

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA  
RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS  
ESPERMÁTICAS E NÍVEL SÉRICO DE  
TESTOSTERONA EM TOUROS DA RAÇA  
NELORE**

**Breno Moscheta Welter  
Médico Veterinário**

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL  
Dezembro de 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA  
RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS  
ESPERMÁTICAS E NÍVEL SÉRICO DE  
TESTOSTERONA EM TOUROS DA RAÇA  
NELORE**

**Breno Moscheta Welter**

**Orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

**Dezembro de 2006**

**Uberlândia - MG**

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Wanda e Danilo Welter, que são exemplos para mim de integridade, caráter e dignidade, responsáveis pela minha formação e pelo que sou hoje, e a minhas irmãs, Fernanda e Beatriz que sempre me apoiaram.

## Agradecimentos

Agradeço a Deus por guiar e abençoar o meu caminho,

Aos meus pais, que me proporcionaram a realização do mestrado,

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Octávio Jacomini, pela paciência, amizade, confiança, respeito e bom convívio durante o meu período de graduação e pós-graduação,

Aos professores, Dr. Marcelo Emílio Beletti e Dr. Fábio de Oliveira, por contribuírem de forma inestimável para a realização desse trabalho, com sugestões valiosas e sempre estarem dispostos a me atender nos momentos de dúvida,

Aos meus grandes amigos José Guilherme Souza Pinto, Monique Mendes Guardieiro e Cairo Antônio Guedes Júnior, que sempre me motivaram e acreditaram em mim,

Ao Prof. Dr. Cezinande Meira, por contribuir para a realização de parte do experimento no Laboratório de Reprodução Animal-FMVZ-UNESP/Botucatu,

Aos colegas do curso de pós-graduação, Elenir, Régis, Cláudio, Belchiolina, Fábio e Rogério, pela amizade criada durante esse período e que levarei comigo,

Ao pessoal e aos funcionários do laboratório de Biofísica e Histologia, que sempre me ajudaram e acompanharam todo meu trabalho,

A CAPES, pelo apoio financeiro (BOLSISTA),

Enfim, a todos que de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização dessa dissertação, deixo aqui o meu Muito Obrigado.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores individuais da circunferência escrotal (CE), volume (Vol), turbilhonamento (Turb), motilidade (Mot), vigor (Vig), concentração espermática (Conc), defeitos maiores (DM), defeitos menores (Dm), defeitos totais (DT) e concentração sérica de testosterona (Test) de touros da raça Nelore (n=55), Uberlândia-MG.....14
- Tabela 2. Valores, em média das características morfométricas das cabeças de espermatozóides, coeficiente de variação dos níveis de cinza (CV) e análise visual da integridade de cromatina (AT) de touros da raça Nelore (n=55), Uberlândia-MG.....16
- Tabela 3. Correlação de Pearson entre dos valores médios das características morfométricas, coeficiente de variação dos níveis de cinza da cabeça de espermatozóides e análise visual de cromatina anormais de touros da raça Nelore (n=55), Uberlândia-MG. ....17
- Tabela 4. Bandas, Peso Molecular Aparente (PMA), Média e Desvio padrão (Med±DP) da densitometria relativa e a frequência de cada banda (Freq) em touros da raça Nelore, Uberlândia-MG. ....20
- Tabela 5. Correlação de Pearson entre os valores médios da densitometria das bandas e as características físicas e morfológicas do sêmen de touros da raça Nelore (n=43), Uberlândia-MG. ....21
- Tabela 6. Correlação de Pearson entre os valores médios da densitometria das bandas e as características morfométricas do sêmen, coeficiente de variação dos níveis de cinza da cabeça de espermatozóides e análise visual de cromatina anormais de touros da raça Nelore (n=43), Uberlândia-MG.....24

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação da segmentação interativa das cabeças de espermatozóides: captura inicial da imagem (A), após a segmentação (B) e em tons de cinza pronto para análise na rotina computacional Scilab (C)..... 11
- Figura 2. Esfregaço de sêmen bovino corados com Azul de Toluidina, setas indicam morfologia normal e defeito de cromatina (a), morfologia alterada e defeito de cromatina (b) e morfologia alterada e cromatina normal(c)..... 15
- Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore (n=17), PM – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) e as bandas protéicas presentes em todos animais (B7, B12, B13, B18, B21, B24 e B25).....18
- Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore (n=18), PM – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) e as bandas protéicas presentes em todos animais (B7, B12, B13, B18, B21, B24 e B25).....19
- Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore (n=8), PM – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) e as bandas protéicas presentes em todos animais (B7, B12, B13, B18, B21, B24 e B25).....19

## PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E NÍVEL SÉRICO DE TESTOSTERONA

**RESUMO-** O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e verificar a sua relação com as características espermáticas e nível sérico de testosterona em touros da raça Nelore. Foram utilizados 55 touros com idade de 24 a 28 meses, criados sob manejo extensivo em uma propriedade no município de Uberlândia-MG, em janeiro de 2006. As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia caudal das 8 h e 20 min às 10 h e 20 min. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 700g por 15 min e o soro armazenado a -20°C, até o momento da análise da testosterona por radioimunoensaio em fase sólida. Posteriormente, foram realizados a mensuração da circunferência escrotal e a coleta do sêmen com o uso de eletroejaculador. Os exames imediatos foram feitos com o auxílio de um microscópio óptico e a análise da morfologia espermática utilizando microscopia de contraste de fase. Foram confeccionados esfregaços de sêmen corados com Azul de Toluidina para avaliação da integridade da cromatina por análise visual e computacional em ambiente SCILAB. Realizou-se a mensuração da cabeça dos espermatozóides, incluindo área, perímetro, largura, comprimento, razão largura:comprimento, elipsidade, fator de forma, simetria lateral e simetria antero-posterior. O restante do ejaculado foi centrifugado a 700g por 10 minutos e o plasma seminal armazenado a -20°C para realização da eletroforese em SDS-PAGE 14%. Os dados foram analisados pela correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). Constatou-se a presença de 26 polipeptídeos diferentes com variação de 14 a 21 bandas individualmente e média geral de 17 bandas por amostra. O peso molecular aparente (PMA) apresentou um intervalo de 11,2 a 124,1 kDa. Encontrou-se correlações positivas ou negativas de 12 proteínas com as características físicas e morfológicas do sêmen e 11 proteínas com características morfométricas e integridade de cromatina, revelando o potencial dessas proteínas para atuarem como marcadores bioquímicos. São necessário mais estudos para elucidar suas origens e funções no trato reprodutivo do macho.

**PALAVRAS-CHAVES:** bovino, sêmen, eletroforese, cromatina, morfometria

## PROTEINS FROM SEMINAL PLASMA AND ITS RELATIONSHIP WITH SPERMATIC CHARACTERISTICS AND SERUM LEVEL OF TESTOSTERONE

**ABSTRACT.** The objective of this work was to draw the electrophoretic profile of proteins from the seminal plasma and check its relationship with the spermatic characteristics, chromatin integrity and serum level of testosterone in bulls from Nelore breed. Fifty-five bulls age ranging between 24 and 28 months; they were reared under extensive management in a farm in the Uberlandia city, Minas Gerais State, in January 2006. Blood collections were carried out by puncture of the caudal vein, from 8.20 to 10.20 AM. After collection, blood was centrifuged at 700 g for 15 min and the serum stored at -20°C until the moment of analysis of the testosterone by radioimmunoassay in solid phase. Afterwards, mensuration of the scrotal circumference and semen collection were carried out by using an electroejaculator. The proximate analyses were done with the aid of an optical microscope and the analysis of the spermatic morphology by using phase contrast microscopy. Smears were prepared from semen stained with Toluidine Blue for evaluation of chromatin integrity through visual and computacional analysis in SCILAB environment. It was carried out the mensuration of the head of spermatozoa, including area, perimeter, width, length, width:length ratio, elipticity, form factor, lateral symmetry and anteroposterior symmetry. The rest of ejaculate was centrifuged at 700 g for 10 minutes and the seminal plasma stored at -20°C for accomplishment of electrophoresis in 14% SDS-PAGE. Data were analyzed by Pearson's correlation ( $p < 0.05$ ). We found the presence of 26 different polypeptides, with at a minimum 14 and at the maximum 21 bands individually and at a general average 17 bands per sample. The apparent molecular weight (AMW) presented an interval of 11.2 to 124.1kDa. We have found positive or negative correlations of 12 proteins with physical and morphologic characteristics of semen and 11 proteins with morphometric characteristics and chromatin integrity, showing the potential of those proteins for acting as biochemical markers, more studies being necessary for elucidating their origins and functions in the male reproductive tract.

**Key words:** Electrophoresis, bovine, semen, chromatin, morphometry



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
I INTRODUÇÃO .....	01
II REVISÃO DE LITERATURA .....	03
II 1. Integridade da Cromatina e Morfometria da cabeça de espermatozóides.....	03
II 2. Testosterona e proteínas do plasma seminal.....	05
III MATERIAL E MÉTODOS .....	09
III 1. Animais.....	09
III 2. Coleta de sangue e dosagem de testosterona.....	09
III 3. Exame andrológico.....	09
III 4. Avaliação da Integridade de Cromatina.....	10
III 5. Análise computacional da morfometria e integridade da cromatina de cabeças de espermatozóides .....	10
III 6. Proteínas do plasma seminal .....	11
III 7. Quantificação das proteínas .....	11
III 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida: preparação dos géis.....	12
III 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes...	12
III 10. Análise Estatística .....	13
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
IV 1. Características andrológicas, espermáticas e concentração sérica de Testosterona.....	14
IV 2. Análise das Proteínas do Plasma Seminal.....	18
V CONCLUSÃO .....	26
VI REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	27

## I INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo. Está composto predominantemente pela raça Nelore (*Bos taurus indicus*). No que tange a seleção reprodutiva, o touro utilizado em monta natural, é responsável por mais de 90% do potencial genético, apesar de sua presença física dificilmente ultrapassar os 5% (SILVA et al., 1993).

A avaliação da fertilidade do touro está associada a uma série de variáveis, que vão desde os aspectos comportamentais, passando pelos exames clínicos, avaliação física e morfológica do sêmen e medidas dos testículos (SALVADOR et al., 2001). Entretanto, podem ser insuficientes para predizer o potencial fecundante dos espermatozoides. Nesse contexto, faz-se necessária análise mais criteriosa como a avaliação da estrutura da cromatina para garantir o sucesso em programas de reprodução assistida como transferência de embriões, inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões.

A cromatina espermática é uma estrutura altamente organizada e compactada, constituída de DNA e nucleoproteínas heterogêneas. A natureza insolúvel e condensada da cromatina protege o material genético no decorrer do transporte pelo trato reprodutivo do macho e da fêmea (RICHTHOFF et al., 2002). Durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo ocorre um aumento da condensação da cromatina em macacos (GOLAN et al., 1997). Além disso, a integridade da cromatina pode ser influenciada por componentes do plasma seminal (RICHTHOFF et al., 2002; SASAKI et al., 2001; GOLAN et al., 1997a).

O plasma seminal é constituído de uma mistura de secreções dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias que serve como meio para os espermatozoides ejaculados. Esse fluido complexo contém diversos polipeptídios, que exercem um importante papel na capacidade fertilizante dos espermatozoides (ALONSO MARQUES et al., 2000).

