

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

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS E
CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA, INSULINA E IGF-I
DO PLASMA SEMINAL DE TOURINHOS GIR-
LEITEIROS NA PERIPUBERDADE**

Fernando Andrade Souza

Belo Horizonte
2011

Fernando Andrade Souza

Perfil eletroforético de proteínas e concentrações de leptina, insulina e IGF-I do plasma seminal de tourinhos Gir-Leiteiros na peripuberdade

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

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. *Vicente Ribeiro do Vale Filho.*

Co-orientadores: Prof. *Venício José de Andrade.*

Prof. *Marcelo Matos Santoro.*

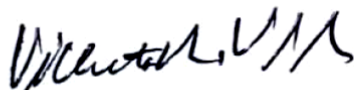
Belo Horizonte
2011

Souza, Fernando Andrade, 1979-
S729p Perfil eletroforético de proteínas e concentrações de leptina, insulina e IGF-I do plasma seminal de tourinhos Gir-Leiteiros na peripuberdade / Fernando Andrade Souza. – 2011.
114p. : il.
Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho
Co-orientador: Venício José de Andrade, Marcelo Matos Santoro
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

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

CDD – 636.214 089 26

Tese defendida em 17 de fevereiro de 2011 e aprovada pela banca examinadora constituída por:



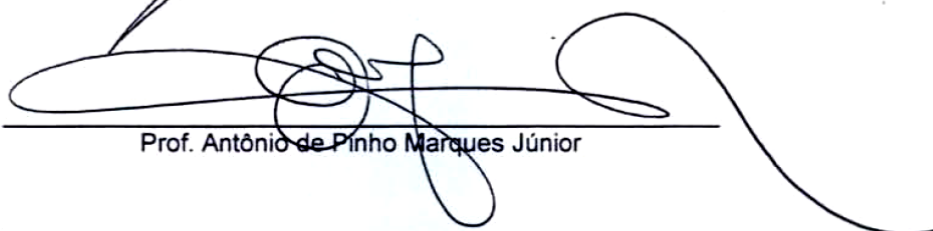
Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho
Orientador



Prof. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura



Prof. Guilherme Ribeiro Valle



Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior



Prof. Martinho Almeida e Silva



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

CERTIFICADO

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

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

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 16 de Junho de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)

*Voltando Pra Minha Terra Eu Renasci
Nos Anos Que Fiquei Distante Acho Que Morri
Morri De Saudade Dos Pais, Irmãos E Companheiros
Ao Cair Da Tarde No Velho Terreiro
A Gente Cantava As Mais Lindas Canções*

*Vióla Afinada E Na Voz Dueto Perfeito
Longe Eu Não Cantava Doia Meu Peito
Na Cidade Grande Só Tive Ilusões*

*Mas Voltei, Mas Voltei, Eu Voltei
E Ao Passar Na Porteira A Mata O Perfume
Eu Fui Escoltado Pelos Vagalumes
Pois, Era Uma Linda Noite De Luar*

*Mas Chorei, Mas Chorei, Eu Chorei
Ao Ver Meus Pais Meus Irmãos Vindo Ao Meu Encontro
A Felicidade Misturou Meu Pranto
Com O Orvalho Da Noite Deste Meu Lugar*

*Ganhei Dinheiro Lá Fora, Mas Foi Tudo Em Vão
A Natureza É Meu Mundo, Eu Sou O Sertão
Correr Pelos Campos Floridos Feito Um Menino
Esquecer As Magoas E Os Desatinos
Que A Vida Lá Fora Me Proporcionou*

*Ouvir Sabiá Cantando E A Juriti
E A Felicidade De Um Bem-Ti-Vi
Que Parece Dizer Meu Amigo Voltou
Mas Voltei, Mas Voltei, Eu Voltei
E Ao Passar Na Porteira A Mata O Perfume
Eu Fui Escoltado Pelos Vagalumes
Pois Era Uma Linda Noite De Luar*

*Mas Chorei, Mas Chorei, Eu Chorei
Ao Ver Meus Pais Meus Irmãos Vindo Ao Meu Encontro
A Felicidade Misturou Meu Pranto
Com O Orvalho Da Noite Deste Meu Lugar*

*Zezeti
(Escolta de Vagalumes)*

“Nada é fácil, nada nesse mundo é dado de presente, tudo precisa ser aprendido com muito esforço. Um homem que vai a busca do conhecimento deve ter o mesmo comportamento de um soldado que vai para a guerra: bem desperto, com medo, com respeito e com absoluta confiança. Se seguir esses requisitos, pode perder uma batalha ou outra, mas jamais irá lamentar-se do seu destino.”

Carlos Castañeda

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre se fazer presente. Pai de eterno amor e auxílio, principalmente nos momentos mais difíceis. Por mostrar-me sempre a beleza que há no meio do caminho.

A Universidade Federal de Minas Gerais e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG – Uberaba) e a todos da fazenda experimental Getúlio Vargas, pelo apoio na execução deste experimento.

Ao meu orientador, Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho. Pessoa ímpar. Por toda sua dedicação, ensinamentos e amizade. Por ter acreditado em mim. Pela oportunidade que me presenteou de compartilhar tanto do seu brilhantismo quanto do seu nobre caráter que ficam de exemplos. Obrigado professor!

Ao Prof. Venício José de Andrade. Pessoa sem medidas. Ser humano único, capaz das mais belas atitudes sem nunca precisar sair da sua simplicidade. Por todo apoio e amizade. Novamente, obrigado professor!

Ao Prof. Marcelo Matos Santoro por todos os ensinamentos e apoio na execução deste trabalho. Sem sua ajuda teria sido bem mais difícil. Obrigado!

A banca examinadora: Prof. Martinho de Almeida e Silva, Prof. Antonio de Pinho Marques Júnior, Prof. Guilherme Ribeiro Valle e Prof. Arlindo de Alencar Araripe Moura. Obrigado pela ajuda e conselhos na correção desta tese. Professor Arlindo, obrigado por toda ajuda nas análises finais, sua ajuda foi fundamental no término deste trabalho.

A todos os amigos do laboratório de enzimologia do ICB. Uma nova família, um novo foco de trabalho, um novo mundo. Obrigado pela oportunidade de uma nova perspectiva.

A James (Jamil), Januária (Jane) e Tatá (Thaís), pessoas ímpares que conquistaram meu coração. As páginas aqui se tornaram poucas para eu poder descrever o sentimento que carrego por vocês. Assim, me resumo a dizer: obrigado, meus amigos!

Aos meus pais, Antonia e Newton, por todo apoio e amor. Sem vocês não conseguiria suportar o peso da jornada. Apesar da distância, sempre presentes. Obrigado, amo vocês!

A minha irmã, Cris, meu amor maior. Criatura que toma conta desse meu coração. Amo-te, mana, obrigado por tudo!

Ao meu mano “véi”, Júnior, por todo amor que me doa. Por sempre se manter ao meu lado, por todas as preocupações, por todos os conselhos, por tudo... te amo mano!

A minha linda, minha namorada, Carol, pelos bons momentos de convivência, pelo apoio durante a caminhada, pelas prosas sem rumo, pelo gosto comum aos cavalos, pelo caráter e

personalidade forte (bem, bem, bem, beeeemmm forte). E claro, não poderia esquecer, obrigado pela escolta de vagalumes, por sua amizade e seu amor!

Aos meus irmãos de república, Jorgito (Jorge) e Pabritinho (Pablo), pela amizade que conquistamos. Pelas boas conversas, pelos almoços de domingo, por me salvarem dos meus momentos hipoglicêmicos (25mg/dL; valeu Jorgito), pelas bagunças, pelos sorrisos, pelo companheirismo, por me aturarem e acima de tudo, pelas verdades... Obrigado, vocês são demais!

Aos meus eternos irmãos de república, Gasparzinho (Ferdinan) e Corujito (Hélio), apesar da distância vocês sempre se fizeram presentes. Por tudo que esses anos nos ensinaram, por tudo que passamos juntos longe de casa. A vocês meus irmãos, por todos os momentos, eu agradeço.

Aos amigos da pós-graduação e graduação: Marçanga (Márcio – Loiron Fantástico), Jairanga (Jair, Negão), Léo Viola, Paulo Eduardo, Lucas Emerik (Caramelo), Ticiano (Titi), Anibal, Guilherme, Felipe Albano, Diego, Telma, Custódio, Fabes (Fabiana Varago), Vinícius, Carol da Noruega e Daline.

A Haddad (Camila) e Kate (Caterine), mulherada danada. Irmãs que moram no meu coração. Sempre levarei vocês aonde for. Agradeço a Deus por ter me permitido conhecê-las, criaturas abençoadas e iluminadas. Amo vocês, obrigado pela amizade sincera!

Aos professores Antônio de Pinho Marques Júnior, Marc Roger Jean Marie Henry e Monique de Albuquerque Lagares, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Ao professor Álan Maia Borges, meu orientador de mestrado, que construiu a base para a edificação do conhecimento e que me fez sempre buscar por algo a mais. Por toda sua ajuda e apoio, que sempre foram presentes. Obrigado!

Ao professor José Monteiro, por ter me mostrado um novo mundo, o dos cavalos. Vício apaixonante. Obrigado por tudo, devo muito ao senhor.

A equipe do Colegiado de Pós-Graduação.

A Belo Horizonte, cidade inigualável de povo pitoresco e acolhedor. A você BH, meu muito obrigado! Realmente, Minas é o mundo, é o mundo da gente...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
 Capítulo I: Revisão de literatura	
Puberdade e a qualidade do plasma seminal sob ação de hormônios e proteínas locais.....	15
Resumo.....	15
Abstract.....	15
1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1 Puberdade em touros.....	16
2.2 Ação da leptina nos testículos diminuindo a concentração de testosterona e a qualidade da célula espermática.....	18
2.3 Insulina no plasma seminal e a qualidade espermática.....	21
2.4 Ação do IGF-I na qualidade seminal.....	23
2.5 Proteínas do plasma seminal e a qualidade espermática: destaque ao antígeno associado à fertilidade.....	25
Considerações finais.....	28
Objetivo geral.....	29
Objetivos específicos.....	29
Referências bibliográficas.....	29
 Capítulo II: Experimento 01	
Perfil eletroforético do plasma seminal de tourinhos Gir-Leiteiros na peripuberdade e sua correlação com os parâmetros espermáticos.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	36
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	38
2.1 Localização e dados climatológicos.....	38
2.2 Animais experimentais e manejo nutricional.....	38
2.3 Procedimento experimental.....	39
2.3.1 Coleta do plasma seminal.....	39
2.3.1.1 Determinação da concentração de proteínas totais do plasma seminal (PT).....	40
2.3.1.2 Análise eletroforética, em SDS-PAGE, do plasma seminal.....	40
2.4 Análise Estatística.....	41
3. Resultados e Discussão.....	42
3.1 Concentração de proteínas totais analisadas pelo método de Bradford.....	42
3.2 Perfil e densidade óptica das bandas protéicas presentes no plasma seminal durante a peripuberdade.....	44
3.3 Correlação entre a intensidade das bandas protéicas, os parâmetros espermático e os picos de proteínas com afinidade à heparina.....	48
4. Conclusão.....	57
Referências bibliográficas.....	57

Capítulo III: Experimento 02

Determinação de IGF-I, leptina e insulina no plasma seminal associados aos parâmetros andrológicos durante a peripuberdade de tourinhos Gir-Leiteiros.....	60
Resumo.....	60
Abstract.....	60
1. Introdução.....	61
2. Material e Métodos.....	62
2.1 Local, dados climáticos, animais experimentais e manejo alimentar.....	62
2.2 Procedimento experimental.....	62
2.2.1 Coleta do plasma seminal.....	62
2.2.1.1 Análise do plasma seminal para determinação da concentração de IGF-I, Leptina e Insulina.....	62
2.2.1.1.1 Determinação das concentrações de IGF-I.....	63
2.2.1.1.2 Determinação das concentrações de Leptina.....	64
2.2.1.1.3 Determinação das concentrações de Insulina.....	64
2.3 Análise estatística.....	65
3. Resultados e Discussão.....	65
3.1 Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I).....	65
3.2 Insulina.....	74
3.3 Leptina.....	79
4. Conclusão.....	84
Referências Bibliográficas.....	84

CAPÍTULO IV: Experimento 03

Classificação andrológica por pontos (CAP) associada aos parâmetros hormonais e protéicos seminais durante a peripuberdade de tourinhos Gir-Leiteiros.....	88
Resumo.....	88
Abstract.....	88
1. Introdução.....	89
2. Material e Métodos.....	89
2.1 Local, dados climáticos, animais experimentais e manejo alimentar.....	89
2.2 Procedimento experimental.....	89
2.2.1 Coleta do plasma seminal.....	89
2.2.2 Classificação andrológica por pontos (CAP).....	89
2.3 Coleta do soro sanguíneo para determinação da concentração de testosterona.....	90
2.3.1 Análise do soro sanguíneo para determinação da concentração de testosterona.....	90
2.4 Análise Estatística.....	92
3. Resultados e Discussão.....	93
3.1 Classificação andrológica por pontos (CAP) de tourinhos Gir-Leiteiros na peripuberdade.....	93
3.2 Correlação dos valores de IGF-I, leptina, insulina e proteínas do plasma seminal com a classificação andrológica por pontos (CAP).....	96
3.3 Descrição dos valores séricos de testosterona no momento da puberdade.....	99
4. Conclusão.....	101
Referências Bibliográficas.....	101

