seminais de touros das raças Nelore, Gir e Holandês criados à pasto. *Veterinária Notícias*, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 145-151, 2006.
- ROMÃO, M. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (a SFP) at 1.9 resolution a bovine polypeptide of the espermadhesin family 1. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 274, n. 4, p. 650-660, 2002.
- SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; WINDSOR, D. P.; EPPELSTON, J. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*, Washington, v. 20, n. 2, p. 280-288, 1999.
- SAS Institute Inc., Version 9.1, 3th, Cary, NC: SAS Institute Inc, 2005.
- SILVA, J. L. *Causas da variação na quantidade e qualidade do sêmen de touros em colheita em centrais de inseminação artificial*. 1981. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Journal of Applied Physiology*, Washington, v. 21, n. 3, p. 1784, 1966.
- TARDIF, F.; LAFOREST, J. P.; CORMIER, N.; BAILET, J. L. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, London, v. 52, n. 3, p. 447-459, 1999.

TAYLOR, J. F.; BEAN, B.; MARSHALL, C. E.; SULLIVAN, J. J. Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, Washington, v. 68, n. 2, p. 2702-2722, 1985.

TOMAR, S. S.; KANAUIA, A. S. Seasonal variation in reaction time and sêmen characteristics of Hariana bulls. *Journal of Research Punjab Agriculture University*, Ludhiana, v. 7, n. 3, p. 541-545, 1970.

VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em touros: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 81-87, 2001.

VIERULA, M.; RAJANIEMI, H. Effect of seminal plasma and calcium on the stability of the surface protein composition of ejaculated bull spermatozoa. *Journal of Andrology*, Washington, v. 15, n. 3, p. 435-445, 1983.

WEMPE, F.; WAGNER, S.; KAMMER, H. V. D. Seminalplasmin the major basic protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of the seminal vesicle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 34, n. 2, p. 260-262, 1990.