Na busca de métodos que auxiliem a avaliação da viabilidade do sêmen, trabalhos relacionam a massa molecular (MM) de algumas proteínas do plasma seminal com a fertilidade dos machos (KILLIAN et al., 1993), congelabilidade do sêmen (JOBIM et al., 2003; RONCOLETTA et al., 1999) e características espermáticas (SALVADOR et al., 2004; ROMITTO, 2003). A eletroforese é uma técnica que vem sendo utilizada para o diagnóstico de algumas patologias ou

diferenciação de animais quanto ao grau de sua fertilidade (KILLIAN et al., 1993; WOLFE et al., 1993).

Averiguar o perfil protéico do plasma seminal e a sua relação com a qualidade seminal e a concentração sérica de testosterona, serve como base para entendermos melhor os processos fisiopatológicos que acometem reprodutores e suas possíveis causas. Além de podermos sugerir possíveis marcadores bioquímicos para caracteres ligados à fertilidade.

O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e verificar a sua relação com as características espermáticas e nível sérico de testosterona em touros da raça Nelore.

## II REVISÃO DE LITERATURA

### II 1. Integridade da Cromatina e Morfometria da cabeça de espermatozóides

A espermatogênese compreende o conjunto de processos por meio dos quais células-tronco da linhagem germinativa masculina, as espermatogônias, dão origem aos espermatozóides. Ela pode ser dividida em 3 fases fundamentais: (a) espermatocitogênese: envolve a proliferação de espermatogônias, levando à formação de espermatócitos primários e de novas espermatogônias para a continuidade do processo; (b) envolve os espermatócitos primários e secundários, os quais sofrem o processo de divisões reducionais, levando à formação de células haplóides, as espermátides; (c) espermiogênese: compreende a uma série de transformações citológicas por que passam as espermátides até se converterem em espermatozóides (CLERMONT, 1972).

Durante a espermiogênese ocorre a condensação do material nuclear, onde o DNA das espermátides é compactado pela substituição de histonas nucleares, que são proteínas nucleares básicas, por protaminas que possuem características mais básicas e são ricas em arginina e cisteína oxidada (GAGNON, 1999). O DNA compactado tem forma de “doughnut”, ou seja, de anéis que são presos entre si por pontes dissulfeto, formadas pela oxidação de grupos sulfidril presentes nas protaminas, formando uma matriz ligada ao annulus nuclear, conferindo a condensação do DNA dentro de um pequeno volume, cerca de seis vezes mais compactadas que as células somáticas (WARD; COFFEY, 1991). Os humanos possuem dois tipos de protamina, a P1 e P2, ao contrário dos bovinos que possuem apenas um tipo (GAGNON, 1999, ZHANG et al., 2006). Mas é durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo que ocorre a estabilização da cromatina, onde grupos thiol da protamina se oxidam dentro das ligações disulfídicas, promovendo uma estrutura altamente rígida (SELIGMAN et al., 2005; RICHTHOFF et al., 2002; GOLAN et al., 1997b; WARD; COFFEY, 1991)

Anormalidades no complexo DNA-protamina podem levar a uma baixa compactação da cromatina e conseqüentemente defeitos no DNA. Zhang et al., (2006) estudando homens inférteis observaram uma alta quantidade de histonas em relação às protaminas (P1 e P2) ao contrário do grupo de homens férteis. A indução da degeneração testicular por insulação em bovinos levou ao aumento de

espermatozóides com danos na cromatina, avaliados pela reação de Feulgen (FERNANDES, 2005).

Diversos trabalhos tem avaliado a estabilidade do complexo DNA-protamina e verificado sua relação em programas de fertilização *in vitro* e com a fertilidade (SAILER et al., 1996; BALLACHEY et al., 1987; MELLO, 1982). Anomalias da cromatina podem levar a diminuição da motilidade (GIWERCMAN et al., 2003).

Um dos métodos mais usados para avaliação da susceptibilidade do DNA à desnaturação, em diferentes espécies, é a análise da estrutura da cromatina (SCSA), a qual se baseia na avaliação da fluorescência de espermatozóides corados com alaranjado de acridina (AO), por meio de um citômetro de fluxo (GOLAN et al., 1997b, BALLACHEY et al., 1987). Porém, devido a seu alto custo fica praticamente indisponível para avaliações rotineiras.

Técnicas mais simples para analisar falhas no complexo DNA - proteína foram desenvolvidas, como o método de metacromasia induzida com azul de toluidina (AT) (BELETTI; MELLO, 1997; MELLO, 1982), que consiste no tratamento ácido (HCL 4N a 25°C) seguido pela coloração com AT a pH 4,0. O azul de toluidina é um corante metacromático e as alterações na sua tonalidade de cor são induzidas pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante, que se ligam ao grupo fosfato do DNA. Desta forma, cromatina com anomalias DNA - proteína disponibilizariam mais grupos fosfatos para a ligação com o corante, exibindo uma tonalidade azul-escuro a magenta, já nas cromatinas normais os grupos fosfatos estariam bloqueados pela protamina, resultando em menos ligações com o corante e uma tonalidade verde a azul-claro (MELLO, 1982; BELETTI; MELLO, 1997).

A cabeça de espermatozóides é praticamente toda constituída de cromatina, assim, espera-se que defeitos na sua estrutura sejam acompanhados por alterações morfológicas (FERRARI et al., 1998; OSTERMEIER et al., 2001; SAILER et al., 1996). Porém, anomalias no complexo DNA - proteína da cromatina pode não ser acompanhadas por defeitos morfológicos (BELETTI et al., 2005).

A morfologia dos espermatozóides normais tem sido demonstrada como indicador de fertilidade, entretanto métodos subjetivos de avaliação da morfologia são altamente variáveis. Na busca por uma padronização de técnicas, a análise computacional tem se mostrado uma ferramenta promissora de análise do sêmen, sendo mais eficaz que a análise visual (COETZEE et al., 1999).

Nesse sentido, Davis e Gravance (1993) avaliando a acurácia e performance do “Cell Form Human” que é um instrumento para análise automática da morfometria da cabeça de espermatozóides com diferentes preparos, colorações e técnicas, demonstraram que o equipamento é uma alternativa para diminuir a subjetividade das análises convencionais. Outro programa o Computer-assisted sperm analysis (CASA) permite a avaliação da concentração, porcentagem de espermatozóides móveis, velocidade linear, velocidade média, amplitude do deslocamento lateral da cabeça e motilidade progressiva e verificou-se que essas variáveis possuem correlações com a fertilidade em programas de inseminação artificial (FARRELL et al., 1998).

Gravance et al. (1998) utilizando o “Computer-assisted sperm morphometry analysis” (ASMA) que permite analisar as dimensões da cabeça de espermatozóides, como comprimento, largura, área, razão largura:comprimento e perímetro. Avaliaram a cabeça de espermatozóides de carneiros e obtiveram coeficiente de variação dentro do ensaio de 4,8% para o comprimento e 6,0% para a área, sendo que identificaram e digitalizaram células espermáticas com 95% de acerto, provendo resultados consistentes. Katz et al. (1986) analisando a morfometria da cabeça de espermatozóides de humanos férteis e inférteis, observaram diferença significativa entre os grupos quanto aos parâmetros razão comprimento:largura e comprimento.

Neste trabalho utilizou-se o programa para análise morfológica de espermatozóides, desenvolvido em ambiente computacional “Scilab”, que permite avaliar detalhadamente a estabilidade da cromatina e a morfologia espermática, utilizando esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina (BELETTI et al. 2005; BELETTI et al., 2004; BELETTI; COSTA, 2003).

## **II 2. Testosterona e proteínas do plasma seminal**

Os testículos dos mamíferos podem ser divididos funcionalmente em dois compartimentos principais: dos túbulos seminíferos e intertubular (RUSSEL et al., 1990), esse último é constituído de células de Leydig, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável que inclui fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SETCHELL, 1991).

A célula de Leydig é produtora de andrógenos, dentre estes, a testosterona e a diidrotestosterona são considerados os mais importantes, desempenhando ação no sistema genital e mesmo em outros órgãos. No testículo, a testosterona juntamente com o FSH são os hormônios responsáveis pelo início, manutenção e controle da espermatogênese, sendo suas ações intermediadas pela célula de Sertoli (SHARPE, 1994). O epidídimo exerce influência direta na maturação espermática, sendo que receptores intracelulares captam andrógenos e a enzima 5 $\alpha$ -redutase os converte em diidrotestosterona (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

Os andrógenos atuam na manutenção de diversas atividades orgânicas das glândulas acessórias. Também são essenciais para a diferenciação do sistema genital durante a vida fetal, e durante a puberdade são responsáveis pela manifestação dos caracteres sexuais secundários e de mudança do comportamento sexual (BAXTER, 1994). Correlações têm sido estimadas entre concentração sangüínea de testosterona e fertilidade. Andersson (1992) encontrou correlação positiva entre a concentração de testosterona sérica e a fertilidade de touros, avaliada pela taxa de não-retorno ao estro. Além de serem encontradas correlações com a qualidade seminal (SANTOS et al., 2004; SANTOS et al., 2003).

Jones et al. (1980) estudando a síntese proteica em diferentes regiões do epidídimo, por meio da incorporação de [<sup>35</sup>S] metionina em tecido de ratos incubados *in vitro*, observou que as proteínas com peso molecular de 18 kDa, 19 kDa e 32 kDa, da cabeça e a 47 kDa da cauda do epidídimo eram andrógeno-dependentes, mas não foram esclarecidas as funções dessas proteínas.

Utilizando gel de eletroforese, Lavon (1972) identificou 30 a 35 proteínas no plasma seminal de touros, e Bruschi et al. (1979) determinaram os valores normais de cada componente do plasma seminal de machos de várias espécies, começaram a despertar a curiosidade sobre a existência de proteínas que se prendem à membrana espermática, facilitando a fecundação.

Posteriormente, purificando e caracterizando família de proteínas do plasma seminal de bovinos (BSP), Manjunath e Sairam (1987) as denominaram em BSP-A1 (16 kDa), BSP-A2 (16,5 kDa), BSP-A3 (15 kDa) e BSP-30 (30 kDa). De acordo com Manjunath et al. (1993) essas proteínas se ligam a membrana espermática promovendo o seqüestro de colesterol, assim torna a membrana permeável para a entrada de cálcio e ativação da fosfolipase A2, promovendo a capacitação dos espermatozoides.

Alonso Marques et al. (2000) analisaram e correlacionaram proteínas do sêmen bovino congelado de diferentes raças, concentração de íons cálcio no plasma seminal e atividade da fosfolipase A2 do espermatozóide com a reação acrossômica, visando encontrar fatores que influenciem no processo de fertilização bovina. No mesmo trabalho, a análise do perfil eletroforético das proteínas (totais e de membrana) do espermatozóide e do plasma seminal bovino revelaram variabilidade protéica entre indivíduos na qual diferenças qualitativas e quantitativas foram identificadas. Sendo que a proteína de 15,7 kDa apresentou correlação significativa com a reação acrossômica, que pode estar diretamente relacionada com a fertilização *in vivo*.

Buscando identificar no plasma seminal de bovinos algumas proteínas ligadoras de heparina (HBP) produzidas pelas glândulas acessórias. Bellin et al., (1998) reconheceram variantes da HBP, de aproximadamente 31, 24 e 21,5 kDa, associadas ao incremento da fertilidade de touros, sendo que, a proteína de peso molecular 31 kDa é conhecida como o antígeno associado à fertilidade (FAA).