CAPÍTULO V: Sugestões e Recomendações.....	105
---	------------

Anexos.....	106
1A Géis de eletroforese no período de -60 e -30 da puberdade.....	106
1B Géis de eletroforese no período de 0 e +30 da puberdade.....	107
1C Gel de eletroforese no período de +60 da puberdade.....	108
2A Diagrama dos géis de eletroforese no período de -60 e -30 da puberdade.....	109
2B Diagrama dos géis de eletroforese no período de 0 e +30 da puberdade.....	110
2C Diagrama do gel de eletroforese no período de +60 da puberdade.....	111
3 CAP – Classificação andrológica por pontos para touros, baseada na circunferência escrotal e características do sêmen (índice andrológico).....	112
4 Ficha para espermograma.....	113
5 Quadro da CAP estimada no início do período experimental.....	114

LISTA DE TABELAS		
Capítulo II		
Tabela 1	Média dos valores de temperatura e chuva acumulada no município de Uberaba no período de abril a dezembro de 2007.....	38
Tabela 2	Concentração média de proteínas no plasma seminal de touros Gir-Leiteiros durante o desenvolvimento sexual.....	43
Tabela 3	Média e desvio padrão dos valores ponderais, espermáticos e dos picos protéicos com afinidade à heparina (Martins, 2010).....	48
Tabela 4	Média e desvio padrão dos picos protéicos com afinidade à heparina (Martins, 2010)..	50
Tabela 5	Correlações de Pearson e Spearman entre as bandas protéicas do plasma seminal (134 a 25kDa) e os valores ponderais, espermáticos e os picos protéicos com afinidade à heparina.....	52
Tabela 6	Correlações de Pearson e Spearman entre as bandas protéicas do plasma seminal (22 a 6,9 kDa) e os valores ponderais, espermáticos e os picos protéicos com afinidade à heparina.....	57
LISTA DE TABELAS		
Capítulo III		
Tabela 1	Concentração de IGF-I no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais precoces e regulares.....	66
Tabela 2	Concentração de IGF-I no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual.....	67
Tabela 3	Correlação de Pearson entre a concentração de IGF-I no plasma seminal e a idade, peso corporal, perímetro escrotal, volume do ejaculado e concentração espermática....	70
Tabela 4	Média e desvio padrão dos valores andrológicos de touros Gir-Leiteiro na peripuberdade (Martins, 2010).....	70
Tabela 5	Correlações de Pearson e Spearman entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e os parâmetros espermáticos de touros Gir-Leiteiros.....	71
Tabela 6	Média e desvio padrão da concentração dos picos protéicos com afinidade à heparina apresentados por Martins (2010).....	72
Tabela 7	Correlação de Pearson e Spearman entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e os picos protéicos com afinidade à heparina (Martins, 2010).....	72
Tabela 8	Correlação de Pearson e Spearman entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e a densidade óptica das bandas protéicas em gel SDS-PAGE.....	74
Tabela 9	Concentração de insulina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais precoces e regulares.....	75
Tabela 10	Concentração de insulina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual.....	76
Tabela 11	Concentração de leptina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais precoces e regulares.....	79
Tabela 12	Concentração de leptina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual.....	79
Tabela 13	Correlação de Pearson e Spearman entre as concentrações de leptina no plasma seminal e os picos protéicos com afinidade à heparina.....	83
LISTA DE TABELAS		
Capítulo IV		
Tabela 1	Classificação andrológica por pontos (CAP) de touros Gir-Leiteiro durante a peripuberdade.....	95
Tabela 2	Correlação da CAP e dos parâmetros hormonais e protéicos do plasma seminal de touros Gir-leiteiros durante a peripuberdade.....	97
Tabela 3	Correlação da CAP e as proteínas com afinidade à heparina do plasma seminal de touros Gir-leiteiros durante a peripuberdade.....	98

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1	Coordenadas dos pixels nos géis digitalizados para análise. Fonte: Quantity One® (User Guide for Version 4.6.3).....	41
Figura 2	Distribuição da quantidade de proteínas totais em mg/mL (média±erro padrão) durante o desenvolvimento sexual em animais Prec (A) e Reg (B).....	43
Figura 3	Diagramas dos géis, SDS-PAGE, dos momentos +30 (A) e 0 (B) do desenvolvimento sexual de touros Gir-Leiteiro.....	44
Figura 4	Gel em SDS-PAGE (1D) de animais nos momentos +30 (A) e +60 (B) do desenvolvimento sexual. Linhas contendo amostras dos animais Prec (3, 4, 8, 9, 11 e 13), animais Reg (2, 5, 6, 7, 10, e 12) e padrão do peso molecular (1).....	46
Figura 5	Média (±erro padrão) da expressão das bandas protéicas de 112 (A), 62 (B), 55(C), 30 (D) e 20kDa (E) durante o desenvolvimento sexual. Letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem (p<0,05), pelo teste de Duncan, nos animais Prec e Reg , respectivamente.....	49
Figura 6	Média (±erro padrão) da expressão das bandas protéicas de 13,9, 12 e 11kDa durante o desenvolvimento sexual. Letras distintas na mesma linha diferem (p<0,05) pelo teste de Duncan nos animais Prec (A) e Reg (B), respectivamente.....	50
Figura 7	Densidade óptica (DO) das bandas 134, 112, 55, 47, 46, 38, 33, 30 e 25kDa (A) e das bandas 27, 22, 16, 13,9, 12, 11 e 6,9kDa (B), durante a peripuberdade.....	51
Figura 8	Densidade óptica das bandas de 55kDa e 47kDa e o crescimento testicular durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	53
Figura 9	Intensidade da banda de 112kDa e o perímetro escrotal durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	54
Figura 10	Densidade óptica da banda de 30kDa e a concentração de proteínas dos picos 5 e 6 de afinidade à heparina durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo III

Figura 1	Representação gráfica do cromatograma de gel filtração (FPLC) do plasma seminal....	63
Figura 2	Concentração de IGF-I no plasma seminal de animais Prec e Reg durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão). Médias com letras minúsculas e maiúsculas distintas diferem entre as idades dentro dos grupos pelo teste SNK (p<0,05).....	66
Figura 3	Concentração de IGF-I no plasma seminal de touros Gir-Leiteiro durante a peripuberdade (média±erro padrão). Letras distintas diferem pelo teste de SNK (p<0,05).....	67
Figura 4	Concentração de IGF-I durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão) e perímetro escrotal. Letras distintas diferem pelo teste de SNK (p<0,05).....	69
Figura 5	Concentração de IGF-I e a intensidade das bandas de 55, 47 e 33kDa durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	74
Figura 6	Concentração de insulina no plasma seminal de animais Prec e Reg durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	75
Figura 7	Concentração de IGF-I e Insulina no plasma seminal de animais Prec (A) e Reg (B) durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	77
Figura 8	Concentração de insulina no plasma seminal de animais com concentração de defeito maior acima (G1) e a baixo (G2) de 20% (média±erro padrão). Letras distintas nas colunas diferem pelo teste SNK (p<0,05).....	78
Figura 9	Concentração de leptina no plasma seminal de touros Gir-Leiteiro durante peripuberdade (média±erro padrão).....	81
Figura 10	Concentrações de leptina e insulina no plasma seminal de touros Gir-Leiteiros durante	

	o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).....	81
Figura 11	Concentração de leptina no plasma seminal segundo a concentração de defeitos maiores. G1: >20% e G2: <20%. (média±erro padrão).....	82

LISTA DE FIGURAS

Capítulo IV

Figura 1	Gromatograma (HPLC) apresentando o tempo de eluição do padrão interno (propilparabeno), 15,40min, e da testosterona, 20,20min.....	91
Figura 2	Estrutura da testosterona (A) e do propilparabeno (B). Fonte: Loi et al. (2006).....	91
Figura 3	Classificação andrológica por pontos (CAP) dos animais Prec e Reg durante o desenvolvimento sexual.....	94
Figura 4	Classificação andrológica por pontos (CAP) durante o desenvolvimento sexual. Letras distintas diferem pelo teste SNK ($p<0,05$).....	95
Figura 5	CAP e o pico 7 de afinidade à heparina (A) e os picos de afinidade à heparina 1, 2, 3 e 4 (B) durante o desenvolvimento sexual.....	99
Figura 6	Concentração sérica de testosterona de touros Gir-Leiteiros com média de idade de 18 e 21 meses durante a primeira e segunda coleta, respectivamente. (Média±erro padrão).....	100

CAPÍTULO I
Revisão de Literatura
Puberdade e a qualidade do plasma seminal sob
ação de hormônios e proteínas locais

Resumo

A expressividade e ação de alguns elementos do plasma seminal, como proteínas e hormônios, podem servir como marcadores para a fertilidade do sêmen. Estudos têm demonstrado uma associação entre proteínas no fluido seminal e a fertilidade, em razão delas exercerem importante papel na capacitação espermática e na reação acrossômica. Alguns fatores endócrinos e/ou locais podem estar associados à expressividade e/ou função destas proteínas, por auxiliarem nas condições espermáticas favoráveis à fecundação, destacando-se dentre elas a insulina, a leptina e o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I, os quais podem evidenciar diferenças entre animais associadas à estrutura e às condições metabólicas da célula espermática, podendo auxiliar na determinação da qualidade do plasma seminal. Assim, as proteínas seminais associadas à condição metabólica da célula espermática, influenciada por estes hormônios locais, podem servir de parâmetro de avaliação da condição reprodutiva do macho.

Palavras-chave: BSP, metabolismo espermático, puberdade.

Abstract

The expression and action of some elements of the seminal plasma, such as proteins and hormones, may serve as markers for the fertility of semen. Studies have demonstrated an association between proteins in seminal fluid and fertility, due the important role they plays in sperm capacitation and acrosome reaction. Some endocrine and/or local factors may be associated with expressiveness and/or function of these proteins, for assisting in the favorable conditions to sperm fertilization. The is insulin, leptin and insulin-like growth factor type I, play out standing because e they can reveal differences between animals associated with the structure and metabolic conditions of sperm cells. Assisting in this way in determining the quality of seminal plasma, demonstrating that the study of the seminal proteins associated with metabolic condition of the sperm cell affected by these sites hormones may serve as an important criterion for assessing the reproductive condition of the male.

Keywords: BSP, sperm metabolism, puberty.

1. Introdução

Para a identificação de tourinhos precoces, um acompanhamento andrológico criterioso deve ser realizado nos animais a partir de um ano de idade, em touros zebus, e a partir dos seis meses em animais europeus. Sendo considerados precoces aqueles animais que atingirem os estádios de seu

desenvolvimento sexual, a puberdade e a maturidade sexual, antes da idade média para sua raça (Ferraz e Eler, 2007). É possível que a expressão de alguns elementos no plasma seminal, como proteínas e hormônios, antes mesmo do início da produção espermática, possam servir como marcadores para a precocidade

sexual nos touros (Killian et al., 1993; Bellin et al., 1996).

O plasma seminal é um fluido com papel essencial para as funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação até a fecundação (Kraus et al., 2005). Durante o transporte através do epidídimo e na ejaculação, os espermatozoides adquirem várias proteínas oriundas do fluido epididimário e das secreções das glândulas acessórias, além de terem contato também com hormônios produzidos nos testículos (Yanagimachi, 1994).

As proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade no plasma seminal. Contudo, este meio também apresenta sais minerais e hormônios que atuam juntamente a estas proteínas, tendo importantes funções fisiológicas sobre as células espermáticas (Jelínková et al., 2003). Dentre as proteínas encontradas no plasma seminal, destacam-se aquelas com afinidade à heparina, que possuem ação na capacitação espermática e na reação acrossômica (Killian et al., 1993). Já entre os hormônios presentes neste meio, destacam-se a leptina, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), por apresentarem papel primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação (Ahima et al., 2000; Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

Bellin et al. (1998) e Gnessi et al. (1997) ressaltaram a importância desses elementos sobre a qualidade da célula espermática, podendo interferir tanto positiva quanto negativamente na fertilidade, sendo possível que a expressão de algum desses produtos, neste meio, possa servir como marcador para a fertilidade por evidenciar, primariamente, a qualidade seminal.

Desta forma, objetivou-se com esta revisão de literatura ressaltar os principais pontos envolvidos na puberdade e nos eventos funcionais da célula espermática,

associados à presença de proteínas e de alguns hormônios como leptina, insulina e IGF-I presentes no plasma seminal.

2. Revisão de Literatura

2.1 Puberdade em touros

A habilidade para o animal entrar na fase reprodutiva mais cedo reduz o intervalo de gerações e aumenta o ganho genético. Contudo, animais púberes têm reduzida produção espermática e baixa qualidade do sêmen, tendo baixo desempenho (Brito et al., 2007). A maturação sexual é um processo lento que é amplamente regulada pela secreção das gonadotropinas e esteróides, sendo expressa pelas características sexuais secundárias, as quais podem ser utilizadas para estimar certos padrões reprodutivos de cada animal (Brito et al., 2007).

Em touros, a puberdade é avaliada com base no crescimento testicular e início da produção espermática (Lunstra et al., 1978), sendo definida como a idade na qual o animal possui um ejaculado contendo pelo menos 50×10^6 de espermatozoides com no mínimo 10% de motilidade linear (Wolf et al., 1965).

A eficiência da espermatogênese e, consequentemente, da produção espermática e qualidade do sêmen, devem melhorar consideravelmente após a puberdade antes de o touro poder ser utilizado para fins reprodutivos, processo que requer, às vezes, poucos meses (Lunstra et al., 1978). Contudo, até aproximadamente três anos após o início da puberdade o animal ainda passa por melhoras quanto à qualidade seminal (Barth, 2000). Com isto, a proporção de touros *Bos taurus* com qualidade de sêmen satisfatória que sejam capazes de passar por avaliação andrológica aumenta até 12-16 meses de idade (Arteaga et al., 2001). Já touros *Bos indicus*, sob as condições tropicais, podem atingir a puberdade entre

16 e 17 meses de idade, tendo uma melhora na qualidade seminal até depois dos 24 meses de idade. Contudo, os níveis séricos de testosterona antes da puberdade aumentam em padrão similar aos *Bos taurus*, no entanto, ocorre mais tardiamente (Silva-Mena, 1995).

Além dos parâmetros utilizados por Wolf et al. (1965) para a determinação do momento da puberdade utiliza-se também a circunferência escrotal, pois é em torno da puberdade que os testículos crescem mais rapidamente e de forma quase linear (Pimentel et al., 1984). De acordo com Bergmann et al. (1998), os testículos crescem segundo curva sigmóide, com a fase inicial mais lenta, seguida de um pico que coincide com a puberdade, havendo, posteriormente, crescimento lento, indicativo da maturidade sexual.

Touros zebus têm desenvolvimento testicular mais lento e tendem a alcançar a puberdade mais tarde do que taurinos (Galina e Arthur, 1991). Considera-se que aos 18 meses de idade, a maioria dos tourinhos zebus já esteja em período pós-púbere e a seleção praticada para maiores perímetros escrotais nessa idade esteja associada ao maior peso corporal e, possivelmente, a menor precocidade reprodutiva em ambientes tropicais. Os resultados de Quirino e Bergmann (1998) também conduzem a raciocínio semelhante. Estes dados se refletem no peso dos touros zebus à puberdade, sendo mais pesados por serem mais velhos (Nogueira, 2004). Contudo, apesar das diferenças quanto a idade média da entrada na puberdade entre esses dois genótipos, não existe diferença na secreção de LH induzida pela administração de GnRH durante esta fase (Chase et al., 1997).

Em touros jovens, o perímetro escrotal é positivamente correlacionado com o peso testicular (Willett e Ohms 1957), produção espermática (Hahn et al. 1969) e fertilidade

(Foote, 2003). A idade a puberdade varia com a raça e/ou genótipo: em touros Hereford ocorre entre 39 e 52 semanas de idade; em touros Charolês entre 33 e 53 semanas de idade; touros Hostein entre 39 e 41 semanas de idade (Lunstra et al. 1978); e em touros Nelore entre 51 e 67 semanas de idade (Freneau et al., 2006).

Estudos relacionados à curva de crescimento testicular de animais das raças européias criados em regiões temperadas indicam que uma única medição a um ano de idade seja suficiente para se avaliar o desenvolvimento testicular. O perímetro escrotal nesta idade apresenta heredabilidade alta, com uma média de 0,50 e está favoravelmente associada com a idade à puberdade das meio-irmãs destes tourinhos, $R = -0,39$ (Morris et al., 1992).

As pesquisas realizadas no Brasil, considerando aspectos relacionados à puberdade de animais zebus, salientam a maior dependência de seu aparecimento com o estado corporal do animal do que com a idade. Diversos trabalhos sugerem idades variando entre 10 e 12 meses para o aparecimento da puberdade de machos zebus, coincidindo com o período de grande ganho em peso e associado ao rápido crescimento testicular, aumento da secreção de LH e início da espermatogênese (Castro et al., 1989). Ainda no Brasil, Cardoso (2002) determinou o início da puberdade de machos Nelore entre os 10 e 12 meses de idade. Já Castro et al. (1989) observaram espermatozóides no ejaculado de tourinhos Nelore, criados exclusivamente a pasto, aos 12-14 meses de idade, enquanto que Castro et al. (1990) observaram, na mesma raça, que a puberdade ocorreu aos 17 meses de idade. Já Unanian (1997) observou, segundo a descrição de Wolf et al. (1965), o aparecimento da puberdade em machos Nelore variando de 12,2 a 16,0 meses de idade.

No Brasil, a ênfase da seleção para perímetro escrotal dos zebus tem sido para a idade de 18 meses. Entretanto, Bergmann et al. (1998), ao descreverem a curva de crescimento do perímetro escrotal de animais Nelore, encontraram ponto de inflexão aos 10,8 meses de idade. Segundo os autores, tal fato evidenciaria o maior crescimento do parênquima testicular ocorrendo próximo aos 12 meses de idade, sugerindo o início do período pré-pubere. Segundo Fitzhugh (1976), neste ponto da curva de crescimento, a taxa de crescimento é máxima, passando de função crescente para função decrescente.

Foi sugerido que o momento da puberdade era dependente da maturação do hipotálamo devido a hipófise, as gônadas e os tecidos dependentes de esteróides serem responsivos a seus respectivos hormônios trópicos antes da puberdade. Em bezerros $\frac{1}{2}$ sangue, Hereford x Charolês, o momento da puberdade variou de acordo com as características do início do aumento da secreção de gonadotropinas; a puberdade ocorreu mais cedo em bezerros que apresentaram aumento na secreção de gonadotropinas em maior concentração e precocemente (Evans et al. 1995). A puberdade também foi acelerada pela rápida aceleração da progressão do aumento da administração de gonadotropinas exógenas (Chandolia et al., 1997). Contudo, é incerto se o aumento transiente pós-natal na concentração sérica de gonadotropinas é suficiente para acionar o rápido desenvolvimento testicular ou o quão é importante a baixa das concentrações de LH e FSH.

É claro que touros que atinjam a puberdade mais cedo terão melhores chances de serem selecionados como reprodutores do que touros tardios. Melhor conhecimento dos fatores que afetam o desenvolvimento sexual permitirá à indústria de gado aperfeiçoar o manejo de touros para reduzir a idade à puberdade, melhorar a capacidade

de selecionar touros no início da maturação e, talvez, desenvolver tratamentos para acelerar o início da puberdade (Brito et al., 2007). Dentro destas novas perspectivas podem ser citados alguns fatores como hormônios e proteínas contidos no plasma seminal que podem direta e indiretamente influenciar a qualidade espermática, podendo servir como marcadores da puberdade em touros.

2.2 Ação da leptina nos testículos diminuindo a concentração de testosterona e a qualidade da célula espermática

O produto do gene da obesidade, a leptina, é um hormônio plasmático secretado pelos adipócitos que exerce papel chave na regulação da ingestão de alimentos, gasto de energia e homeostase do peso corporal (Friedman e Halaas 1998). A leptina originalmente foi proposta como sinalizadora de alça longa do tecido adiposo com o núcleo hipotalâmico na regulação da ingestão de alimento em longo prazo. Subsequentes pesquisas têm amplamente validado esta hipótese, provendo fortes evidências que a leptina pode alterar a ingestão de energia por modular a produção hipotalâmica de peptídeos orexigênicos (NPY e AGRP) e anorexigênicos (POMC e CART). No entanto, os papéis propostos para a leptina agora têm se expandido para a regulação do metabolismo, crescimento e reprodução (Bradford et al., 2006).

Evidências indicam que o hipotálamo é o alvo primário para a maioria das ações deste hormônio sobre o eixo reprodutivo. Porém, baseado na caracterização da distribuição dos receptores e nos efeitos da leptina em sistema *in vivo*, locais adicionais para a ação do receptor deste hormônio têm sido sugeridos, incluindo a hipófise, os testículos e os ovários (Tena-Sempere et al., 1999).

Existe diferença, dependente do sexo, na concentração plasmática de leptina e na sua expressão de RNAm (Luukkaa et al., 1998). Essa diferença não se mostra simplesmente explicada pela quantidade distinta de gordura corporal entre os sexos. Enquanto ratas *ob/ob* (nulas para leptina) são invariavelmente inférteis, limitado número de ratos *ob/ob* apresentam desenvolvimento reprodutivo normal. Isto sugere que, embora a leptina participe no controle da função reprodutiva tanto em machos quanto em fêmeas, diferenças sexuais podem existir na extensão fisiológica deste controle. Consequentemente nota-se que os esteróides sexuais modulam a expressão e a secreção da leptina de maneira oposta: o estrógeno estimula a liberação de leptina pelos adipócitos *in vitro*, enquanto os andrógenos diminuem a expressão gênica e a secreção da mesma (Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

Correlação negativa entre os níveis de testosterona e leptina tem sido descrita em humanos, sendo atribuída ao efeito direto dos andrógenos na secreção de leptina pelos adipócitos (Tena-Sempere e Barreiro, 2002), como constatado por Luukkaa et al. (1998) que trabalharam com homens acima de 70 anos de idade. Este mesmo grupo ao trabalhar com homens de 31 anos de idade, demonstrou que a administração de testosterona, 200mg semanalmente, diminuiu a concentração de leptina sérica do pré-tratamento, $3,4 \pm 1,4 \mu\text{g/L}$, para $1,9 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$, durante o tratamento. Os valores de antes do tratamento foram restabelecidos após a retirada da suplementação com testosterona.

No entanto, a ação da leptina sobre a testosterona não ocorre somente de forma sistêmica, sendo constatada interação entre estes dois hormônios nos testículos, pois a avaliação do efeito testicular direto da leptina revela sua habilidade para inibir a secreção de testosterona, resposta análoga a observada em termos de esteroidogênese

ovariana após estimulação pela leptina *in vitro* (Tena-Sempere et al., 1999). Desta forma, especula-se que exista um complexo modo de ação da leptina em múltiplos locais do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que envolve tanto a resposta estimulatória quanto a inibitória (Tena-Sempere et al., 2001).

As ações biológicas da leptina são executadas por meio de seus receptores de superfície específicos. O receptor de leptina (Ob-R) pertence à superfamília das citocinas que contém um domínio simples. A expressão do gene Ob-R resulta em uma ordem de isoformas alternativamente divididas (Ob-Ra a Ob-Rf), compartilhando o domínio extracelular, mas diferindo nas regiões transmembrana/citoplasmática. Neste cenário, é provável que a regulação da ação da leptina sobre os tecidos alvos possam depender, pelo menos parcialmente, do balanço da expressão das diferentes isoformas do Ob-R (Tena-Sempere et al., 2001).

Caprio et al. (2003) investigaram o desenvolvimento da expressão do Ob-R nos testículos de ratos desde o início da gestação até a idade adulta e encontraram um padrão peculiar da expressão do Ob-R nas células de Leydig. Nos testículos, o Ob-R imunorreativo esteve presente na vida embrionária tardia, sendo ausente na vida pré-puberal e aparecendo novamente na idade adulta. O padrão de desenvolvimento do Ob-R nos testículos foi diferente do observado no hipotálamo, onde este receptor foi constantemente evidente durante todo o desenvolvimento.

Ruiz-Cortes e Olivera-Angel (2009), ao trabalharem com touros do período pré-puberal até o início da puberdade, demonstraram haver correlação negativa entre leptina e testosterona ($r=-0,33$; $p<0,05$). Isto sugeriu um possível efeito da leptina nos testículos no início da puberdade. A correlação entre as isoformas

Ob-R e a associação com os níveis de testosterona e leptina sugerem a possível interação entre leptina e testosterona via regulação da expressão dos receptores. Porém, novas pesquisas sobre os caminhos moleculares precisam ser realizadas para se compreender melhor os mecanismos envolvidos nestas vias.

Enquanto em adultos a leptina inibe a produção de testosterona induzida por gonadotropina coriônica humana (hCG) e amplifica a produção de AMPc intracelular estimulada por esta gonadotropina sob as células de Leydig em adultos, não modifica a esteroidogênese ou a produção deste segundo mensageiro nas células de Leydig pré-puberais (Caprio et al., 2003). Contudo, deve-se observar que a biossíntese dos hormônios esteroidais testiculares é um processo hormonalmente regulado por múltiplos passos que envolvem a conversão sequencial de colesterol em testosterona por ações coordenadas de um grupo de citocromo P450 hidroxilase e a enzima hidroxisteróide desidrogenase. O primeiro e limitante passo desta cascata é a translocação do colesterol para a membrana interna mitocondrial e sua subsequente conversão em pregnenolona, eventos que são mediados pela proteína esteroidogênica aguda regulatória (StAR) e a enzima de clivagem da cadeia ramificada do colesterol citocromo P450 (P450), respectivamente (Miller, 1988).

Desta forma, especula-se que os mecanismos pelos quais a leptina iniba a secreção de testosterona podem envolver, pelo menos, a modulação dos eventos iniciais no caminho da esteroidogênese. Isto é evidenciado pelo decréscimo induzido pela leptina, de maneira dose dependente, dos níveis de RNAm da StAR observado nas mesmas amostras (Tena-Sempere et al., 2001). Dado que a regulação da esteroidogênese pelos vários sinais hormonais é firmemente correlacionada as mudanças na expressão gênica de StAR.

Tena-Sempere et al. (2001) sugeriram que o decréscimo na expressão gênica desta enzima, induzido pela leptina, pode contribuir para a inibição da secreção de testosterona *in vitro*, abrindo a possibilidade que a expressão desta enzima possa estar sob a regulação da leptina em outros tecidos esteroidogênicos.

Neste contexto, o grupo de pesquisa de Tena-Sempere e Barreiro (2002) avaliou o efeito da leptina na secreção de testosterona testicular *in vitro*. A incubação de tecidos testiculares de ratos púberes (30 dias de idade) e adultos (70 dias de idade) com aumento na concentração de leptina recombinante foi realizada tanto nas condições basais quanto com estimulação de hCG. Neste cenário, a leptina foi capaz de inibir a secreção basal e estimulada de testosterona nas amostras testiculares de ratos adultos, mas não foi efetiva nas amostras de ratos púberes. Contudo, é importante considerar que os testículos de animais púberes produzem mais andrógenos 5-alfa reduzidos do que testosterona, o que pode ter contribuído para a falta do efeito da leptina observado neste estágio.