Na tentativa de aprimorar o conceito de congelabilidade em touros doadores de sêmen, Roncoletta et al. (1999) sugeriram a existência de uma banda caracterizada pela mobilidade relativa de 20,3 e massa molecular (MM) de aproximadamente 61,8 kDa, como possível marcador bioquímico para diferenciar o caráter de congelabilidade do sêmen. Mattos et al. (2004) imunoidentificaram por meio de anticorpo policlonal específico (anti-BSP A1/A2) proteínas do plasma seminal de bovinos, reconhecendo A1 (16,5 kDa, pl 4,7) e A2 (16 kDa, pl 4,9 e 5,2), sendo que essas proteínas podem ser utilizadas como um marcador para sêmen de alta congelabilidade.

Para Wolfe et al. (1993) o conteúdo do plasma seminal influi na fertilidade masculina, geralmente baseando-se na composição do plasma de animais férteis e inférteis. Constataram diferenças entre os polipeptídios no plasma seminal e espermatozoides de animais sadios e com degeneração testicular induzida pelo calor.

Killian et al. (1993), utilizando-se da eletroforese estudaram proteínas do plasma seminal de bovinos e acharam correlação entre elas e a fertilidade. Associaram touros com alta fertilidade a duas proteínas do plasma seminal, sendo que, uma apresentou PM de 26 kDa e pl 6,2, e a outra MM de 55 kDa e pl 4,5. Associaram também animais de baixa fertilidade a outras duas proteínas, a primeira



com MM de 16 kDa e pl 4,1, e a segunda com MM de 16 kDa e pl 6,7. Um modelo de regressão foi desenvolvido para determinar a fertilidade usando essas quatro proteínas, e comparando-se a fertilidade efetiva dos touros com o valor calculado, observou-se uma correlação positiva ( $r=0,89$ ).

Posteriormente, Killian et al. (1999), descreveram que as duas proteínas (16 kDa e pl 4,1 e a 16kDa e pl 6,7) com maior prevalência em touros de baixa fertilidade, poderiam estar associadas com *Mycoplasma genitalium* e que a proteína de 55 KDa, é 86% homóloga ao precursor da osteopontina-K bovina. Estudos de Genera et al. (1998) estabeleceram que a proteína associada à fertilidade 26 KDa, descrita por Killian et al. (1993), é 75% idêntica e 86% homóloga a do tipo “lipocalin prostaglandina D Sintase” (PGDS), uma das proteínas mais prevalentes em touros de alta fertilidade, elucidando sua atuação tanto no desenvolvimento, quanto na maturação dos espermatozóides.

A proteína ácida do fluído seminal com 13 kDa, denominada de “spermadhesin” (aSPD) está presente em grande quantidade e tem vislumbrado suas atuações na viabilidade espermática e motilidade, tendo importante papel como agente antioxidante (SHÖNECK et al., 1995). Posteriormente, foram encontradas isoformas dessa proteína (MOURA et al., 2006).

A proteína SP22 é uma proteína presente na cabeça e cauda dos espermatozóides, porém a sua presença no plasma seminal é associada a animais tratados com agentes tóxicos para o epidídimo, levando a disfunções e infertilidade (WELCK et al., 1998; KLINEFELTER et al., 1997).

Cornwall et al. (1990) demonstraram que durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo, onde diversas proteínas interagem com os espermatozóides, algumas proteínas aumentam e outras diminuem sua concentração no fluído seminal. A capacidade de fertilização, a motilidade e estabilização da cromatina ocorrem no epidídimo e podem ser influenciadas por proteínas e outros componentes presentes no fluído seminal (MOURA et al., 2006; SHÖNECK et al., 1995; SASAKI et al., 2001)

### **III MATERIAL E MÉTODOS**

#### **III 1. Animais**

Foram utilizados 55 machos da raça Nelore, com idade variando de 24 a 28 meses, mantidos em regime de pasto (*Brachiaria decumbens*), com água e suplementação mineral, locados em uma fazenda no município de Uberlândia-MG, em janeiro de 2006. Os animais foram escolhidos ao acaso sem conhecimento prévio das condições reprodutivas.

#### **III 2. Coleta de sangue e dosagem de testosterona**

Realizou-se a coleta de uma amostra de sangue por punção da veia caudal de cada animal, com auxílio de Tubos Vacutainer System<sup>®</sup> (10mL) sem anticoagulante, das 8 h e 20 min às 10 h e 20 min. A cada 10 coletas, as amostras foram centrifugadas a 700g por 10 minutos e soro acondicionados em 2 microtubos tipo Eppendorf, devidamente identificados e congelados a -20°C até a avaliação. A análise da testosterona sérica foi feita no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP, Botucatu-SP, pelo método de radioimunoensaio em fase sólida (Equipamento Contador Cobra II, Auto-GAMMA, PACKARD BIOSCIENSE COMPANY). O coeficiente de variação intraensaio foi de 8,8%.

#### **III 3. Exame andrológico**

Após a coleta de sangue iniciou o exame andrológico, realizando a mensuração da Circunferência Escrotal (CE) e as coletas do sêmen, com uso de eletroejaculador. Imediatamente, foram feitas as análises físicas do sêmen e com auxílio de um microscópio óptico avaliou-se o Turbilhonamento (0-5), Motilidade (0-100%) e Vigor (0-5). Alíquotas de sêmen foram coletadas e mantidas a temperatura ambiente para os exames da concentração e morfologia espermática, realizados no Laboratório de Reprodução Animal (FAMEV-UFU).

- Concentração espermática – retirou-se do ejaculado amostra de 20µL e colocada em tubos plásticos contendo 2mL de solução formol salina (diluição 1:100). Após, com o uso de câmara de Neubauer, preenchendo seus 2 retículos, contou-se

todos os espermatozóides presentes em 5 quadrados em diagonal de cada retículo, calculando-se a média aritmética. O valor encontrado foi multiplicado por  $5 \times 10^7$  para obter o número de espermatozóides por mililitros.

- Patologia espermática – uma alíquota do ejaculado foi diluída em 2 tubos de plástico (2,0 mL), contendo formol salina. Pelo método de contraste de fase (aumento de 1000x) contaram-se 200 células, classificando os defeitos em maiores, menores e totais, conforme CBRA (1998).

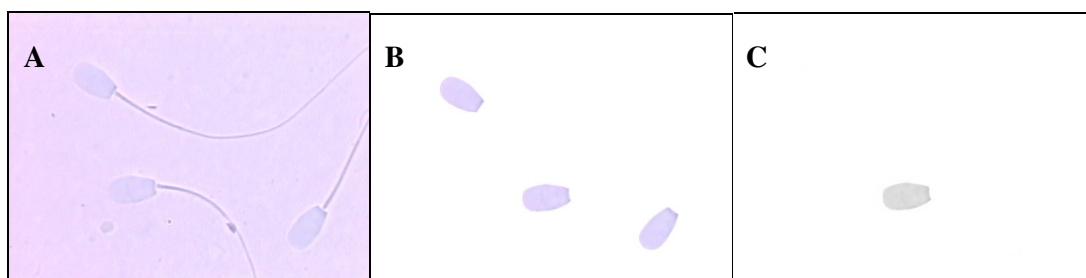
#### **III 4. Avaliação da Integridade de Cromatina**

Confeccionou 2 esfregaços por ejaculado, após secos a temperatura ambiente, foram fixados em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto, seguido de um banho de etanol 70% por 3 minutos. Os esfregaços foram hidrolisados por 25 minutos, em ácido clorídrico 4N, lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente. Em seguida, uma gota de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato), em pH 4,0 foi colocada sobre o esfregaço, cobrindo-o com lamínula (BELETTI; MELLO, 2004). Realizou a avaliação visual da integridade de cromatina contando 100 células, classificando como anormais as que apresentavam alta tonalidade de azul. Simultaneamente foram obtidas 50 imagens digitais em tons de cinza, usando-se de um microscópio Olympus BX40 com objetiva de 100x (imersão), acoplado a uma câmera Olympus OLY-200 e placa digitalizadora Data Translation 3153 conectada a um microcomputador PC (BELETTI; COSTA, 2003).

#### **III 5. Análise computacional da morfometria e integridade da cromatina de cabeças de espermatozóides**

Foi realizada a segmentação interativa de 100 cabeças de espermatozóides (Figura. 1) de cada animal. O software utilizado foi Jasc Paint Shop Pro 8.0. Após, as imagens foram processadas por uma rotina computacional desenvolvida em ambiente SCILAB, no qual mensurou as características morfométricas: área (A), perímetro (P), comprimento (C), largura (L). Também foram obtidas algumas variáveis derivadas dessas medidas básicas, como a razão da largura:comprimento (L/C), elipicidade (E), fator de forma (FF) (BELETTI; COSTA, 2003). A simetria

lateral (SL) foi medida para identificação de assimetria ao longo do eixo principal do espermatozóide, que pode implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula. A mensuração da simetria antero-posterior (SAP) foi considerada para identificação de assimetrias ao longo do segundo eixo espermático. Por meio desta medida, é possível encontrar algumas alterações específicas como a cabeça piriforme e com base estreita. Também foi calculado o coeficiente de variação dos níveis de cinza ao longo da cabeça dos espermatozoides, sendo uma medida que está diretamente relacionada com alterações da cromatina (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI et al. 2004, BELETTI et al., 2005).



**Figura 1.** Representação da segmentação interativa das cabeças de espermatozoides: captura inicial da imagem (A), após a segmentação (B) e em tons de cinza pronto para análise na rotina computacional Scilab (C).

### III 6. Proteínas do plasma seminal

Após exames imediatos, realizou-se a centrifugação dos ejaculados a 700 g por 15 min em temperatura ambiente. Com o auxílio de pipetas de Pasteur os sobrenadantes foram coletados e acondicionados em microtubos tipo Eppendorf e congelados à -20°C. Posteriormente, no Laboratório de Biofísica da UFU, os plasmas seminais foram descongelados e recentrifugados (12.000 g) por 30 min a 4°C, no intuito de precipitar os *debris celulares*.

### III 7. Quantificação das proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de plasma seminal, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de

extinção  $\epsilon$  1,0 mg/ml em 278 nm de 0,666 (DOTY; GEIDUSCHEG, 1953). Cada amostra de proteína foi completada para o volume de 1,0 mL com água deionizada em 2 tubos de ensaio, as quais foram acrescidos 500  $\mu$ L dos reagentes R1 (tubo 1) e R2 (tubo 2). A seguir, realizou a leitura em espectrofotômetro SPEKOL UV VIS da Zeiss a 310nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 0,21%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dissolvido em NaOH (30,4%) e o R2 por uma solução de NaOH a 30%. Posteriormente, todas as amostras foram padronizadas quanto a quantidade de proteína.

### **III 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida: preparação dos géis**

Dois espaçadores em forma de fita foram utilizados para formar entre as placas de vidro um espaço retangular de aproximadamente 0,75 mm de espessura. As placas de vidro utilizadas na preparação dos géis mediam aproximadamente 9,5 cm de largura, 10,5 cm de comprimento e 0,1 cm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara preenchida com a solução do gel. Terminada a polimerização, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico conectada aos eletrodos.

### **III 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes**

As eletroforeses para a estimativa dos pesos moleculares foram realizadas segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio). Foi utilizado gel de empilhamento a 5% e gel de separação a 14%.