Além do envolvimento com as concentrações de testosterona, a leptina do plasma seminal foi também negativamente associada à percentagem de espermatozoides móveis e à sua velocidade linear, o que pode indicar um envolvimento no mecanismo do desenvolvimento da motilidade. Em contraste, a leptina sérica em homens não mostrou correlação com os parâmetros do espermograma. Entretanto, a concentração de leptina entre amostras de sêmen, normal e patológica, diferiu ($p < 0,05$), apesar de não haver diferença significativa no índice de massa corporal entre os grupos (Glander et al., 2002).

Estes achados são compatíveis com o papel periférico da leptina, como sugerido por Tena-Sempere et al. (1999) que demonstraram inibição da secreção de

testosterona em testículo de ratos adultos, *in vitro*. Resultados semelhantes foram apresentados por Sih et al. (1997), ao observarem a normalização dos níveis elevados de leptina plasmática em homens hipogonadais depois da suplementação com testosterona.

A detecção de leptina no plasma seminal de homens vasectomizados, bem como dentro dos túbulos seminíferos, sugerem uma existência multilocular deste hormônio no trato reprodutivo do macho. Os espermatozóides podem, assim, entrar em estreito contacto com a leptina, podendo ser afetados quanto ao desenvolvimento da motilidade, indicando mais um efeito negativo deste hormônio sobre a função gonadal. O seu efeito inibitório sobre a secreção de testosterona testicular pode exercer papel no decréscimo da motilidade espermática (Glander et al., 2002).

No entanto, apesar dos dados relatados acima, Caprio et al. (2003) não detectaram receptores para leptina nos túbulos, células de Sertoli ou células germinativas de ratos, podendo a presença de receptores para este hormônio nos testículos ser apresentada de forma espécie-específica, devendo-se sempre observar qual espécie está sendo trabalhada para se realizar ponderações quanto às respostas obtidas frente aos seus valores gonadais.

2.3 Insulina no plasma seminal e a qualidade espermática

A insulina é um hormônio anabólico que promove a captação de glicose e aminoácidos, a síntese de proteínas e lipídeos e o aumento das funções intracelulares e da membrana plasmática. É uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, que são conectadas por duas pontes dissulfeto. Embora haja alguma diferença na composição dos aminoácidos entre espécies, elas são pequenas. Como

resultado, a atividade da insulina não é espécie-específica (Abdelmonein et al., 1998).

Este hormônio é importante para a promoção e regulação do crescimento, além da diferenciação e metabolismo celular. Em mamíferos adultos, considera-se que a insulina seja produzida somente nas células β do pâncreas. Contudo, ela exerce papel central na regulação da função gonadal (Aquila et al., 2005). Segundo Nakayama et al. (1999), a insulina promove a diferenciação das espermatogônias em espermátócitos primários pela ligação com os receptores de IGF-I presentes nestas células, sendo que ambas, membrana plasmática e acrossomal, representam alvos citológicos para a mesma.

Contudo, além de agir na condição da membrana plasmática do espermatozóide, considera-se que a insulina também aja no seu metabolismo. A energia utilizada pelo espermatozóide para iniciar os processos catabólicos e manter a motilidade, o balanço iônico e várias funções celulares vem por intermédio da glicólise. A motilidade espermática é um evento dependente desse processo, pois aproximadamente 90% dos ATPs são produzidos por esta via em espermatozóides maduros. Além disso, as enzimas glicolíticas estão concentradas na peça principal e produz ATP adjacente ao sítio em que é requerido para manter a atividade flagelar (van Tilburg et al., 2008).

O espermatozóide conta primariamente com 90% de substratos extracelulares para satisfazer sua energia requerida. Eles metabolizam facilmente monossacarídeos, mas não outros açúcares ou carboidratos complexos. Esses açúcares não penetram tão prontamente as membranas celulares, necessitando da presença de insulina para a movimentação da glicose através da membrana plasmática, induzindo o aumento

do número de proteínas transportadoras específicas (Cunningham, 1997).

Andò e Aquila (2005) e Aquila et al. (2005) demonstraram que a insulina liberada pelo espermatozóide no ejaculado autorregula a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima limitante na via da pentose fosfato (PPP), que tem se mostrado ser crucial na aquisição da capacidade fecundante e na motilidade espermática, tão bem como na mediação da fusão dos gametas.

Estas ações da insulina são demonstradas, por meio de análise imunocitoquímica, um padrão de expressão heterogêneo deste hormônio, que implica em diferentes graus de condição energética entre os espermatozoides. Na maioria das células espermáticas, em amostras não capacitadas, a insulina foi localizada no nível subacrossomal, na peça intermediária e ao longo de toda a cauda. Contudo, uma diminuição global e distribuição uniforme da intensidade do sinal de insulina foram observadas em espermatozoides capacitados, que sugere um possível envolvimento da mesma na indução da capacitação (Aquila et al., 2005).

Frente a essas observações, van Tilburg et al. (2008) determinaram que a baixa concentração de insulina em meios diluidores para congelamento de sêmen é associada ao maior número de células espermáticas capacitadas, o que sugere que durante o processamento do sêmen, quando o mesmo é diluído, a concentração de insulina presente no plasma seminal também é diluída, podendo ativar mecanismos que acarretem na capacitação precoce. Desta forma, estes autores colocam a insulina como fator de preservação do estado não capacitado, insinuando que quando as células espermáticas entram em contato com os fluidos do trato reprodutivo da fêmea, maior quantidade de insulina é liberada em

resposta à maior concentração de glicose neste ambiente.

Outra hipótese, segundo revisão de van Tilburg et al. (2008), para justificar a ação da insulina em preservar a integridade acrossômica seria por meio do mecanismo que ocorre em alguns tipos celulares, como nas células hepáticas, em que a insulina inibe a ligação do AMPc à proteína quinase A (PKA) e, conseqüentemente, a sua ativação, o que demonstra que a insulina pode diminuir a afinidade desta proteína com o AMPc, baseado na especificidade da insulina em antagonizar essa ligação, e com isso reduzir a atividade capacitante da célula espermática.

Contudo, a capacidade autônoma do espermatozóide de liberar insulina sugere que ele, por meio de um circuito de alça curta autócrina, pode fornecer o recrutamento de substratos energéticos, de acordo com as suas necessidades metabólicas. Isso ocorre independentemente da regulação sistêmica e pode representar um mecanismo de proteção que preserva a capacidade de fecundação da célula espermática por eventuais efeitos nocivos produzidos pela longa restrição calórica ou por alterações que ocorrem na homeostase energética a nível sistêmico (Andò e Aquila, 2005).

A insulina também interfere na condição estrutural da célula espermática. Resultados do exame realizado por microscopia eletrônica de transmissão em pacientes diabéticos demonstraram que estes apresentaram vários defeitos estruturais. Em particular, defeitos relacionados à imaturidade e apoptose foram reconhecidos, destacando-se as alterações no acrossoma, no núcleo, na mitocôndria e na membrana plasmática. Estes resultados indicam um papel da insulina e do metabolismo de carboidratos na espermatogênese. Um sutil impedimento crônico da secreção de gonadotropina pode, pelo menos em parte,

ser responsável pela espermatogênese defeituosa. Contudo, a redução na resposta do LH e FSH à administração de GnRH é pequena para ser considerada como evento primário na causa dos distúrbios da estrutura espermática (Baccetti et al., 2002). Porém, a insulina por estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática, pode ser responsável pela melhora da sobrevivência espermática (Abdelmonein et al., 1998).

2.4 Ação do IGF-I na qualidade seminal

Levando em consideração o ambiente testicular, assume-se haver uma rede intratesticular de reguladores, requintadamente cronometrada e regionalizada, que pode participar primeiro no desenvolvimento da gônada e mais tarde na iniciação e manutenção da função testicular, podendo, em parte, responder pela qualidade seminal. Entretanto, ao invés da dependência total do clássico controle hormonal intracelular, estes fatores reguladores envolvem comunicações inter, intra e celular ambiental favorecendo melhor interação entre os mesmos (Gnessi et al., 1997).

Dentre estes fatores destacam-se os de crescimento semelhante à insulina, seus receptores e as suas proteínas ligadoras (IGFBPs) que exercem papel essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento celular (Gnessi et al., 1997). Os fatores de crescimento são polipeptídios que funcionam como reguladores parácrinos, autócrinos e endócrinos das células em crescimento e em diferenciação. Especificamente, o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF-I e -II) são hormônios ubíquos que exercem potente ação mitogênica, metabólica e de diferenciação sobre as células do corpo (Jones e Clemmons, 1995).

Os IGFs no fígado e em vários outros órgãos são frequentemente liberados em resposta a secreção pulsátil do hormônio do crescimento (GH). Contudo, a biossíntese dos IGFs não é exclusivamente regulada por este hormônio e ambos, IGF-I e -II, têm muitas ações que são independentes do GH (MacPherson et al., 2002).

A transmissão dos sinais dos IGFs ocorre quando um ligante se acopla a um dos três receptores específicos: receptor de IGF tipo I, receptor de IGF tipo II ou receptor de insulina. A disponibilidade de IGF é modulada por um grupo de seis proteínas de alta afinidade de ligação, designadas como proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 ao 6 (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6). A função destas proteínas é regulada pela interação entre a matriz extracelular e a superfície da célula, tão bem como pela sua protease específica (Jones e Clemmons, 1995).

Esta cadeia de multicomponentes moleculares tem sido identificada nos testículos de machos. Em várias espécies os IGFs, -I e -II, estão envolvidos na diferenciação e função das células de Leydig, estimulando a esteroidogênese por aumentar a densidade de receptores para gonadotropinas e a expressão de enzimas chave para esta via metabólica, sendo consequentemente implicados como importantes fatores na espermatogênese (Spiteri-Greech e Nieschlag, 1993).

As funções testiculares do IGF-I parecem ser servidas pela sua produção local, sem uma contribuição endócrina. Isto sugere fortemente que o IGF-I testicular tem um papel determinante no desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig e das células germinativas, e que a falta dessa substância no testículo pode induzir infertilidade (Gnessi et al., 1997).

Corroborando esta ideia, Wang e Hardy (2004) determinaram que o IGF-I aumenta

a proliferação de precursores mesenquimais e a diferenciação dessas células em células de Leydig. O número de células de Leydig e de enzimas esteroidogênicas específicas a estas células são diminuídas em camundongos que são nulos para IGF-I.

Contudo, efeitos aditivos do tratamento com LH e IGF-I sobre o número de células testiculares são observados, indicando que esses dois hormônios atuam sobre essas células usando caminhos de sinalização distintos (Wang e Hardy, 2004; Brito et al., 2007).

O IGF-I autorregula os receptores de LH e a secreção de testosterona, enquanto a testosterona, em retorno, autorregula os receptores de IGF-I e a produção para este hormônio pelas células de Leydig (Wang e Hardy, 2004). Desta forma, o IGF-I circulante pode inicialmente autorregular a produção de testosterona, a qual em retorno estimula a secreção de IGF-I e o estabelecimento da retroalimentação positiva entre IGF-I e a testosterona secretada nas células de Leydig. A forte associação do IGF-I circulante com o tamanho testicular sugere que este fator de crescimento pode ter efeito mitogênico direto sobre os testículos, podendo regular não somente a esteroidogênese testicular, mas também a proliferação celular em determinada fase da vida do animal (Brito et al., 2007).

Segundo Ritzen (1983), uma comunicação parácrina entre as células de Sertoli e as células germinativas nos estádios iniciais de diferenciação via IGF-I é muito provável de ocorrer. Os receptores de ligação para IGF-I são localizados sobre as células de Leydig, Sertoli, espermatócitos e espermátides. O IGF-I testicular é produzido principalmente pelas células de Sertoli por estimulação do FSH (Ritzen, 1983; Jones e Clemmons, 1995).

A produção de IGF-I pela cultura das células de Sertoli e Leydig sugere que o IGF-I pode atuar como fator de desenvolvimento e diferenciação para a espermatogônia, espermatócito e espermátide. A expressão dos ligantes de IGF-I e -II pelas células de Sertoli e Leydig e a identificação de seus receptores sobre estas células e sobre espermatogônias, espermatócitos e espermátides indica que estes fatores de crescimento são reguladores da função testicular (Henricks et al., 1998).

Henricks et al. (1998) avaliaram a presença de IGF no plasma seminal de bovinos e determinaram a expressão de receptores de IGF-I nos espermatozóides ejaculados e sua ação sobre a motilidade espermática. Estes autores demonstraram que o IGF-I pode interagir diretamente com o seu receptor presente no espermatozóide. Esta interação de ligantes e receptores pode aumentar a motilidade e a velocidade linear da célula espermática, sugerindo que o IGF-I, possivelmente, possua papel regulatório nos eventos da pré-fecundação, como demonstrado pelo trabalho de Colombo (1999) que constatou diferença significativa na concentração de IGF-I total no plasma seminal humano entre grupos de homens férteis e imunoinférteis.

O IGF-I no plasma seminal pode também ter função regulatória no pós-ejaculado, afetando a capacitação espermática por meio de uma série de mudanças fisiológicas, como: mudança de íons intracelular, na fluidez da membrana plasmática e no metabolismo da célula espermática (Sánchez-Luengo et al., 2005). No entanto, esse papel do IGF-I é regulado por suas proteínas ligadoras (IGFBPs) que limitam sua disponibilidade no plasma seminal.

Miao et al. (1998) demonstraram que a superexpressão de IGF-I nos testículos induz o aumento da IGFBP no plasma seminal causando a inibição da sua

atividade. Isto, em parte, confirma a existência de um sistema de IGF testicular bem regulado quanto à função da gônada (Gupta, 2005). Parte desse sistema testicular de IGF é composto por algumas proteínas que também podem limitar a ação deste hormônio por se ligarem ao mesmo de forma semelhante às IGFBPs. Quatro das principais proteínas do plasma seminal, BSP-A1, -A2, -A3 e -30kDa, se ligam ao IGF-II (Desnoyers e Manjunath, 1994) e ao IGF-I, demonstrando o papel modulador dessas proteínas (Henricks et al., 1998).

A presença do receptor de IGF-I sobre os espermatozóides e a presença deste hormônio no sêmen e a sua habilidade em estimular a motilidade espermática provê evidências de que o sistema IGF está envolvido também na fecundação (Henricks et al., 1998). Uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação espermática e excitose acrossômica (Gupta, 2005).

Estes resultados demonstram que este fator de crescimento está envolvido também com a membrana espermática que é essencial para a comunicação entre o espermatozóide, o meio externo e o oócito. Esta ideia foi demonstrada por Selvaraju et al. (2009) que, ao trabalhar com búfalos verificaram que o grupo de animais que possuía IGF-I adicionado ao meio de manutenção das células espermática tinha maior integridade do plasmalema e da membrana funcional, o que indica que a adição do IGF-I pode ser útil na melhoria da habilidade fecundante do espermatozóide, sugerindo um novo papel do IGF-I presente no plasma seminal.

2.5 Proteínas do plasma seminal e a qualidade espermática: destaque ao antígeno associado à fertilidade

Durante várias décadas, cientistas têm se esforçado para desenvolver ensaios de laboratório para prever com precisão o potencial de fertilidade de determinado indivíduo. Em alguns casos, o simples conhecimento se um macho é fértil já é adequado. Contudo, maior estimativa da fertilidade de uma amostra de sêmen é normalmente desejada (Braundmeier e Miller, 2001).

Este problema tem sido um desafio por diversas razões: 1- ensaios de laboratório geralmente examinam o conjunto dos espermatozóides na coleção. Contudo, durante a fecundação, apenas um fertiliza o óvulo, podendo ser um espermatozóide altamente selecionado que não representa a média das células avaliadas no ejaculado; 2- muitos ensaios testam somente um único atributo. Isto é pouco para medir com precisão a fertilidade, pois os espermatozóides devem satisfazer muitos requisitos para alcançar a fecundação, requerendo, desta forma, o exame de várias características (Braundmeier e Miller, 2001).

A combinação certa de ensaios de laboratório deverá permitir não só testar a capacidade dos espermatozóides para chegar ao local de fecundação, mas também a capacidade destes em fecundar o óvulo e ativar o seu desenvolvimento embrionário com sucesso. Com isto em mente, uma série de ensaios tem sido desenvolvida, que vão desde simples testes visuais, tais como motilidade e morfologia, a exames mais detalhados para avaliar as moléculas envolvidas durante a interação espermatozóide-oócito, destacando-se entre elas as proteínas contidas no plasma seminal (Braundmeier e Miller, 2001).

A abundância de uma variedade de proteínas tem sido proposta para indicar a fertilidade do macho. Contudo, como nos testes de atributos dos espermatozóides, é pouco provável que as análises moleculares,

individualmente, possam detectar uma redução de fertilidade em todas as amostras de sêmen, sendo que uma bateria de indicadores moleculares possa ser mais valiosa. Algumas destas moléculas podem estar relacionadas à fertilidade em razão de sua função vital, enquanto que outras podem indicar problemas gerais durante a espermatogênese e/ou na maturação espermática (Braundmeier e Miller, 2001).

Corroborando com a ideia da presença de moléculas que atuem na função vital da célula, McCauley et al. (1999) relataram que a adição de uma variedade de proteínas e constituintes lipídicos no plasma seminal exerceram importante papel na capacitação espermática, processo essencial à fecundação. Essas proteínas são produzidas principalmente nas vesículas seminais e na próstata, e influenciam positivamente na fertilidade (Bellin et al., 1998; McCauley et al., 1999).

As glândulas sexuais acessórias secretam proteínas com afinidade à heparina (HBP) como um componente importante do líquido seminal (McCauley et al., 1999). As HBP têm maior afinidade aos compostos de ligação similares à heparina, tais como os glicosaminoglicanos (GAGs), que são produzidos ao longo do trato reprodutivo da fêmea (Ax et al., 1999). Uma vez ligada à membrana espermática, a HBP provê aumento no número dos locais de ligação para heparina. Portanto, o GAG encontrado no trato reprodutivo da fêmea facilita a capacitação e a reação acrossômica da célula espermática (Miller et al., 1990).

Dentre as proteínas com afinidade à heparina encontradas no plasma seminal, destacam-se as BSP-A1, -A2, -A3 e de 30kDa. Todos os membros dessa família de proteínas são glicosilados, com exceção da BSP-A3. As BSP-A1 e -A2, denominadas de PDC-109, têm sequências de aminoácidos idênticas, mas diferem na extensão da glicosilação. Contudo, ambas

as proteínas, BSP-A3 e -30 kDa têm composição de aminoácidos que são diferentes da -A1/-A2. A determinação da sua sequência de aminoácidos mostra que as BSP-A1/-A2 e -A3 são estruturalmente dispostas paralelamente em duas unidades de repetição de 38-41 aminoácidos que são similares às estruturas do tipo-II presentes no domínio de ligação gelatina da fibronectina do fator XII do plasma humano ou do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo-II (Manjunath et al., 1994). Contudo, deve-se salientar que essas BSPs receberam nova denominação, segundo estudo de Manjunath et al. (2009).

Além dessas proteínas, existem outras que possuem sítios de ligação para a heparina. Supostamente, estas proteínas atuam na capacitação espermática, semelhante ao que acontece com as BSP-A1, -A2 e -A3, sendo a osteopontina uma delas (Denhardt et al., 2001). Segundo revisão de Moura (2005), esta proteína possui peso molecular que varia de 25 a 80 kDa, sendo que em bovinos há presença de isoformas de peso molecular que varia de 14 a 55 kDa, encontradas no plasma seminal e nas glândulas sexuais acessórias. Esta variação, quanto às isoformas é possivelmente resultado de modificações pós-transdacionais, tais como clivagem, glicosilação e fosforilação (Moura, 2005).

A função da osteopontina no trato reprodutivo ainda não está bem definida. Alguns autores sugerem que esta proteína aumenta a capacidade de ligação com o cálcio, o que é importante para a fecundação. A relação da osteopontina com a fertilidade pode ainda ser indireta (Cancel et al., 1999), atuando na proteção da superfície epitelial das glândulas acessórias contra infecções bacterianas (Brown et al., 1992), e ainda modificando características da membrana do espermatozóide (Cancel et al., 1999). Contudo, seu papel frente à ligação com a heparina ainda necessita ser confirmado.

Dentre as proteínas com afinidade à heparina, destaca-se a HBP de 30kDa, que foi descrita como antígeno associado à fertilidade (FAA) (Bellin et al., 1998; McCauley et al., 1999). Esta proteína foi localizada na região equatorial em espermatozóides humanos, indicando o seu potencial papel regulador nas interações espermatozóide-óvulo (Dawson et al., 2003).

Quando encontrada associada aos espermatozóides, a FAA pode aumentar a ligação de heparina, embora a função desta e de outras proteínas com afinidade a este GAG não seja clara (McCauley et al., 1999). Contudo, quando novilhas e vacas foram inseminadas com sêmen positivo para FAA a taxa de prenhez foi 15% maior do que em fêmeas inseminadas com amostras negativas para esta proteína (Sprott et al., 2000). Bellin et al. (1998) demonstraram que os animais que foram positivos para FAA foram 9% mais férteis do que os que eram negativos para esta proteína.

Semelhante a estes estudos, Sprott et al. (2006) analisaram o ejaculado de touros peripuberais (n = 468) em cinco diferentes populações para a presença de FAA. Os dados do exame andrológico destes animais foram comparados entre os touros com e sem FAA no ejaculado. A única variável que diferiu em todos os touros no momento da primeira coleta de sêmen foi o volume do ejaculado, com touros negativos para FAA tendo maior volume ($p < 0,001$) do que touros positivos para esta proteína. Entre os animais que não tinham alcançado a puberdade, 70% foram positivos para FAA, enquanto 10 não tiveram FAA na primeira coleta de sêmen, sugerindo que a produção de FAA no sêmen não é influenciada por nenhuma variável, tipicamente mensurada, durante o exame andrológico. A presença desta proteína pode ser determinada em um ejaculado com ou sem espermatozóides em touros peripuberais.

Quando touros foram selecionados para alta capacidade de serviço, o grupo de animais positivos para FAA foi ainda mais fértil do que o grupo negativo para esta proteína. Em adição, vacas expostas a touros positivos para FAA foram fecundadas mais cedo, no início da estação de monta, resultando no aumento do número de bezerros mais velhos e mais pesados à desmama. Assim, em adição ao exame andrológico e ao teste da capacidade de serviço, a determinação do perfil de FAA pode ser usada como uma ferramenta para identificar touros subférteis (Bellin et al., 1998).

Desta forma, demonstra-se que a interação entre as proteínas associadas à heparina e espermatozóide é um importante indicador do potencial de fertilidade do touro. Espermatozóides de touros de maior fertilidade se ligam com maior afinidade à heparina, submetendo-se a maiores taxas de reação acrossômica, comparado a touros de menor fertilidade (Ax et al., 1985). Em razão de outros estudos terem indicado que a habilidade do espermatozóide em se ligar à heparina e a outros GAGs é correlacionada à qualidade e fertilidade da célula espermática, afirma-se que proteínas com afinidade à heparina no plasma seminal podem, positivamente, influenciar a fertilidade (Killian et al., 1993).

Essas proteínas ligam-se à superfície dos espermatozóides na ejaculação por sua interação com os fosfolipídios de membrana do tipo colina. Uma vez que esses fosfolipídios são substratos da fosfolipase-A2, enzima chave implicada na reação acrossômica, o efeito das proteínas do plasma seminal sobre esta enzima foi investigado por Manjunath et al. (1994), que encontraram que as BSPs, no espermatozóide bovino, são co-localizadas com as fosfolipases-A2, sendo possível que estas proteínas interajam diretamente com as enzimas das fosfolipases-A2 ligadas à membrana espermática.

Estas enzimas podem ser estimuladas ou inibidas dependendo da concentração local das proteínas BSPs. Ao regular a atividade das enzimas, as proteínas BSPs podem modular a composição lipídica da membrana de espermatozóides submetidos à capacitação. Alternativamente, uma vez que as proteínas BSPs cobrem a superfície dos espermatozóides na ejaculação, via interação específica com os fosfolipídios colina, eles podem limitar a disponibilidade desses fosfolipídios para ação extracelular ou para a fosfolipase-A2 ligada à membrana espermática. Neste contexto, pode ser que o fluido seminal bovino contenha fosfolipase-A2; contudo, a atividade é quase indetectável. Isto é presumivelmente em razão as proteínas BSPs, que são inibidoras da atividade da fosfolipase-A2, estarem presentes em concentração muito alta no fluido seminal (Manjunath et al., 1994).

Contudo, apesar dos efeitos positivos das proteínas no plasma seminal, segundo revisão de Folhadella (2008), efeitos desfavoráveis de certas proteínas contidas neste fluido sobre os espermatozóides também já foram descritos por Shivaji e Bhargava (1987) que constataram que a presença em alta concentração das proteínas de peso molecular entre 15-16 kDa prejudicou a motilidade espermática. Além disso, proteínas como a seminalplasmina bovina inibem a capacitação espermática e a reação acrossômica, o que interfere negativamente na fecundação.

Entretanto, o perfil das proteínas no plasma seminal associado positivamente à fertilidade ganha maior foco nas pesquisas, sendo que dentro da gama de proteínas presentes no plasma seminal destaca-se ainda a proteína de 26 kDa que é 75% idêntica e 100% homóloga a uma prostaglandina D sintase tipo lipocalina (PDGS). O papel fisiológico das PGDS no trato reprodutor masculino não está bem claro; todavia, há relatos na literatura que

sugerem sua associação com a fertilidade (Gerena et al., 1998).

Outra importante proteína encontrada em grande quantidade no plasma seminal é a proteína ácida do fluido seminal (aSFP) com peso molecular de 12,9 kDa, secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo. Esta proteína tem demonstrado ser um bom marcador bioquímico para a alta fertilidade dos touros (Roncolleta, 2003), pois preserva a integridade da membrana e age como redutor da peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide, além de regular a atividade mitocondrial e, consequentemente, a motilidade espermática (Schöneck et al., 1996).

McCauley et al. (2001) relataram ainda a presença no plasma seminal bovino da proteína 24 kDa que apresenta 90% de homogeneidade com a proteína inibidora das metaloproteinases de matriz-2 (TIMP2). Esses mesmos autores identificaram a presença de RNA mensageiro para esta proteína nas glândulas bulbouretrais, próstata e vesícula seminal. Estas proteínas regulam processos fisiológicos associados à ovulação, fecundação, desenvolvimento embrionário, proliferação de vários tipos celulares e produção de progesterona pelas células esteroideogênicas (Boujrad et al., 1995), porém a sua função ainda não é bem definida (Folhadella, 2008). Isto demonstra a falta de conhecimento dos aspectos envolvidos entre as proteínas seminais e a qualidade reprodutiva do macho.

Considerações Finais

A busca por marcadores seminais que possam identificar precocemente animais de maior fertilidade resultará em grande ganho aos sistemas de criação, pois propiciará maior ganho genético em menor intervalo de tempo. Atualmente, há certas proteínas encontradas no plasma seminal que cumprem esse papel. Entretanto, as mesmas

não podem ser utilizadas, isoladamente, como único marcador para determinar o estado reprodutivo futuro de um animal. Indiscutivelmente, por mais que se busque determinada molécula sinalizadora dessa condição futura, deve-se lembrar que a mesma é dirigida por uma rede integrada de hormônios, enzimas, peptídeos e demais moléculas, podendo, às vezes, refletir a expressão de determinada condição, como excesso ou ausência de certos hormônios ou proteínas, sem, contudo, ficar limitado a isto. Desta maneira, a necessidade do estudo integrado entre os vários segmentos que compõem e/ou interferem no estado reprodutivo merecem maiores estudos.