A solução trizma base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (p/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

A concentração das amostras foram padronizadas com 750  $\mu$ g de proteína total, completando até 100  $\mu$ L com água deionizada e em seguida foi adicionado 50% de tampão da amostra (Tris-HCl 187 mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, as

amostras foram aquecidas e aplicou 30 µg de proteína total em cada canaleta do gel de poliacrilamida.

Foi utilizado o marcador de peso molecular LWM (Low Weight Molecular) que contém os seguintes elementos:  $\alpha$ -lactoalbumina (PM: 14,4 kDa), inibidor de tripsina (PM: 20,1 kDa), anidrase carbônica (PM: 30,0 kDa), ovoalbumina (PM: 45,0 kDa), soroalbumina bovina (PM: 66,0 kDa) e glicogênio fosforilase *b* (PM 97,0 kDa).

A eletroforese foi conduzida por uma corrente constante de 20 mA por aproximadamente 90 minutos. Após a eletroforese, os géis foram retirados da placa e corados por aproximadamente 10 minutos com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,1% (m/v) em água-metanol- ácido acético (4:5:1 v/v). Em seguida, descorados por uma solução de etanol a 35%.

Após, as imagens dos géis foram capturados com o uso de um Scanner acoplado a um Microcomputador e a análise foi realizada com o auxílio do Software KODAC 1D. Determinou o peso molecular aparente (PMA) e a densitometria relativa das bandas correspondente a cada canaleta.

### **III 10. Análise Estatística**

A análise estatística foi descritiva e também realizou a correlação de Pearson, para averiguar a relação das proteínas do plasma seminal com as características espermáticas e concentração sérica de testosterona, com significância de 1 e 5%, utilizando o software estatístico S-PLUS 2000.

## IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV 1. Características andrológicas, espermáticas e concentração sérica de Testosterona

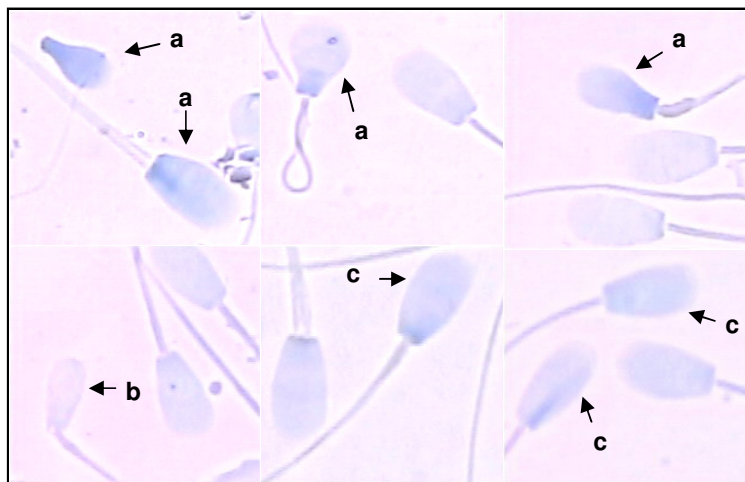
Na Tabela 1 são apresentados os resultados da circunferência escrotal, espermograma e concentração sérica de testosterona de cada Touro.

**Tabela 1.** Valores individuais da circunferência escrotal (CE), volume (Vol), turbilhonamento (Turb), motilidade (Mot), vigor (Vig), concentração espermática (Conc), defeitos maiores (DM), defeitos menores (Dm), defeitos totais (DT) e concentração sérica de testosterona (Test) de touros da raça Nelore (n=55), Uberlândia-MG.

TOURO	CE (cm)	Vol (mL)	Turb (0-5)	Mot (%)	Vig (0-5)	Conc x10 <sup>6</sup>	DM(%)	Dm(%)	DT(%)	Test (ng/mL)
1	34,00	6,00	3,00	45,00	2,00	665	4,55	1,52	6,06	5,18
2	36,50	2,50	0,00	70,00	4,00	130	0,83	8,26	9,09	0,93
3	35,50	4,50	4,00	70,00	4,00	265	9,95	3,98	13,93	13,25
4	30,00	3,50	1,00	60,00	3,00	135	26,67	2,86	29,52	1,59
5	35,00	3,00	4,00	70,00	4,00	1190	2,73	2,73	5,45	9,81
6	33,00	4,00	3,00	70,00	4,00	320	8,00	8,00	16,00	10,74
7	32,00	7,50	4,00	70,00	4,00	165	7,27	4,55	11,82	15,70
8	33,50	5,50	1,00	70,00	4,00	295	3,60	6,31	9,91	8,38
9	30,00	5,00	4,00	80,00	4,00	723	1,92	3,85	5,77	8,34
10	37,00	5,00	4,00	75,00	4,00	588	2,46	1,48	3,94	12,74
11	35,00	6,50	2,00	55,00	3,00	168	12,00	28,00	40,00	12,15
12	31,50	4,50	3,00	65,00	4,00	185	17,59	17,59	35,19	4,68
13	31,00	1,00	3,00	55,00	2,50	288	13,86	7,92	21,78	6,48
14	36,00	3,00	4,00	75,00	4,00	795	4,50	4,00	8,50	0,83
15	31,50	6,00	2,00	60,00	3,00	100	23,50	4,50	28,00	3,52
16	36,00	4,50	3,00	80,00	4,00	385	2,97	3,96	6,93	11,92
17	32,00	4,50	1,00	65,00	3,00	135	11,65	7,77	19,42	2,35
18	34,00	3,50	0,00	60,00	3,00	23	3,00	14,00	17,00	2,57
19	33,00	6,00	0,00	60,00	3,00	130	5,93	5,08	11,02	5,92
20	32,50	8,00	4,00	80,00	4,00	310	4,76	1,43	6,19	3,98
21	28,50	1,00	0,00	45,00	3,00	-	6,33	3,80	10,13	5,97
22	32,50	2,00	4,00	70,00	3,50	1003	3,00	9,00	12,00	4,23
23	34,00	7,00	3,00	70,00	3,00	263	21,90	5,71	27,62	8,09
24	32,00	5,50	1,00	65,00	3,00	158	2,63	7,89	10,53	1,40
25	33,00	6,00	2,50	65,00	3,00	195	0,00	5,83	5,83	11,44
26	32,00	8,00	4,00	75,00	4,00	953	4,29	4,29	8,57	4,87
27	34,00	4,00	1,00	60,00	3,00	83	13,21	10,38	23,58	11,32
28	34,50	3,80	4,00	75,00	4,00	470	4,27	6,84	11,11	6,02
29	36,00	7,00	0,00	50,00	3,00	138	2,00	4,00	6,00	6,59
30	31,50	4,00	3,00	65,00	4,00	190	11,11	10,19	21,30	1,80
31	30,50	14,00	0,00	0,00	0,00	168	2,00	0,00	2,00	0,57
32	32,00	4,50	1,00	60,00	3,00	215	1,90	3,81	5,71	7,68
33	33,50	7,50	0,00	30,00	2,00	33	38,00	6,00	44,00	2,87
34	32,50	6,50	0,00	5,00	0,00	140	30,77	2,88	33,65	1,13
35	30,50	4,00	4,00	70,00	4,00	518	2,83	8,49	11,32	6,40
36	32,00	4,00	3,00	70,00	4,00	-	7,84	8,82	16,67	0,60
37	28,00	5,00	2,00	70,00	4,00	423	0,00	11,86	11,86	1,45
38	32,00	3,50	4,00	75,00	4,00	403	7,00	33,00	40,00	3,16
39	32,50	5,00	3,00	70,00	4,00	305	1,75	7,02	8,77	2,83
40	33,00	3,00	0,00	5,00	1,00	30	0,99	7,92	8,91	5,51
41	32,00	8,00	2,00	65,00	3,00	185	3,74	7,48	11,21	3,00
42	31,00	3,00	2,00	65,00	3,00	100	6,36	8,18	14,55	3,64
43	38,00	3,00	3,00	75,00	4,00	1198	56,07	3,74	59,81	1,22
44	35,00	4,50	3,00	75,00	4,00	295	3,81	3,81	7,62	3,03
45	30,00	8,00	4,00	75,00	4,00	710	3,85	1,92	5,77	3,78
46	32,00	4,00	0,00	60,00	3,00	40	9,90	21,78	31,68	4,52
47	30,00	1,00	1,00	45,00	1,00	40	2,00	3,00	5,00	0,24
48	33,50	5,50	3,00	65,00	3,00	635	3,57	2,68	6,25	5,19
49	31,00	5,00	0,00	65,00	4,00	120	0,96	3,85	4,81	7,65
50	36,00	3,50	4,00	70,00	3,00	518	14,02	2,34	16,36	1,55
51	34,00	6,00	3,00	70,00	4,00	585	6,42	2,75	9,17	1,35
52	37,00	7,50	2,00	70,00	3,00	203	12,07	3,45	15,52	0,82
53	30,00	4,00	0,00	35,00	1,00	-	5,83	2,91	8,74	0,41
54	35,00	7,00	0,00	65,00	3,00	-	1,00	6,00	7,00	5,77
55	29,50	4,00	2,00	65,00	3,00	165	11,00	6,00	17,00	2,46
<b>MÉDIA</b>	<b>32,86</b>	<b>4,97</b>	<b>2,15</b>	<b>61,73</b>	<b>3,20</b>	<b>317,59</b>	<b>8,55</b>	<b>6,83</b>	<b>15,37</b>	<b>5,08</b>
<b>DP</b>	<b>2,27</b>	<b>2,20</b>	<b>1,53</b>	<b>17,54</b>	<b>1,01</b>	<b>299,98</b>	<b>10,24</b>	<b>6,10</b>	<b>11,95</b>	<b>3,89</b>

A média da concentração sérica de testosterona (Tabela 1) foi de  $5,08 \pm 3,89$  ng/mL, com amplitude de variação de 0,24 a 15,70 ng/mL, com valores acima aos encontrados por Santos et al., (2000), Santos et al (2004). Isso pode ser explicado pelas variações circadianas que os animais apresentam (SANTOS et al., 2003). Com realização de única coleta os níveis poderiam estar, nesse momento, mais elevados. A concentração sérica de testosterona apresentou correlação negativa apenas com o vigor ( $r = -0,29$ ,  $p < 0,05$ ). Ao contrário de Santos et al. (2004), que estudando touros da raça Nelore observaram uma correlação negativa ( $p < 0,05$ ) entre a concentração de testosterona e os defeitos totais. Contudo, segundo Santos et al (2003) a qualidade do sêmen, circunferência escrotal e concentração sérica de testosterona devem ser avaliadas em conjunto, já que são características que se relacionam entre si, determinando a fertilidade ou infertilidade do Touro.

Na Figura 2 estão representadas cabeças com alterações de cromatina. Essas alterações podem ou não ser acompanhadas de anormalidades morfológicas, o que está de acordo com Beletti et al (2005). Assim, as alterações cromatínicas podem influenciar a morfologia da cabeça dos espermatozoides de diferentes maneiras.



**Figura 2.** Esfregaço de sêmen bovino corado com Azul de Toluidina, com morfologia alterada e anomalias de cromatina (a), morfologia alterada e cromatina normal (b) e morfologia normal e anomalias de cromatina (c).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das mensurações da cabeça de espermatozoides e análise da integridade de cromatina.



**Tabela 2.** Valores, em média das características morfométricas das cabeças de espermatozoides, coeficiente de variação dos níveis de cinza (CV) e análise visual da integridade de cromatina (AT) de touros da raça Nelore (n=55), Uberlândia-MG.

TOURO	A (pixel)	P (pixel)	L (pixel)	C (pixel)	L/C	E	FF	SL	SAP	CV	AT (%)
1	3538,16	265,42	48,50	89,75	0,54	0,30	1,12	0,97	0,91	5,52	8,00
2	3635,81	273,48	48,01	92,13	0,52	0,31	1,13	0,97	0,93	5,40	7,00
3	3850,62	277,94	49,02	95,95	0,51	0,32	1,08	0,97	0,94	6,37	5,00
4	3434,55	254,93	49,89	85,68	0,58	0,26	1,11	0,97	0,91	10,07	9,00
5	3607,99	269,38	48,61	91,40	0,53	0,31	1,12	0,97	0,92	4,55	6,00
6	3668,35	270,36	50,21	89,96	0,56	0,28	1,14	0,97	0,92	5,35	2,00
7	3550,57	269,29	47,85	90,38	0,53	0,31	1,13	0,97	0,93	8,13	3,00
8	3424,64	263,42	47,37	88,94	0,53	0,30	1,12	0,97	0,92	3,91	5,00
9	3559,92	269,21	48,89	89,24	0,55	0,29	1,15	0,97	0,92	5,00	6,00
10	3234,34	254,37	46,92	84,18	0,56	0,28	1,15	0,97	0,94	4,92	3,00
11	3490,19	263,44	47,90	89,55	0,54	0,30	1,11	0,97	0,93	3,59	4,00
12	3340,35	258,92	48,32	84,28	0,57	0,27	1,17	0,97	0,94	5,51	3,00
13	3635,63	270,04	49,21	90,82	0,54	0,30	1,13	0,97	0,93	5,81	3,00
14	3573,63	267,69	49,79	88,19	0,57	0,28	1,16	0,97	0,93	3,82	8,00
15	3718,29	273,11	51,06	91,40	0,56	0,28	1,15	0,97	0,91	6,43	4,00
16	3573,67	276,89	45,97	95,50	0,48	0,35	1,11	0,97	0,92	5,06	4,00
17	3254,60	256,53	47,09	84,29	0,56	0,28	1,16	0,97	0,94	4,29	1,00
18	3132,41	252,38	45,62	84,74	0,54	0,30	1,14	0,97	0,92	3,99	12,00
19	3821,23	277,22	51,97	91,48	0,57	0,28	1,16	0,97	0,92	4,97	2,00
20	3717,01	271,79	51,36	89,16	0,58	0,27	1,16	0,97	0,93	3,96	8,00
21	3612,10	270,66	48,69	90,69	0,54	0,30	1,13	0,97	0,94	4,42	5,00
22	3667,07	271,44	48,88	91,71	0,53	0,30	1,12	0,97	0,93	6,37	3,00
23	3749,76	277,88	49,48	94,42	0,52	0,31	1,13	0,97	0,91	6,84	6,00
24	3686,89	268,91	50,48	89,57	0,56	0,28	1,13	0,97	0,93	7,08	7,00
25	3952,85	290,66	49,25	99,70	0,49	0,34	1,13	0,97	0,92	6,45	7,00
26	3592,19	264,11	51,14	86,45	0,59	0,26	1,15	0,97	0,93	5,67	8,00
27	3754,01	275,90	49,63	92,64	0,54	0,30	1,13	0,97	0,93	5,51	7,00
28	3235,67	255,26	46,18	84,48	0,55	0,29	1,14	0,97	0,94	4,97	5,00
29	3404,72	263,26	47,40	88,58	0,54	0,30	1,13	0,97	0,92	5,21	2,00
30	3503,92	263,67	48,88	87,47	0,56	0,28	1,14	0,97	0,94	4,11	4,00
31	3727,55	269,38	50,59	90,39	0,56	0,28	1,12	0,97	0,93	8,57	1,00
32	3587,81	262,91	49,58	87,52	0,57	0,28	1,11	0,97	0,95	9,89	11,00
33	3609,51	270,23	49,96	89,64	0,56	0,28	1,16	0,97	0,91	4,23	8,00
34	2945,72	245,00	44,86	79,20	0,57	0,28	1,18	0,97	0,94	5,39	7,00
35	3586,54	268,52	49,77	89,17	0,56	0,28	1,15	0,97	0,92	4,77	2,00
36	3652,39	274,08	48,31	92,70	0,52	0,31	1,13	0,97	0,92	4,92	5,00
37	3430,84	262,69	48,52	87,57	0,55	0,29	1,15	0,97	0,92	8,18	3,00
38	3811,24	272,58	52,52	88,57	0,59	0,26	1,16	0,97	0,94	9,39	6,00
39	3329,37	259,53	47,33	86,97	0,55	0,30	1,14	0,97	0,91	3,81	2,00
40	3581,16	270,16	47,45	92,37	0,51	0,32	1,10	0,97	0,93	5,22	5,00
41	3571,23	268,79	48,88	90,62	0,54	0,30	1,13	0,97	0,91	5,41	8,00
42	3924,01	281,98	50,88	93,82	0,54	0,30	1,14	0,98	0,93	5,50	8,00
43	3567,56	267,54	49,05	89,58	0,55	0,29	1,13	0,97	0,92	5,79	7,00
44	3322,98	264,52	46,15	88,65	0,52	0,32	1,15	0,97	0,92	4,13	3,00
45	3850,32	276,22	51,07	92,87	0,55	0,29	1,12	0,97	0,93	5,02	3,00
46	3627,82	274,32	47,51	93,53	0,51	0,33	1,12	0,98	0,92	15,18	2,00
47	3112,16	249,35	46,49	82,73	0,56	0,28	1,15	0,97	0,92	4,62	3,00
48	3662,26	270,94	50,07	88,37	0,57	0,28	1,16	0,97	0,94	4,41	1,00
49	3523,36	266,94	47,56	90,71	0,52	0,31	1,11	0,97	0,93	4,06	5,00
50	3646,47	270,82	49,28	91,87	0,54	0,30	1,12	0,97	0,92	5,02	9,00
51	3678,51	276,40	49,24	91,64	0,54	0,30	1,16	0,97	0,92	5,99	0,00
52	3309,21	262,66	46,41	87,89	0,53	0,31	1,15	0,97	0,92	3,97	9,00
53	3618,49	267,80	49,28	89,03	0,55	0,29	1,13	0,98	0,93	5,38	1,00
54	3540,49	272,50	46,57	92,62	0,50	0,33	1,12	0,97	0,93	6,55	7,00
55	3503,73	267,95	48,45	88,58	0,55	0,29	1,16	0,97	0,92	9,57	12,00
<b>MÉDIA</b>	<b>3557,13</b>	<b>267,84</b>	<b>48,72</b>	<b>89,62</b>	<b>0,54</b>	<b>0,30</b>	<b>1,14</b>	<b>0,97</b>	<b>0,93</b>	<b>5,79</b>	<b>5,18</b>
<b>DP</b>	<b>202,86</b>	<b>8,22</b>	<b>1,67</b>	<b>3,51</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>2,06</b>	<b>2,91</b>

Nota: A=Área, P= Perímetro, L= Largura, C= Comprimento, L/C= Razão Largura=comprimento, E= Elipsidade, FF= Fator de Forma, SL= Simetria Lateral, SAP= Simetria Antero-posterior.

Nesse estudo não foram criados limiares para classificação de cabeças normais e anormais pela análise computacional. Os resultados do coeficiente de correlação de Pearson entre as características morfométricas da cabeça de espermatozoides e análise da integridade de cromatina com as características do espermiograma estão dispostos na Tabela 3. Observa-se que a característica turbilhonamento apresentou correlação negativa significativa com largura, razão

largura:comprimento, simetria lateral e uma correlação positiva com elipsidade. Assim, quanto mais elíptico (mais longo ou menos esférico) for o espermatozóide maior é a percepção do turbilhonamento.

O turbilhonamento apresentou uma correlação negativa com o coeficiente de variação dos níveis de cinza, mas não foi encontrada com a motilidade. Contrariamente, Giwercman et al. (2003) avaliando espermatozoides de humanos pelo método visual convencional e com auxílio do “CASA”, encontraram correlações entre a motilidade e a integridade de cromatina nas duas técnicas, porém foi menor com a análise visual.

**Tabela 3.** Correlação de Pearson entre os valores médios das características morfométricas, coeficiente de variação dos níveis de cinza da cabeça de espermatozoides e análise visual de cromatinas anormais de touros da raça Nelore (n=55), Uberlândia-MG.

Variáveis	A	P	L	C	L/C	E	FF	SL	SAP	CV	AT
<b>Turb</b>	-0,09	0,04	<b>-0,30*</b>	0,13	<b>-0,35**</b>	<b>0,36**</b>	-0,12	<b>-0,28*</b>	-0,09	<b>-0,29*</b>	-0,06
<b>Mot</b>	0,19	0,15	0,23	0,08	0,11	-0,11	0,09	0,02	-0,01	-0,15	0,08
<b>Vig</b>	0,17	0,22	0,12	0,17	-0,06	0,06	0,08	-0,07	-0,11	-0,07	-0,01
<b>Conc</b>	0,10	0,04	0,20	-0,01	0,17	-0,17	0,05	-0,03	-0,08	-0,14	-0,02
<b>Dm</b>	0,04	0,02	0,06	-0,01	0,06	-0,05	0,01	<b>0,30*</b>	0,12	<b>0,28*</b>	-0,04
<b>DM</b>	-0,08	-0,12	0,07	-0,14	0,19	-0,19	0,18	0,08	-0,21	0,07	0,19
<b>DT</b>	-0,05	-0,09	0,09	-0,13	0,20	-0,19	0,16	0,22	-0,12	0,20	0,14
<b>Test</b>	0,20	0,26	-0,07	<b>0,35**</b>	<b>-0,37**</b>	<b>0,37**</b>	<b>-0,38**</b>	-0,24	0,03	-0,02	-0,12

Nota: \*p<0,05 e \*\*p<0,01

Obs Nota: A=Área, P= Perímetro, L= Largura, C= Comprimento, L/C= Razão Largura/comprimento, E= Elipsidade, FF= Fator de Forma, SL= Simetria Lateral, SAP= Simetria Antero-posterior, CV= Coeficiente de variação dos níveis de cinza, AT= Análise visual de cromatinas anormais, Turb= Turbilhonamento, Mot= Motilidade, Vig= Vigor, Conc= Concentração espermática, Test= Nível sérico de Testosterona, Dm= Defeitos Menores, DM= Defeitos Maiores e DT= Defeitos Totais.