Objetivo Geral

1. Determinar a classificação andrológica por pontos, o perfil protéico e os valores de leptina, insulina e IGF-I do plasma seminal durante a peripuberdade e os valores séricos de testosterona na puberdade de touros da raça Gir-Leiteiro.

Objetivos Específicos

1. Verificar se ocorrem diferenças entre a quantidade e intensidade das bandas protéicas determinadas por eletroforese unidimensional durante o período da peripuberdade entre animais precoces e regulares;

2. Verificar se ocorrem diferenças na quantidade das bandas expressas dentro de um determinado período da peripuberdade e entre animais precoces e regulares;

3. Quantificar os valores plasmáticos seminais de IGF-I, insulina e leptina para analisar a ocorrência ou não de diferenças durante o período da peripuberdade e entre animais precoces e regulares;

4. Correlacionar as densidades ópticas das bandas protéicas e os valores dos hormônios do plasma seminal com os parâmetros andrológicos e ponderais dos animais precoces e regulares;

5. Determinar a concentração sérica de testosterona dos animais precoces e regulares na puberdade e verificar a correlação da classificação andrológica por pontos (CAP) com os padrões espermáticos e ponderais, além das proteínas e das concentrações seminais de leptina, insulina e leptina durante a peripuberdade destes animais.

Referências Bibliográficas

ABDELMONEIN, I.Y.; BETH, R.; SABA, K.; et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (Pan troglodytes) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, n.2, p. 207-21, 1998.

AHIMA, R.S.; SAPER, C.B.; FLIER, J.S.; et al. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, n.3, p. 263-307, 2000.

ANDÒ, S.; AQUILA, S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.245, n.1-2, p.1-6, 2005.

AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E.; et al. Autocrine regulation of Insulin Secretion in Human Ejaculated Spermatozoa. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.552-557, 2005.

ARTEAGA, A.; BARACALDO, M.; BARTH, A.D. The proportion of beef bulls

in western Canada with mature spermograms at 11 to 15 months of age. **Canadian Veterinary Journal**, v.42, p.783-787, 2001.

AX, R.L.; BELLIN, M.E.; ZHANG, H.M.; et al. New Approach to Estimating Bull Fertility. In: **Proceedings, The Range Beef Cow Symposium**, 16., 1999, Greeley. *Anais...* Greeley: [s.n.] 1999. p.119.

AX, R.L.; DICKSON, K.; LENZ, R.W. Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.2, p.387-390, 1985.

BACCETTI, B.; la MARCA, A.; PIOMBONI, P.; et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v.17, n.10, p. 2673-2677, 2002.

BARTH, A. D. **Bull Breeding Soundness Evaluation**. Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Saskatoon, Sask., Canada, 2000.

BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E.; et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, n.8, p.2032-2039, 1998.

BERGMANN, J.A.G., QUIRINO, C.R., VALE FILHO, V.R., ANDRADE, V.J., PEREIRA, J.C.C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 6, 1998.

BOUJRAD, N.; OGWUEGBU, S.O.; GARNIER, M.L.C.H.; et al. Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. **Science**. v.268, n. 5217, p. 1609-1612, 1995.

BRADFORD, B.J.; OBA, M.; EHRHARDT, R.A.; et al. Propionate is not an important regulator of plasma leptin concentration in dairy cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.30, n.2, p. 65-75, 2006.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The Search is on: Finding Accurate Molecular Markers of Male Fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.9, p.1915-1925, 2001.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; RAWLINGS, N.C.; et al. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropinas and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, n.1, p.1-18, 2007.

BROWN, L.F.; BERSE, B.; VAN DER WATER, L.; et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Molecular Biology of the Cell**, v.3, n.10, p. 1169-1180, 1992.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v.60, n.2, p. 454-460, 1999.

CAPRIO, M.; FABBRINI, E.; RICCI, G.; et al. Ontogenesis of Leptin Receptor in Rat Leydig Cells. **Biology of Reproduction**, v.68, n.4, p.1199-1207, 2003.

CARDOSO, C.A.D; et al. Avaliação da biometria testicular e qualidade seminal em touros jovens Canchim, Limosin e Pardo Suíço. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.2, p. 61-63, 2002.

CASTRO, V.M., VALE FILHO, V.R., REIS, S.R., OLIVEIRA, H.N. Puberdade e

início de maturação sexual em touros Nelore, de 10-14 meses de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. v. 1, p 183, 1989.

CASTRO, V.M., VALE FILHO, V.R., REIS, S.R., OLIVEIRA, H.N. Circunferência escrotal e diâmetro dos túbulos seminíferos de touros Nelore, de 10 aos 24 meses de idade, criados a pasto, na região de Montes Claros- MG. **Congresso Mineiro de Medicina Veterinária**, 4, Belo Horizonte, p. 18-19, 1990.

CHANDOLIA, R.K.; HONARAMOOZ, A.; OMEKE, B.C. et al. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonographic in bull calve and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v.48, p.119-132, 1997.

CHASE Jr., C.C., CHENOWETH, P.J., LARSEN, R.E. Growth and reproductive development from weaning through 18-months of age among breeds in sub-tropical Florida. **Theriogenology**, v.47, p.723-745, 1997.

COLOMBO, J.B.; NAZ, R.K. Modulation of insulin-like growth factor-1 in the seminal plasma of infertile men. **Journal of Andrology**, v.20, n.1, p.118-125, 1999.

CUNNINGHAM, D.V.M. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

DAWSON, G.R.; MCCAULEY, T.C.; OYARZO, J.N.; et al. Immunolocalization of Fertility-Associated Antigen (FAA) on bovine, equine, and human sperm. **Fertility and Sterility**, v.80, Suppl. 3, p.240-241, 2003.

DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.41, p.723-749, 2001.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. **Journal of Biology and Chemistry**, v.269, n.8, p.5776-5780, 1994.

EVANS, A.C.O.; DAVIES, F.J.; NASSER, L.F.; BOWMAN, P.; RAWLINGS, N.C. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty, **Theriogenology**, v. 43, n., p.569-578, 1995.

FERRAZ, J.B.S; ELER, J.P. **Seleção de Bos indicus para precocidade sexual**. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.167-171, abr./jun. 2007. Disponível em www.cbpa.org.br. Acesso em: 10/07/2009.

FITZHUGH, H.A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. **Journal of Animal Science**, v.30, p. 706-711, 1976.

FOLHADELLA, I.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. 2008. 66 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

FOOTE, R. II. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 119-139, 2003.

FRENEAU, G. E.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES JR., A. P.; MARIA, W. S. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1107-1115, 2006.

- FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and regulation of body weight in mammals. **Nature**, v.395, n.6704, p.763–770, 1998.
- GALINA, C.S., ARTHUR, G.H. Review for cattle reproduction in the tropics. Part 6. The male. **Animal Breeding Abstract**, v.59, p.403–412, 1991.
- GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v.58, n.3, p.826–833, 1998.
- GLANDER, H.-J.; LAMMERT, A.; PAASCH, U.; et al. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. **Andrology**, v.34, n.4, p.227–233, 2002.
- GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. **Endocrine Reviews**, v.18, n.4, p.541–609, 1997.
- GUPTA, G.S. **Proteomics of Spermatogenesis**. In: Chapter 3, Non-Steroidal Signal Molecules In Spermatogenesis, p.47–76, 2005.
- HAHN, J.; FOOTE, R. H.; SEIDEL JR, G. E. Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. **Journal of Animal Science**, v.29, n.1, p.41–7, 1969.
- HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; et al. Identification of Insulin-Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility. **Biology of Reproduction**, v.59, n.2, p.330–337, 1998.
- JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.32, n.3–5, p.99–107, 2003.
- JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrinology Reviews**, v.16, n.1, p.3–34, 1995.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, n.6, p.1202–1207, 1993.
- KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B.; et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, n.1, p.33–46, 2005.
- LUNSTRA D.D.; FORD J.J.; ECHTEMKAMP S.E. Puberty in beef bulls: Hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, v. 46, p.1054–1062, 1978.
- LUUKKAA, V.; PESONEN, U.; HUHTANIEMI, I.; et al. Inverse Correlation between Serum Testosterone and Leptin in Men. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.83, n.9, p.3243–3246, 1998.
- MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; et al. Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 and -5 in Equine Seminal Plasma: Association with Sperm Characteristics and Fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, n.2, p.648–654, 2002.
- MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P.S.; et al. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v.80, n.3, p.394–7, 2009.

- MANJUNATH, P.; SOUBEYRAND, S.; CHANDONNET, L.; et al. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. **Biochemical Journal**, v.303, (Pt 1), p.121-128, 1994.
- McCAULEY, T.C.; ZHANG, H.; BELLIN, M.E.; et al. Purification and Characterization of Fertility-Associated Antigen (FAA) in Bovine Seminal Fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, n.2, p.145-153, 1999.
- McCAULEY, T.C.; ZHANG, H.M.; BELLIN, M.E.; et al. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases 2. **Molecular Reproduction & Development**, v. 58, n.3, p.336-341, 2001.
- MILLER, D.J.; WINER, A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v.42, n.5-6, p.899-915, 1990.
- MIAO, Z-R; LIN, T.K.; BONGS, T.A.; et al. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. **Clinical Endocrinology**, v.49, n.2, p.235-239, 1998.
- MILLER, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocrine Reviews**, v.9, n.3, 295-318, 1988.
- MORRIS, C. A., BAKER, R.L., CULLEN, N.G. Genetic correlation between pubertal traits in bulls and heifers. **Livestock Production Science**, v.31, p. 221-234, 1992.
- MOURA, A.A. Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. **Animal Reproduction**, v.2. n.1, p.3-10, 2005.
- NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; ABE, S. I. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. **International Journal of Developmental Biology**, v.43, n.4, p.343-347, 1999.
- NOGUEIRA, G.P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 361-372, 2004.
- PIMENTEL, C.A., FERREIRA, J.M.M., MORAES, J.C.F., et al. Desenvolvimento testicular e corporal em touros de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.8, n.1, p. 27-33, 1984.
- QUIRINO, C.R., BERGMANN, J.A.G. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in Nellore bulls using uni and bivariate animal models. **Theriogenology**, v.48, n.7, p.1398-1396, 1998.
- RITZEN, E.M. Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. **Journal Steroids Biochemistry**, v.19, (1B), p.499-504, 1983.
- RONCOLETTA, M. **Perfil bidimensional de proteínas de membrana de espermatozoides e plasma seminal relacionados com a fertilidade e com a congelabilidade do sêmen de touros**. 2003. 104f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.
- RUIZ-CORTES, Z. T.; OLIVERA-ANGEL, M. Association between leptin receptor expression in testis, leptin and testosterone levels, and onset of puberty in Holstein x Zebu calves. **Biology of Reproduction**, v.81, p.678, 2009. Abstract.

- SÁNCHEZ-LUENGO, S.; FERNÁNDEZ, P.J.; ROMEU, A. Insulin growth factors may be implicated in human sperm capacitation. **Fertility and Sterility**, v.83, n.4, 2005.
- SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPIANIER, R. Sperm viability is influenced *in vitro* by the bovine seminal protein aSPF: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v.45, n.3, p. 633-642, 1996.
- SELVARAJU, S.; REDDY, I.J.; NANDI, S.; et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.113, n.1-4, p.60-70, 2009.
- SHIVAJI, S.; BHARGAVA, P.M. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. **Bioessays**, v.7, n.1, p. 13-17, 1987.
- SIH, R.; MORLEY, J.E.; KAISER, F.E.; et al. Testosterone replacement in older hypogonadal men: a 12-month randomized controlled trial. **Journal of Clinical & Endocrinology Metabolism**, v.82, n.6, p.1661-1667, 1997.
- SILVA-MENA, C. Peripubertal traits of Brahman bulls in Yucatan. **Theriogenology** 48, 675-685, 1995.
- SPITERI-GREECH, J; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the Regulation of spermatogenesis - a review. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.98, n.1, p.1-14, 1993.
- SPROTT, L.R.; GALLINO, J.L.; NOVASOD, A.M.; et al. Case study: fertility-associated antigen in peripubertal beef bulls. **The Professional Animal Scientist**, v.22, n.4, p.353-357, 2006.
- SPROTT, L.R.; HARRIS, M.D.; FORREST, D.W. ET AL. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. **Journal of Animal Science**, v.78, n.4, p. 795-798, 2000.
- TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, n.1-2, p. 9-13, 2002.
- TENA-SEMPERE, M.; MANNA, P.R.; ZHANG, F.-P.; et al. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. **Journal of Endocrinology**, v.170, n.2, p.413-423, 2001.
- TENA-SEMPERE, M.; PINILLA, L.; GONZÁLEZ, L.C.; et al. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v.161, n.2, p.211-218, 1999.
- van TILBURG, M.F.; SILVA, J.F.S.; DIAS, A.J.B.; et al. Influência da Insulina na Congelabilidade do Sêmen de Ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p. 731-739, 2008.
- UNANIAN, M. M. A procura de marcadores de precocidade em gado Nelore. In O Nelore do Século XXI, 4, 1997, ABCZ, Uberaba, Minas Gerais. Anais. Uberaba, MG, 1997. P.51-57.
- WANG, G.; HARDY, M.P. Development of Leydig cells in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) knockout mouse: effects of IGF-I replacement and gonadotropic stimulation. **Biology of Reproduction**, v.70, n.3, p.632-639, 2004.
- WILLETT, E.L.; OHMS, J.I. Measurement of testicular size and its relation to

production of spermatozoa by bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 40, n. 12, p. 1559-1569, 1957.