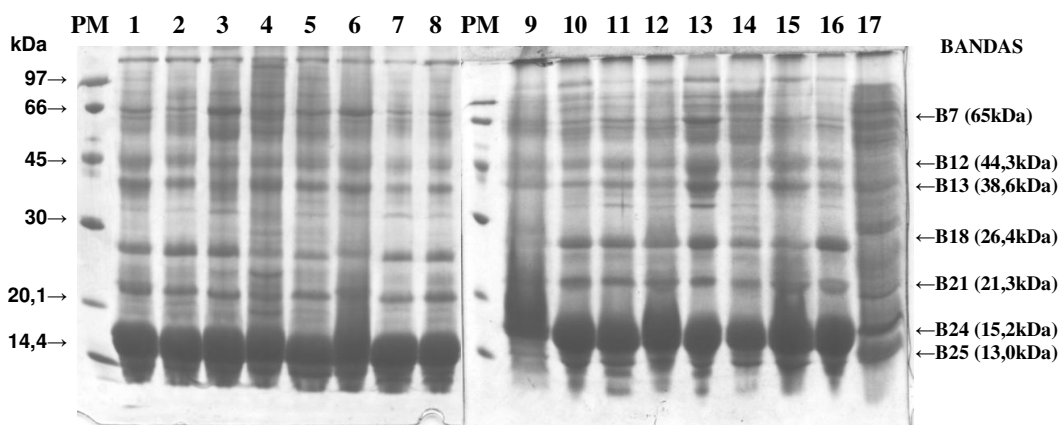
Os defeitos menores apresentaram uma correlação positiva com simetria lateral e coeficiente de variação dos níveis de cinza. Segundo Beletti et al (2004) as alterações cromatínicas geralmente se apresentam de forma heterogênea na cabeça dos espermatozoides e são acompanhadas de alterações morfológicas.

O nível sérico de testosterona apresentou uma correlação positiva com comprimento e elipsidade, ou seja, espermatozoides mais elípticos e menos esférico, mas negativa com fator de forma e razão largura:comprimento. Em ratos, durante a espermatogênese a partir do estágio VII, onde inicia o alongamento da espermátide redonda, as células de Sertoli necessitam de altos níveis de testosterona (SHARPE, 1984), portanto altas concentrações séricas, podem estar relacionados com a conformação da cabeça dos espermatozoides.

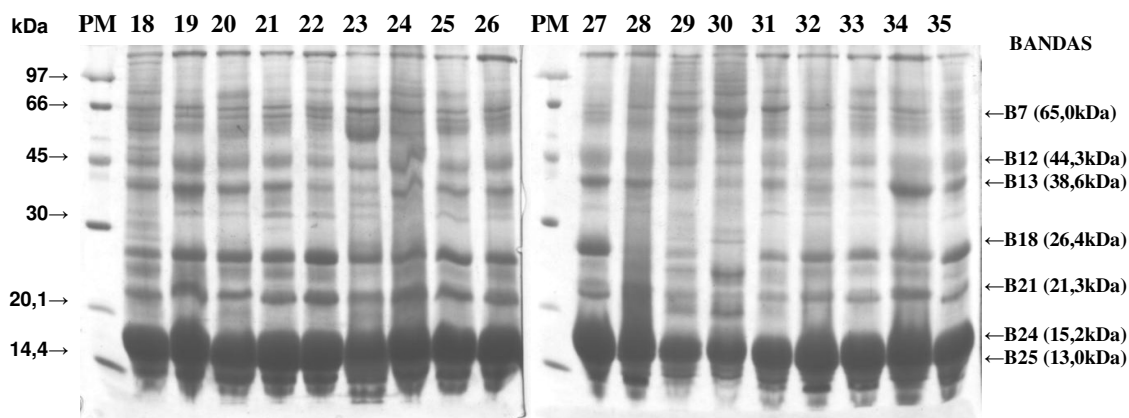
## IV 2. Análise das Proteínas do Plasma Seminal

A concentração de proteínas totais do plasma seminal demonstrou valores que variaram entre 2,63 a 69,44 mg/mL nas diferentes amostras, tendo média de 21,36 mg/mL, estando de acordo com Assumpção (2003) e Romitto (2003).

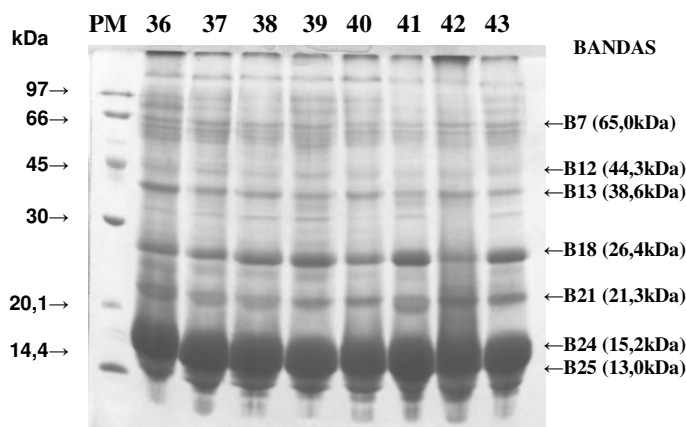
Os resultados das análises dos géis de eletroforese em SDS-PAGE 14% (Figura 3, 4 e 5) revelaram uma grande diversidade de proteínas em cada animal e entre indivíduos, constatando a presença de 26 polipeptídeos principais, com variação de 14 a 21 bandas individualmente e na média geral 17 por amostra. O peso molecular aparente (PMA) apresentou um intervalo de 11,2 a 124,1 kDa, os resultados estão de acordo com os obtidos por Roncoletta (1999).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore (n=17), PM – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) e as bandas protéicas presentes em todos animais (B7, B12, B13, B18, B21, B24 e B25).



**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore (n=18), PM – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) e as bandas protéicas presentes em todos animais (B7, B12, B13, B18, B21, B24 e B25).



**Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes das proteínas do plasma seminal de touros da raça Nelore (n=8), PM – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) e as bandas protéicas presentes em todos animais (B7, B12, B13, B18, B21, B24 e B25).

As bandas B7 (65,0 kDa), B12 (44,3 kDa), B13 (38,6 kDa), B18 (26,4 kDa), B21 (21,3 kDa), B24 (15,2 kDa) e B25 (13,0 kDa) estiveram presentes em todos os animais e as bandas B11 (50,3 kDa), B20 (22,7 kDa) e B23 (18,9 kDa) em apenas 16,3% das amostras (Tabela 4). Observou-se que 76,4% do total de proteínas das amostras apresentam PMA abaixo de 32,8 kDa, sendo que as bandas B24 (15,2 kDa) e B25 (13,0 kDa) estão presentes em maior quantidade e juntas correspondem a 49,0%, provavelmente essas proteínas sejam as BSP-A1/A2 e A3, importantes para o processo de capacitação espermática (MANJUNATH et al., 1993).

**Tabela 4.** Bandas, Peso Molecular Aparente (PMA), Média e Desvio padrão (Med±DP) da densitometria relativa e a frequência de cada banda (Freq) em touros da raça Nelore, Uberlândia-MG.

Bandas	PMA (kDa)	Med±DP	Freq (%)
B1	124,1	1,00±1,07	74,4
B2	113,2	0,15±0,34	25,6
B3	105,8	0,62±1,34	51,2
B4	96,6	0,47±0,55	55,8
B5	87,7	0,93±1,43	41,9
B6	79,9	0,88±0,97	58,1
B7	65,0	3,13±1,57	100,0
B8	61,3	2,25±1,21	90,7
B9	57,1	3,06±1,94	83,7
B10	53,3	0,48±1,30	20,9
B11	50,3	0,19±0,48	16,3
B12	44,3	4,47±1,94	100,0
B13	38,6	4,90±1,97	100,0
B14	35,1	1,07±1,03	62,8
B15	32,8	1,58±1,16	83,7
B16	29,4	0,51±0,78	34,9
B17	28,2	0,52±1,15	23,3
B18	26,4	7,45±2,36	100,0
B19	24,3	4,20±1,62	97,7
B20	22,7	0,57±1,44	16,3
B21	21,3	8,61±2,75	100,0
B22	19,8	1,16±2,07	30,2
B23	18,9	0,58±1,36	16,3
B24	15,2	36,67±7,17	100,0
B25	13,0	12,30±3,40	100,0
B26	11,2	2,22±2,30	53,5

O resultado das correlações entre a densitometria das bandas protéicas e as características físicas e morfológicas do sêmen e coeficiente de variação dos níveis de cinza da cabeça dos espermatozoides estão dispostos na Tabela 5.

A B1 (124,1 kDa), B3 (105,8 kDa), B8 (61,3 kDa) e B15 (32,8 kDa) demonstraram correlações positivas com defeitos maiores e defeitos totais, sendo que a B4 (96,6 kDa) apresentou uma correlação negativa com defeitos totais. A presença de espermatozoides com alterações morfológicas poderia interferir na interação entre a membrana e as proteínas originárias do testículo, epidídimo e glândulas acessórias. Cornwall et al. (1990) observaram o aumento, diminuição e até o desaparecimento de diversas proteínas no decorrer do trato epididimário. Para estes autores a saturação de sítios de ligação na membrana do espermatozoide impedindo mais interações, a degradação ou modificações das proteínas, justificaria esse fenômeno.

Wolfe et al. (1993) estudando o perfil protéico de touros submetidos ao tratamento de insulação testicular, observaram alterações como a diminuição de proteínas e aparecimento de outros polipeptídeos. Desordens de origem testicular

poderiam alterar o produto da secreção das células de Sertoli e Leydig, promovendo o aparecimento de novas proteínas.

**Tabela 5.** Correlação de Pearson entre os valores médios da densitometria das bandas e as características físicas e morfológicas do sêmen de touros da raça Nelore (n=43), Uberlândia-MG.

BD	Turb	Mot	Vig	Conc	Test	Dm	DM	DT
B1	0,02	0,08	0,17	0,29	-0,05	0,03	<b>0,49**</b>	<b>0,43**</b>
B2	0,09	0,04	0,06	0,16	-0,10	-0,12	-0,12	-0,16
B3	0,01	0,03	0,12	<b>0,34*</b>	-0,19	-0,07	<b>0,54**</b>	<b>0,41*</b>
B4	0,22	0,28	0,22	<b>0,31*</b>	-0,01	-0,29	-0,28	<b>-0,37*</b>
B5	-0,08	-0,14	0,03	-0,11	-0,15	-0,06	-0,18	-0,18
B6	-0,02	0,17	0,05	-0,04	-0,12	-0,11	-0,09	-0,13
B7	0,21	0,05	0,18	0,27	0,03	-0,20	0,27	0,12
B8	-0,02	-0,11	-0,01	0,11	-0,21	0,21	<b>0,39**</b>	<b>0,43**</b>
B9	0,11	0,24	0,28	0,07	0,11	<b>-0,35*</b>	-0,15	-0,29
B10	-0,07	0,03	-0,01	-0,09	0,18	0,01	0,00	0,01
B11	0,11	0,09	-0,04	<b>0,38*</b>	-0,15	-0,08	-0,17	-0,18
B12	0,09	-0,02	0,17	-0,10	0,17	0,24	-0,05	0,08
B13	-0,08	-0,06	0,02	-0,07	0,10	0,05	0,09	0,10
B14	0,26	0,21	0,29	-0,08	<b>0,34*</b>	-0,07	-0,03	-0,06
B15	0,16	0,11	0,23	0,24	0,22	0,11	<b>0,41**</b>	<b>0,40**</b>
B16	0,29	0,19	0,15	0,21	0,03	-0,16	-0,23	-0,27
B17	-0,05	<b>-0,43**</b>	<b>-0,35*</b>	-0,06	-0,13	-0,21	-0,14	-0,23
B18	-0,18	-0,02	-0,16	-0,13	-0,10	-0,05	0,06	0,03
B19	<b>0,40**</b>	<b>0,43**</b>	<b>0,47**</b>	<b>0,50**</b>	-0,01	0,12	0,10	0,14
B20	0,09	0,12	0,13	0,20	-0,12	<b>0,50**</b>	<b>0,33*</b>	<b>0,52**</b>
B21	0,08	-0,21	-0,10	0,14	0,01	-0,08	-0,21	-0,21
B22	-0,25	-0,16	-0,26	-0,17	0,07	-0,04	-0,06	-0,07
B23	-0,05	0,10	0,17	0,02	0,17	-0,12	-0,19	-0,21
B24	-0,11	-0,09	-0,23	<b>-0,34*</b>	-0,02	0,02	-0,26	-0,21
B25	0,01	0,22	0,08	0,19	-0,01	0,00	0,16	0,14
B26	-0,23	<b>-0,35*</b>	<b>-0,31*</b>	-0,29	-0,13	0,14	0,04	0,11

Nota: \*p<0,05 e \*\*p<0,01, BD: Banda, Turb: turbilhamento, Mot: motilidade, Vig: vigor, Conc: concentração espermática, Test: nível sérico de testosterona, Dm: defeitos menores, DM: defeitos maiores, DT: defeitos totais e CV: coeficiente de variação dos níveis de cinza.

A concentração espermática apresentou correlação positiva com as bandas B3 (105,8 kDa), B4 (96,6 kDa) e B11 (50,3 kDa) e negativa com a B24 (15,2 kDa) que possivelmente é o conjunto de proteínas BSP A1/A2 e A3, produzidas pelas vesículas seminais (MANJUNATH et al. 1993). Assim, quanto maior a concentração, menores serão os níveis de B24 (15,2 kDa), pois um ejaculado mais concentrado possuiria menos secreção oriunda das glândulas anexas e mais conteúdo dos testículos e epidídimo. Esse fato explicaria a correlação da B3 (105,8 kDa) e B4 (96,6 kDa) com defeitos maiores e totais, pois os animais com alta concentração, mas com elevadas alterações morfológicas, expressariam mais essas proteínas de origem testicular e epididimária, possivelmente o local de origem dos problemas.

A banda B9 (57,1 kDa) apresentou uma correlação negativa com defeitos menores, ou seja, quanto maior a quantidade dessa proteína menor a quantidade de defeitos. Esse polipeptídeo apresentou PMA próximo ao da “osteopontin” (55 kDa) que foi associada a fertilidade por Killian et al. (1993). Observou-se uma correlação positiva entre a banda B20 (22,7 kDa) com defeitos menores, defeitos maiores, defeitos totais e coeficiente de variação dos níveis de cinza (Tabela 6). Romitto (2003) encontrou relação entre uma proteína com peso molecular de 22 kDa com defeitos maiores em touros da raça Simental.

Animais expostos a determinadas toxinas que levam a disfunções epididimárias e infertilidade, apresentam aumento de uma proteína no conteúdo do fluído seminal, denominada SP22, que está presente na membrana da cabeça e cauda de espermatozóides (KLINEFELTER et al, 2002). Wagenfeld et al. (1998) avaliando o efeito do agente toxicante ornidazole em ratos, identificaram uma proteína (CAP-1) que aumentou no fluído epididimário. Para esses autores o aumento resultaria da liberação da proteína da membrana espermática, sendo que o sequenciamento da CAP-1, demonstrou ser idêntica a SP22 (WELCK et al, 1998).

Com relação as características físicas do sêmen a proteína B19 (24,3 kDa) apresentou uma correlação positiva com turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração. Essa proteína apresentou PMA semelhante a “lipocalin prostaglandina D Sintase” (PGDS) de 26 kDa, uma das proteínas mais prevalentes em touros de alta fertilidade, com potencial atuação tanto no desenvolvimento, quanto na maturação dos espermatozóides (GENERA et al 1998). Porém, não existem relatos da sua correlação com as características físicas do sêmen.

As bandas B17 (28,2 kDa) e B26 (11,2 kDa) mostraram correlação negativa com motilidade e vigor. Na literatura é descrito a “spermadhesin” (aSPD) uma proteína com peso molecular de 13 kDa (SCHÖNECK et al., 1995) e que possui isoforma de 28 kDa (MOURA et al., 2006), sendo uma proteína que exerce função sobre o metabolismo espermático, proteção contra danos oxidativos e motilidade, onde altas quantias dessa proteína provocam diminuição da motilidade (SCHÖNECK et al., 1995). Nesse estudo quanto maior a quantidade de B17 (28,2 kDa) e B26 (11,2 kDa), com PMA de 28kDa e 11,2kDa, respectivamente, menor é a motilidade e vigor, reforçando a possibilidade de ser a aSPD.

A banda B14 (35,1 kDa) revelou uma correlação positiva com a testosterona e negativa com o coeficiente de variação dos níveis de cinza, ou seja, quanto maior a

concentração de testosterona, maior a quantidade dessa proteína e menor o coeficiente de variação dos níveis de cinza da cabeça, indicando homogeneidade da cromatina. Provavelmente a síntese dessa proteína seja dependente da testosterona e podendo estar associada com a estabilização da cromatina, já que tem uma correlação negativa com o CV. Durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo, grupos thiol da protamina se oxidam dentro das ligações disulfídicas, promovendo a estabilização do núcleo espermático dentro de uma estrutura compacta de DNA (SELIGMAN et al., 2005). Richthoff et al. (2002) encontraram uma correlação negativa ( $r=-0,13$ ) entre os níveis de testosterona e o índice de fragmentação do DNA.

A B26 (11,2 kDa) está relacionada negativamente com a contagem de espermatozoides com cromatina heterogênea. Essa proteína poderia ser a aSPD, onde uma de suas várias funções é a proteção contra danos oxidativos (SCHÖNECK et al., 1995; MOURA et al., 2006), o que resultaria numa maior estabilização da cromatina durante a passagem pelo trato do epidídimo.



A tabela 6 apresenta a correlação das proteínas do plasma seminal com as características morfométricas dos espermatozoides por análise computacional. A B2 (113,2 kDa) está relacionada com a largura do espermatozóide e conseqüentemente interfere na área, L/C, E e FF. As bandas B7 (65,0 kDa), B9 (57,1 kDa), B12 (44,3 kDa) e B23 (18,9 kDa) tem correlação negativa com a área da cabeça, ou seja, quando ocorre seu aumento as cabeças tendem a ser menores, contudo B9 (57,1 kDa) também esta relacionada com a simetria da cabeça, semelhante a B13 (38,6 kDa).

**Tabela 6.** Correlação de Pearson entre os valores médios da densitometria das bandas e as características morfométricas do sêmen, coeficiente de variação dos níveis de cinza da cabeça de espermatozoides e análise visual de cromatina anormais de touros da raça Nelore (n=43), Uberlândia-MG.

BD	A	P	L	C	L/C	E	FF	SL	SAP	CV	AT
B1	-0,18	0,09	0,00	0,20	-0,02	0,16	-0,16	-0,01	-0,09	0,06	0,02
B2	<b>-0,40</b>	-0,12	<b>-0,32</b>	0,22	<b>-0,31</b>	<b>0,42</b>	<b>-0,41</b>	0,06	-0,19	0,22	0,16
B3	0,11	-0,04	-0,10	-0,01	-0,04	0,03	-0,03	0,14	-0,15	0,12	0,11
B4	-0,19	-0,28	-0,28	-0,11	-0,26	0,13	-0,12	-0,06	-0,24	-0,06	0,24
B5	-0,17	-0,04	-0,16	0,04	-0,07	0,09	-0,09	0,11	-0,14	0,11	0,03
B6	0,15	-0,20	-0,11	-0,14	-0,16	0,01	-0,02	-0,18	0,16	-0,22	-0,02
B7	<b>-0,38</b>	-0,01	-0,10	0,08	-0,07	0,12	-0,12	-0,03	-0,11	0,11	0,10
B8	0,26	-0,02	-0,05	0,06	-0,12	0,13	-0,13	0,11	0,12	0,00	0,03
B9	<b>-0,46</b>	-0,11	-0,02	-0,25	0,13	-0,28	0,28	<b>-0,35</b>	<b>-0,33</b>	-0,01	-0,02
B10	0,19	0,10	0,12	-0,01	0,13	-0,11	0,11	0,03	0,05	-0,12	0,11
B11	0,21	0,11	0,01	0,17	-0,05	0,16	-0,16	0,03	0,17	0,02	-0,01
B12	<b>-0,49</b>	0,01	-0,01	-0,08	0,08	-0,11	0,11	-0,25	-0,09	0,15	0,06
B13	-0,29	0,10	0,11	0,01	0,19	-0,14	0,14	<b>-0,32</b>	-0,28	0,16	-0,02
B14	-0,07	0,02	0,19	-0,18	0,18	-0,26	0,27	0,09	0,00	<b>-0,31</b>	-0,04
B15	-0,12	0,03	-0,02	0,02	0,05	-0,01	0,02	0,06	-0,21	0,20	0,13
B16	-0,15	0,00	0,01	-0,08	0,12	-0,14	0,14	0,10	-0,30	-0,02	0,03
B17	0,04	-0,01	-0,10	0,03	-0,02	0,03	-0,03	0,18	-0,10	0,26	-0,22
B18	<b>0,51</b>	0,05	0,12	-0,10	0,11	-0,17	0,17	-0,01	0,02	-0,14	0,21
B19	-0,13	-0,09	-0,07	0,00	-0,13	0,11	-0,11	-0,06	0,06	-0,11	0,14
B20	0,13	-0,06	-0,17	0,12	-0,16	0,22	-0,21	0,20	-0,11	<b>0,31</b>	0,16
B21	0,15	-0,08	-0,11	0,01	-0,18	0,14	-0,14	0,00	0,26	0,16	-0,13
B22	-0,14	0,14	0,13	-0,01	0,17	-0,15	0,15	-0,14	0,15	0,02	-0,12
B23	<b>-0,60</b>	-0,01	-0,07	-0,04	0,04	-0,05	0,05	-0,25	-0,12	0,09	0,12
B24	<b>0,37</b>	0,04	0,12	-0,01	0,05	-0,05	0,05	0,21	0,14	-0,17	-0,10
B25	-0,06	-0,08	-0,06	-0,03	-0,07	0,03	-0,04	-0,21	0,06	-0,05	0,09
B26	0,12	0,09	0,02	0,26	-0,11	0,27	-0,27	0,29	0,15	-0,02	<b>-0,33</b>

Nota: \*p<0,05 e \*\*p<0,01, Nota: BD=Banda, A=Área, P= Perímetro, L= Largura, C= Comprimento, L/C= Razão Largura/comprimento, E= Elipsidade, FF= Fator de Forma, SL= Simetria Lateral, SAP= Simetria Antero-posterior, CV= Coeficiente de variação dos níveis de cinza e AT= Análise visual de cromatinas anormais.

Partindo do pressuposto que as proteínas interagem com os espermatozoides, esses com maior área teria um mais sítios de ligação na

membrana espermática, possibilitando maior interação com as proteínas do plasma (CORNWALL et al., 1990). Assim, maior quantidade de proteínas poderiam se ligar a membrana dos espermatozoides e não ficariam imersas no plasma seminal. Porém, não podemos esquecer que a definição da forma da cabeça dos espermatozoides ocorre nos testículos e que essas proteínas poderiam participar da espermatogênese, ou serem produtos da secreção das células de Sertoli relacionados à essas características. A B9 (57,1 kDa) apresentou uma correlação negativa, ou seja, quanto maior sua quantidade menor será a área da cabeça. Sendo uma característica importante já que espermatozoides com baixa compactação de cromatina, geralmente apresentam maior área (FERRARI et al., 1998). Existe a possibilidade da B9 (57,1 kDa) ser a osteopontin, uma proteína que possui expressão gênica nos testículos (KILLIAN et al., 1999), e que estaria envolvida com células de adesão e migração no epitélio seminífero.