WOLF, F.R., ALMQUIST, J.O., HALE, E.B. Prepubertal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.761-765, 1965.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **Knobil, E. and Neill, J. D. (Ed). Physiology of Reproduction**. 2nd ed. New York: Raven Press,1994. p. A189–A317.

CAPÍTULO II

Experimento 01

Perfil Eletroforético do Plasma Seminal de Tourinhos Gir-Leiteiro na Peripuberdade e Sua Correlação com os Parâmetros Espermáticos

Resumo

Objetivou-se com este estudo avaliar o perfil protéico seminal, em SDS-PAGE, de touros da raça Gir-Leiteiro na peripuberdade (60 dias antes a 60 dias após o início da puberdade), correlacionando-o aos parâmetros espermáticos e aos picos protéicos de afinidade à heparina. Utilizaram-se 16 tourinhos, separados em dois grupos, precoces e regulares, segundo a determinação da puberdade. Os géis 1D foram preparados em gradiente de 10 a 15% de acrilamida e as proteínas com afinidade à heparina foram separadas por gel filtração por meio de cromatografia líquida de rápido desempenho em coluna de afinidade. Os dados andrológicos foram determinados segundo os critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Os animais precoces apresentaram concentrações de proteína total no plasma seminal de $13,32 \pm 7,7$, $12,75 \pm 9,66$, $13,52 \pm 13,43$, $37,1 \pm 36,05$ e $32,81 \pm 14,76$ mg/mL, respectivamente, para os momentos -60, -30, 0, 30 e 60 da puberdade, enquanto os animais regulares apresentaram concentrações de $15,18 \pm 12,86$, $15,48 \pm 8,43$, $36,94 \pm 24,37$, $29,66 \pm 17,96$ e $34,04 \pm 13,75$ mg/mL, para os mesmos períodos, com diferença ($p < 0,05$) somente entre os intervalos de tempo dentro de grupos. Os dois grupos expressaram média de 22 bandas protéicas nos períodos estudados com pesos moleculares variando entre 238 e 6,9kDa. Dentre as proteínas expressas no plasma seminal apenas as de 112, 62, 55, 30, 22, 19, 16, 13,9, 12, 11 e 6,9kDa apresentaram diferença estatística dentro da peripuberdade ($p < 0,05$). Bandas de 134, 47, 46, 38, 33, 30, 27, 25 e 22kDa foram correlacionadas com os padrões espermáticos e picos protéicos com afinidade à heparina. Entre as proteínas do plasma seminal destacaram-se as de menor peso molecular (< 22 kDa) que apresentaram maiores concentrações, e representaram 69,8% do total, além de serem correlacionadas positivamente com a idade, peso corporal, perímetro escrotal, concentração e motilidade espermáticas, e correlação negativa com os defeitos espermáticos maiores e totais. O perfil protéico seminal de touros da raça Gir-Leiteiro varia com o a idade, sugerindo as proteínas de 55 e 47kDa como marcadoras negativas e as proteínas de menor peso molecular (22, 16, 13,9 e 11kDa), como marcadoras positivas da qualidade seminal.

Palavras-chave: Plasma seminal, puberdade, SDS-PAGE, zebu.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the seminal protein profile, in SDS-PAGE, of Gyr-Dairy bulls in peripuberty (from 60 days before to 60 days after the onset of puberty), correlating it with sperm parameters and binding to heparin protein peaks. A total of 16 young bulls, separated into two groups, precocious and regular, according to the determination of puberty. Were used in this study the 1D gels were prepared in gradient from 10 to 15% on acrylamide and proteins with affinity to heparin were separated by gel filtration using fast performance liquid chromatography on affinity column. Andrological data were determined using the criteria of the Brazilian College of Animal Reproduction. Concentrations of total protein in seminal plasma for precocious animals were of 13.32 ± 7.7 , 12.75 ± 9.66 , $13.52 \pm$

13.43, 36.05 and $32.81 \pm 37.1 \pm 14$, 76 mg/mL for times -60, -30, 0, 30 and 60 of puberty, respectively, while regular animals had concentrations of 15.18 ± 12.86 , 15.48 ± 8.43 , 36.94 ± 24.37 , 29.66 ± 17.96 and 34.04 ± 13.75 mg/mL, for the same periods. Statistical difference ($p < 0.05$) was observed only between time interval within groups. Both groups expressed an average of 22 protein bands in both periods with molecular weights ranging from 238 to 6.9 kDa. Among the proteins expressed in seminal plasma only proteins of 112, 62, 55, 30, 22, 19, 16, 13.9, 12, 11 and 6.9 kDa showed statistical significance within the peripuberty ($p < 0.05$). Bands of 134, 47, 46, 38, 33, 30, 27, 25 and 22kDa were correlated with patterns and sperm protein peaks with affinity to heparin. Lower molecular weight proteins (<22kDa) with highest concentration in the seminal plasma proteins, representing 69.8% of the total, and were positively correlated with age, body weight, scrotal circumference, sperm concentration and motility, and negative correlation with the major and total sperm defects. Protein profile of seminal Gyr-Dairy bulls differs with age and proteins of 55 and 47kDa are suggested as negative marker and the lower molecular weight protein (22, 16, 13.9 and 11kDa) as positive marker of seminal quality.

Keywords: Puberty, SDS-PAGE, seminal plasma, zebu.

1. Introdução

Durante várias décadas, cientistas vêm se esforçando para desenvolver ensaios laboratoriais para prever com precisão o potencial de fertilidade de determinado indivíduo. Em alguns casos, o simples conhecimento do fato de um macho ser fértil já é adequado, mas normalmente o desejável seria a estimativa da fertilidade de uma amostra de sêmen. Este tem sido um desafio uma vez que os ensaios de laboratório geralmente examinam o conjunto dos espermatozoides no ejaculado. Contudo, durante a fecundação, apenas um espermatozoide fecunda o óvulo, podendo ser uma célula altamente selecionada que não representa a média de espermatozoides avaliados (Braundmeier e Miller, 2001).

Desta forma, vários estudos buscam marcadores da célula espermática mais correlacionados com a fertilidade, tendo sido demonstrado que as proteínas contidas no plasma seminal podem responder a este requisito (Killian et al., 1993; Bellin et al.,

1996; Cancel et al., 1997; Bellin et al., 1998; Gerena et al., 1998).

Corroborando esta afirmativa, Killian et al. (1993) observaram diferenças na quantidade de proteínas associadas a fertilidade. Estes autores, em um estudo realizado com 35 touros Holandeses com histórico reprodutivo conhecido, observaram que quatro proteínas estavam relacionadas à fertilidade daqueles animais. Duas delas (26 kDa, pI 6,2; e 55 kDa, pI 4,5) ocorriam com grande frequência e densidade em touros provados com alta fertilidade, enquanto as outras duas (16 kDa, pI 4,1; e 16 kDa, pI 6,7) foram mais frequentes em touros com baixa fertilidade, demonstrando a existência da ligação tanto positiva quanto negativa entre alguns desses marcadores e a fertilidade do macho.

Contudo, apesar da abrangência dos relatos na literatura quanto ao efeito de certas proteínas no plasma seminal em animais adultos, ainda é restrita essa descrição em animais jovens, principalmente, na peribuperdade. Desta maneira, objetivou-se com este estudo determinar o perfil eletroforético unidimensional das proteínas do plasma seminal de tourinhos Gir-

Leiteiros e associá-lo aos parâmetros andrológicos e aos picos protéicos com afinidade à heparina durante o período da peripuberdade.

2. Material e Métodos

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

2.1 Localização e dados climáticos

O presente estudo foi realizado na fazenda experimental Getúlio Vargas da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) no município de Uberaba (19°45'56" de latitude sul, 47°57'7" de longitude oeste a 774m de altitude, tendo clima tropical semi-úmido com temperatura média de 21,4 °C, precipitação anual média de 1684,6mm e umidade média relativa do

ar de 71,4% - Estação Climatológica Principal de Uberaba – EPAMIG/INMET) (Tab. 1), durante o período de abril a dezembro de 2007.

2.2 Animais experimentais e manejo alimentar

Trinta tourinhos, oriundos de cinco diferentes propriedades criadoras da raça Gir-Leiteiro no estado de Minas Gerais, foram acompanhados clínica e andrológicamente por um período de nove meses (abril a dezembro de 2007). Todos os animais eram oriundos de rebanhos de alta produção leiteira, provenientes de matrizes com média de 6000 kg de leite/ano, que passavam por alta pressão de seleção para eficiência reprodutiva e de linhagens selecionadas para precocidade sexual. Antes do início da coleta dos dados os animais foram recebidos na fazenda Getúlio Vargas (EPAMIG) e passaram por um período de adaptação de um mês.

Tabela 1: Média dos valores de temperatura e chuva acumulada no município de Uberaba no período de abril a dezembro de 2007

Mês do Ano	Temperaturas do Ar - °C (Bulbo seco)			Umidade Relativa do Ar (12)	Chuva Acumulada Média no mês (mm)
	Máxima	Média	Mínima		
Abril	32	25	18	65%	100
Maio	30	20	15	60%	<20
Junho	30	20	14	60%	0
Julho	30	20	14	60%	<10
Agosto	31	22	15	45%	0
Setembro	33	25	17	40%	<15
Outubro	36	26	21	50%	180
Novembro	33	24	20	70%	250
Dezembro	32	24	20	75%	310

Fonte: Instituto nacional de meteorologia – INMET; Os valores aqui apresentados são médias referentes a cada mês observado.

Os animais foram inicialmente ordenados segundo Vale Filho (1988; 1997) quanto à classificação andrológica por pontos (CAP). Neste critério, foram computados os valores da circunferência escrotal, da morfologia e da motilidade espermática segundo a idade de cada animal. No início do experimento

quando os animais apresentavam média de idade de 15 meses, um apresentou CAP >60 (3,33%), seis apresentaram CAP entre 30 e 55 (20%) e 23 apresentaram CAP <30 (76,67%). No mês seguinte ao início do experimento, 12 dos 30 animais (40%) apresentaram-se púberes e ao final do

experimento, 2 (6,7%) não atingiram a maturidade sexual (Anexo 5).

Como constatado pela avaliação da CAP e pela classificação da puberdade segundo Wolf et al. (1965), no início da fase experimental foi observada a presença de animais que já haviam atingido a puberdade em data anterior ao início da coleta dos dados. Ao final do experimento observaram-se animais que não atingiram a maturidade sexual. Assim, com o objetivo de padronizar o momento da ocorrência da puberdade, esses animais foram descartados e não computados para efeito de análises, objetivando trabalhar apenas com animais dentro do intervalo de 60 dias antes e 60 dias após a puberdade (peripuberdade).

Em dezembro de 2007, ao final do experimento, após análise dos exames andrológicos, constatou-se a formação de dois grupos distintos entre os trinta animais alocados inicialmente no experimento. Estes grupos se caracterizavam por animais que atingiram a puberdade, segundo Wolf et al. (1965), antes da idade média da raça (18 meses) e os que atingiram esse padrão após essa idade. Com isto, dos trinta animais inicialmente alocados na experimentação, trabalhou-se apenas com 16, sendo oito animais alocados no grupo precoce (**Prec**) e oito no grupo regular (**Reg**).

Os dados utilizados no presente estudo foram ajustados de acordo com a idade à puberdade, segundo a metodologia descrita por Brito et al. (2004), determinando cinco períodos segundo o início da puberdade (-60, -30, 0, +30 e +60 dias). Sob esta estrutura de ajuste dos dados, todas as variáveis foram comparadas entre os grupos nos respectivos momentos em relação à puberdade.

Durante o período experimental os animais foram mantidos em confinamento individual recebendo concentrado contendo

20% de proteína bruta (PB), 70% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e 1,105Mcal/kg de energia líquida, à base de 1% do peso vivo, além de silagem de milho como volumoso, sal mineral e água *ad libitum*.

Os dados apresentados sobre o desenvolvimento ponderal e as características andrológicas dos animais estudados foram descritos por Martins (2010). O presente estudo foi realizado em conjunto ao projeto deste último autor, sendo, então, abordados aqui apenas os dados originais concernentes a esta parte experimental, correlacionando-os com os dados de Martins (2010) quando oportuno.

Contudo, deve-se salientar que Martins (2010) trabalhou com a purificação de proteínas com afinidade à heparina e constatou a presença de oito picos cromatográficos sob diferentes tempos de eluição frente às diferentes concentrações de NaCl utilizadas na fase móvel: P1 – 0M; P2 e P3 – 0,09M; P4 – 0,18M; P5 – 0,3M; P6 – 0,45M; P7 – 0,6M e P8 – 1,5M. A concentração deste sal na fase móvel determinou o grau de afinidade da proteína à heparina. Assim, os últimos picos protéicos foram os de maior afinidade a este glicosaminoglicano.

2.3 Procedimento experimental

2.3.1 Coleta do plasma seminal

Durante o período experimental os animais passaram por avaliações andrológicas mensais para coleta do plasma seminal. Os dados referentes ao exame andrológico de cada animal eram anotados e o plasma seminal separado. Uma alíquota de 1mL do sêmen obtido por eletro-ejaculação foi diluída na proporção de 1:1 em uma solução tampão (Tris base 40mM, CaCl₂ 2mM, Azida Sódica 0,01%, Pepstatina-A 1μM, PMSF 1mM) e imediatamente congelada a -196°C em nitrogênio líquido para transporte até o Laboratório de

Enzimologia de Bioquímica de Proteínas, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

Em laboratório, as amostras foram submetidas à centrifugação em 1200g durante 15 minutos a 4°C para separar o plasma seminal das células espermáticas.