As bandas B24 (15,2 kDa) e B18 (26,4 kDa) são opostas as anteriores, ou seja, quando estas aparecem em maior quantidade, as cabeças tendem a ser maiores. O que não é uma característica desejável, já que espermatozoides com problemas de compactação de cromatina tendem a ter maior área (BELETTI et al., 2004; SAILER et al., 1996). Existe a possibilidade da B24 (15,2 kDa) ser as proteínas BSP A1/A2 e A3, ligadas a capacitação dos espermatozoides (MANJUNATH et al., 1993).

Avaliando os resultados de relação entre a morfologia espermática e proteínas do plasma seminal, verificou-se que existe a possibilidade de ocorrer tal relação, mas a mesma deve estar associada à defeitos de morfologia que interfiram na integridade estrutural e funcional da membrana, alterando sua interação com proteínas solúveis do plasma seminal (ROMITTO, 2003).

## V CONCLUSÃO

Conclui-se que existe uma grande variedade de proteínas no conteúdo do plasma seminal, e essas podem estar relacionadas com as alterações cromatínicas, a morfologia espermática e a morfometria da cabeça, revelando o potencial dessas proteínas atuarem como marcadores bioquímicos. A B14 (35,1 kDa), provavelmente é uma proteína andrógeno-dependente.

## V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO MARQUES, V; GOULART, L. R; FELICIANO SILVA, A. E. D. Variations of proteins profiles and calcium and phospholipase A2 concentrations in thawed bovine sêmen and their relation to acrosome reaction. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p.825-829, 2000.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v.57, p.380-403, 1983.

ANDERSSON, M. Relationships between GnRH-induced testosterone maxima, sperm motility and fertility in Ayrshire bulls. **Animal Reproduction Science**, v.27, p.107-111, 1992.

BALLACHEY, B. E; HOHENBOKEN, W. D; EVENSON, D. P. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 915-925, 1987.

BAXTER, J.D. General concepts of endocrinology. In: **Basic & clinical endocrinology**. GREENSPAN, F.S; BAXTER, J.D. (eds.). 4 ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994, cap. 1, p1-63.

BELETTI, M. E; COSTA, L. F. A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v.25, n. 2, p. 97-107, 2003.

BELETTI, M. E; COSTA, L. F. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationsh sperm morphology. **Theriogenology**, v.3-4, n.62, p.398-402, 2004.

BELETTI, M. E; COSTA, L. F; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities by toluidine blue staining in Bull spermatozoa. **Brasilian Journal Morphology Science**, v.22, n2, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M. E; COSTA, L. F; VIANA, M. P. A computacional approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 79, n.1, p. 17-23, 2004.

BELETTI, M. E; MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brasilian Journal of Genetics**, v.19, n.1, p. 97-103, 1996.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Testicular and semen alteration after three days of experimental cryptorchidism in rabbit. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 14, p. 88-88, 1997.

BELLIN, M. E; HAWKINS, H. E; OYARZO, J. N. et al. Fertility-associated antigen Bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v. 76, p.2032-2039, 1998.

BRUSCHI, J.H.; MENDES, M.C.; VIANA, E. S.; ABREU, J. J.; MEGALE, F. Teores de ácido cítrico, frutose, proteínas totais e seu fracionamento eletroforético no sêmen do cão pastor alemão normal. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, v.31, p.13-17, 1979.

COETZEE, K; KRUGER, T. F; LOMBARD, C. J. et al. Assesmente of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. **Fertility and Sterility**, v.71, n.1, p. 80-84, 1999.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen**, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.

CORNWALL, G. A; UREEBURG, J. T; HOLLAND, M. K. et al. Interactions of labeled secretory proteins with spermatozoa after injection of 35S-methionine in the mouse. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 121-129, 1990.

DAVIS, O. R; GRAVANCE, C. G. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 2, p. 412-417, 1993.

DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E. P. **In: The proteins**. I-A. (NEURATH, H.; BAILEY, K. Eds), 1953.

ESTERHUIZEN, A. D; FRANKEN, D. R; LOURENS, J. G. H. et al. Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. **Human Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 657-661, 2000.

FERRARI, M. R.; SPIRITO, S. E.; GIULIANO, S. M.; FERNÁNDEZ, H. Á. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 30, n. 2, p. 85-89, 1998.

FARRELL, P. B; PRESICCE, G. A; GROCKETT, C. C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-879, 1998.

FERNANDES, C. E. S. **Perfil eletroforético, características estruturais e fertilização in vitro do sêmen de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Tese Doutorado, 2005.

GAGNON, C. **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999.

GENERA, R. L et al. Identification of a fertility-associated protein in bulls seminal plasma as lipocalin type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v.58, p.826-833, 1998.

GIWERCMAN, A; RICHTHOFF, J; HJOLLUND, H. et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. **Fertility and Sterility**, v.80, n. 6, 2003.

GOLAN, R; COOPER, T. G; OSCHRY, Y. et al. Epididymal maturation of chromatin in spermatozoa from control monkey (*Macaca fascicularis*) and those treated with cetorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist. **Biology of Reproduction**. v.57, p. 354-359, 1997a.

GOLAN, R; SHOCHAT, L; WEISSENBERG, R. et al. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using Acridine Orange staining. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 47-54, 1997b.

GRAVANCE, C. G; CHAMPION, Z. J; CASEY, P. J. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 49, p. 1219-1230, 1998.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v.9, p.401-410, 1964.

JOBIM, M. I. M; OBERST, E. R; SALBEGO, C. G. et al. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. **Acta scientiae veterinariae**. v.31, n.1, p. 21- 30, 2003.

JONES, R; BROWN C. R; VON GLÓS, K. I. et al. Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. **Biochemical Journal**, v.188, p. 667-676, 1980.

KATZ, D. F; OVERSTREET, J. W; SAMUELS, S. J. et al. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**, v.7, n. 4, p. 203-208, 1986.

KILLIAN, G. J; CHAPMAN, D. A; ROGODWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KILLIAN, G. L; CHAPMAN, D. A; CANCEL, A. M. et al. Male factors affecting sperm fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 2, 1999.

KLINEFELTER, G. R; WELCH, J. E; PERREAULT, S. D. et al. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. **Journal of Andrology**, v. 23, n.1, p.48-63, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v.227, p.680, 1970.

LAVON, U. Characterization of boar, bull, ram and rabbit seminal plasma proteins by gel disc electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.31, p.29-37, 1972.

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

MANJUNATH, P; CHANDONNET, L; LEBLOND, E. et al. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.48, p.27-37. 1993.

MATTOS, R. C; JOBIM, M. I. M; OBERST, E. R et al. BSP A1/A2: a seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15th International Congress on Animal Reproduction. **Abstracts**, v.2, p.462, 2004.

MELLO, M. L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n.3, p. 387-392, 1982.

MOURA, A. A; CHAPMANA, D. A; KOC, H. et al. A comprehensive proteomic analysis of the accessory. **Animal Reproduction Science**, p. 1-20, 2006.

OSTERMEIER, G. C; SARGEANT, G. A; YANDELL, B. S. et al. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 595-602, 2001.

RICHTHOFF, J; SPANO, M; GIWEREMAN, Y. L. et al. The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm



chromatin structure assay (SCSA). **Human Reproduction**, v.17, n.12, p. 3162-3169, 2002.

ROMITTO, G. C. **Perfil bidimensional das proteínas de plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Dissertação Mestrado, p.1-192, 2003.

RONCOLETTA, M; FRANCESCHINI, P. H; LIMA, V. F. M. H. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.2, 1999.

RUSSEL, D.L; ETTLIN, R.A; SINHA HIKIM, A.P. et al. Mammalian spermatogenesis. **In: Histological and histopathological evaluation of the testis**. RUSSELL, D.L; ETTLIN, R.A; SINHA HIKIM, A.P et al. (eds). Bolesta: Cache River, 1990, cap. 1, p.1-40.

SAILER, B. L; JOST, L. K; EVENSON, D. P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, New York, v. 24, p. 167-173, 1996.

SALVADOR, D. F; OLIVEIRA, J. S; SANTORO, M. M. et al. Gel filtrate chromatographic profile of seminal plasma protein in Nelore Bulls and its correlation of andrologic and freezing sêmen parameters. In: 15th International Congress on Animal Reproduction. **Abstracts**, v.1, p.193, 2004.

SALVADOR, F. D; ANDRADE, V. J; FILHO, V. R. V. Potencial das proteínas do plasma seminal ou ligadas à membrana espermática como indicadores da fertilidade de touros. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 35, p.61-71, 2001.

SANTOS, M. D; TORRES, C. A. A; GUIMARÃES, J. D. et al. Libido de touros nelore: efeito da proporção touro:vaca sobre a taxa de gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 293-300, 2003.

SANTOS, M. D; TORRES, C. A. A; RUAS, J. R. M. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore submetidos a diferentes proporções touro:vaca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.4, p. 497-503, 2004.

SASAKI, Y; KOHSAKA, T; KAWARASAKI, T. et al. Immunoreactive relaxin in seminal plasma of fertile boars and its correlation with sperm motility characteristics determined by computer-assisted digital image analysis. **International Journal of Andrology**, v.24, p. 24-30, 2001.

SELIGMAN, J; NEWTON, G. L; FAHEY, R. C. et al. Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of  $\gamma$  Glutamyl-Transpeptidase in sperm maturation. **Journal of Andrology**, v.26, n.5, p.629-637, 2005.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: Reproduction in domestic animals. CUPPS, P.T (eds). 4 ed. San Diego: Academic, 1991, cap.6, p.221-250.

SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. **In: The physiology of reproduction**. KNOBIL, E; NEILL, J.D. (eds). 2 ed. New York: Raven, 1994, v.2, cap.22, p.1363-1434.

SHARPE. Intratesticular factors controlling testicular function. **Biology of Reproduction**, v.30, p.29-49, 1984.

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

SILVA, A.E.D.F; DODE, M.A.N; UNANIAN, M.M. Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam. **EMBRAPA-CNPGC. Documentos**, n.51, p. 1-128, 1993.

WAGENFELD, A; YEUNG, C; STRUPAT, K. et al. Shedding of rat epididymal sperm protein associated with infertility induced by ornidazole and  $\alpha$ -chlorohydrin. **Biology of Reproduction**, v.58, p. 1257-1265, 1998.

WARD, W. S; COFFEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**. v. 44, n. 4, p. 569-574, 1991.

WELCH, J. E; BARBEER, R. R; ROBERTS, N. L. et al. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family. **Journal of Andrology**, v.19, p. 385-392, 1998.

WOLFE, D. F; BRADLEY, J. T; RIDDELL, M. G. Characterization of seminal plasma and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v.40, p.1083-91, 1993.

ZHANG, X; GABRIEL, M. S; ZINI, A. Sperm Nuclear Histone to Protamine Ratio in Fertile and Infertile Men: Evidence of Heterogeneous Subpopulations of Spermatozoa in the Ejaculate. **Journal of Andrology**, v. 27, n.3, 2006.