2.3.1.1 Determinação da concentração de proteínas totais do plasma seminal (PT)

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

Dois microlitros da amostra de plasma seminal foram diluídos até 1000 vezes (1:1000) em tampão Tris Base 40mM para enquadramento da leitura de absorbância das amostras na curva padrão. Dessas amostras diluídas, 160µL foram depositados em duplicata em poços de uma microplaca de ELISA e aos mesmos foram adicionados e homogeneizados 40µL de reagente de Bradford (10% de Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% de Etanol a 95% e 10% de ácido fosfórico a 85%) concentrado cinco vezes. Após um período de 10min de incubação, a placa foi submetida à espectrofotometria em leitor de ELISA (SpectraMax 340, Molecular Devices Inc, Toronto, Canadá) em um comprimento de onda de 595nm.

As médias dos valores de absorbância das duplicatas foram substituídas no valor “Y” da curva padrão, obtendo-se a quantidade de PT da amostra diluída (µg/160µL). Em seguida esse valor foi convertido para mg/mL e logo após, multiplicado pelo seu fator de diluição (até 1:1000) para

determinar a concentração de proteínas totais na amostra coletada.

2.3.1.2 Análise eletroforética, em SDS-PAGE, do plasma seminal

Para a eletroforese unidimensional, foram aplicados 20 µg de proteínas do plasma seminal de cada amostra tratada com tampão de amostra (0,125M TRIS-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2M DDT, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8) em um volume total de 50 µL. A mistura foi aquecida a 100°C por 90 segundos e aplicadas em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). O gel de separação continha acrilamida em gradiente de 10 a 15%, em tampão Tris-HCl 1,5mM pH 8,8 e SDS 10%. O gel de empilhamento continha poliacrilamida 4%, Tris-HCl 0,5M pH 6,8 e SDS 0,24%.

Após o preparo das amostras, aplicaram-se com uma seringa HAMILTON (1700 Series GASTIGHT®; Bonaduz, Switzerland), 50 µL da amostra abaixo do tampão em cada poço do gel de eletroforese. Este procedimento garantiu que cada poço se comportasse da mesma forma durante a separação. Utilizou-se o primeiro poço de cada gel para aplicação dos padrões que variaram entre 200kDa (Miosina de músculo de coelho) a 6,5kDa (Aprotinina de pulmão bovino), todos do fabricante Sigma® (69883/Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Como foi utilizado o corante Azul de Coomassie para revelar o gel, optou-se por utilizar 1 µg de cada componente padrão.

Após montado o aparato aplicou-se a corrente elétrica de 25mA por gel para a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. Todo o sistema foi operado com a refrigeração do sistema de eletroforese a uma temperatura de 5°C com a utilização de um banho termostático com circulação externa. As corridas foram realizadas em cuba de eletroforese SE 600

Ruby (Hoeffer Inc.; Holliston, USA) em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 0,1% SDS, pH 8,3). A corrida eletroforética foi conduzida até o momento em que o marcador azul de bromofenol, presente no tampão da amostra, atingiu a parte inferior do gel.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados pelo corante Azul de Coomassie R-250, por 16 horas. As bandas foram reveladas após terem sido descoradas com solução descorante I (40% v/v Metanol, 7% v/v ácido acético) seguida da solução descorante II (5% v/v metanol, 7% v/v ácido acético).

Os géis resultantes foram digitalizados (600dpi) em formato Tiff e analisados pelo programa Quantity One[®], versão 4.6.3 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Kingston Station, USA). Foram estimados os pesos moleculares das proteínas presentes nas amostras, segundo o padrão utilizado, e quantificada a intensidade das bandas. Para a determinação da intensidade das bandas pelo Quantity One[®], utilizou-se a unidade de pixel da imagem digitalizada, trabalhando com esta unidade por meio de coordenadas (X, Y e Z). Os valores das coordenadas X e Y representaram às posições, horizontal e vertical, do pixel na imagem, e o valor de Z a intensidade do sinal (Fig. 1).

Desta forma, para que um objeto de dados pudesse ser visível e quantificado, a intensidade dos seus pixels agrupados deveria ser maior do que a intensidade dos pixels que compõem o fundo da imagem. A intensidade total de um objeto de dados foi determinada pela soma das intensidades de todos os pixels que compõem este objeto. Já a intensidade média de um objeto de dados foi calculada pela intensidade total dividida pelo número de pixels no objeto. Assim, sabendo a concentração total de proteína colocada em cada poço do gel de eletroforese compararam-se as intensidades das bandas reveladas entre os géis. A unidade obtida pelo programa para comparação das intensidades das distintas bandas foi a densidade óptica (DO).

2.4 Análise Estatística

Após o ajuste dos dados de acordo com a idade em relação à puberdade (dias), no momento 0 (zero) foi realizada uma distribuição de frequência das idades dos 16 animais estudados por meio do procedimento FREQ do SAS (SAS, 2002). Adotou-se como ponto de separação dos grupos a mediana (18 meses) das idades naquele período. Assim, animais com idades à puberdade menores do que os da mediana foram considerados precoces e aqueles com idades superiores à mediana, foram considerados regulares.

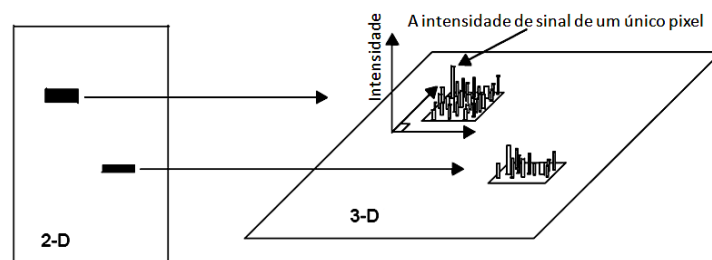


Figura 1: Coordenadas dos pixels nos géis digitalizados para análise. Fonte: Quantity One[®] (User Guide for Version 4.6.3).

Os valores de proteínas totais e da intensidade de cada banda nos géis foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e de assimetria e curtose, pelo procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do pacote estatístico SAS (2002).

As bandas protéicas de 134, 112, 62, 58,9, 47, 46, 41, 38, 25, 22, 19, 16 e 14kDa foram transformadas logaritmicamente [$\log(x+1)$] para se ajustarem a normalidade. As proteínas de 191, 124, 85, 65, 64, 61, 53, 43, 31, 29, 27, 18 e 13kDa, por não se enquadrarem na curva normal, mesmo após a transformação logarítmica, foram considerados variáveis não-paramétricas (Sampaio, 2002).

O delineamento experimental adotado para análise das variáveis foi em blocos ao acaso em esquema de subparcelas com oito repetições. Os grupos (Prec e Reg) constituíram as parcelas e as idades em que os animais foram avaliados (-60, -30, 0, 30 e 60), as subparcelas. As análises foram realizadas utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS segundo Littell, et al. (1998). O efeito de grupo foi obtido pelo teste F e os efeitos de idade foram estimados por meio de ajustamento de modelos de regressão linear e quadrática. As comparações entre as idades dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Duncan por meio do procedimento GLM do SAS (2002).

As bandas protéicas de 191, 124, 85, 65, 64, 61, 53, 43, 31, 29, 27, 18 e 13kDa, por serem consideradas não paramétricos, foram submetidas à ordenação das observações por meio do procedimento RANK do SAS (Ipe, 1987), para, só então, serem comparadas pelos contrastes ortogonais entre os grupos, nas idades em relação à puberdade e entre as idades dentro de cada grupo, utilizando-se o teste não-paramétrico de Friedman (Sampaio, 2002).

Os modelos de regressão das variáveis avaliadas em relação à idade à puberdade foram ajustados por meio do PROC REG do SAS (2002). Para os casos em que a interação entre grupo e idade foi significativa, ajustou-se um modelo de regressão para cada grupo. As correlações entre as variáveis paramétricas foram estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson por meio do PROC CORR e as associações entre as variáveis paramétricas e não-paramétricas pelo coeficiente de correlação de Spearman por meio do PROC CORR com a opção SPEARMAN do SAS (2002).

3. Resultados e Discussão

3.1 Concentrações de proteínas totais analisadas pelo método de Bradford

A quantidade de proteínas totais não diferiu entre os grupos analisados ($p>0,05$). Os animais **Prec** apresentaram concentrações de $13,32\pm7,7$, $12,75\pm9,66$, $13,52\pm13,43$, $37,1\pm36,05$ e $32,81\pm14,76$ mg/mL para os momentos -60, -30, 0, 30 e 60 da puberdade, respectivamente, enquanto os animais **Reg** tiveram concentrações de $15,18\pm12,86$, $15,48\pm8,43$, $36,94\pm24,37$, $29,66\pm17,96$ e $34,04\pm13,75$ mg/mL, para estes mesmos momentos da puberdade (Tab. 2). Contudo, a única diferença ($p<0,05$) observada foi entre os períodos analisados (-60 a +60) (Fig. 2).

Tabela 2: Concentração média de proteínas no plasma seminal de touros Gir-Leitheiros durante o desenvolvimento sexual

Estádio de desenvolvimento sexual	REGULARES (mg/mL)	PRECOCES (mg/mL)
-60	15,2 ^b ±12,9	13,3 ^b ±7,7
-30	15,5 ^{ab} ±8,4	12,7 ^b ±9,7
0	36,9 ^a ±24,4	13,5 ^b ±13,5
30	29,7 ^{ab} ±17,9	37,1 ^a ±36,1
60	34,0 ^a ±13,7	32,8 ^a ±14,8

Letras distintas na mesma coluna diferem ($P<0,05$) pelo teste de Duncan.

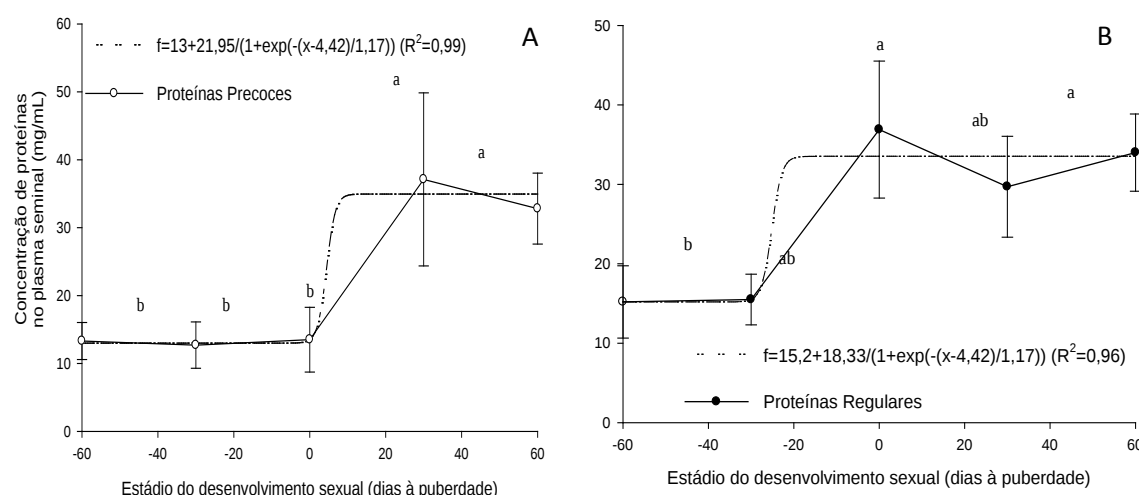


Figura 2: Distribuição da quantidade de proteínas totais em mg/mL (média±erro padrão) durante o desenvolvimento sexual em animais **Prec** (A) e **Reg** (B).

Apesar de não ocorrer diferença entre os grupos, registrou-se interação de grupo x idade. Desta forma, uma regressão sigmoidal, segundo modelo de Boltzmann, foi ajustada para cada grupo, separadamente. Este modelo foi adotado por melhor representar respostas biológicas as quais apresentam um aumento com posterior estabilização, com o avançar da idade. Os animais **Prec** foram representados pelo modelo $f=13+21,95/(1+\exp(-(x-4,42)/1,17))$ ($R^2=0,99$) e os **Reg** pelo modelo $f=15,2+18,33/(1+\exp(-(x-4,42)/1,17))$ ($R^2=0,96$).

O comportamento da secreção das proteínas contidas no plasma seminal foi similar entre os dois grupos, modificando apenas o momento em que ocorre a maior secreção, como observado pela interação idade x

grupo, sendo que os animais **Prec** demonstraram o pico de secreção 30 dias após os animais **Reg** (Fig. 2). Isso ocorreu, provavelmente, em razão dos animais terem sido ajustados segundo a idade à puberdade. Assim, como os animais **Reg** entraram na puberdade mais tardiamente do que os animais **Prec**, apresentaram maior peso e maior PE, o que pode ter influenciado esta resposta.

O aumento na secreção de proteínas ocorreu junto ao momento 0 da puberdade, podendo esta condição fisiológica ter influenciado tal variável. Segundo Sharpe (1984), a secreção do plasma seminal, pelas glândulas acessórias, está sob influência da testosterona, hormônio anabólico que estimula a síntese de proteínas em suas células-alvo, desta forma, influenciando o

perfil protéico que o constitui (Parrish e First, 1993). Isto pode explicar o comportamento secretório das proteínas no plasma seminal apresentado no presente estudo. Após a puberdade, supostamente com a estabilização da secreção de andrógenos pelas gônadas, em decorrência da maturidade sexual, ocorreu também estabilização da secreção destas proteínas.

Contudo, por não terem sido avaliadas as concentrações séricas de testosterona durante a peripuberdade, fica aqui, apenas a especulação de tal acontecimento, servindo como indicação para futuros estudos.

3.2 Perfil e densidade óptica das bandas protéicas presentes no plasma seminal durante a peripuberdade

De uma forma geral, sem levar em consideração o momento do desenvolvimento sexual, os dois grupos de animais (**Prec** e **Reg**) expressaram 37 bandas protéicas com pesos moleculares iguais a: 238, 191, 134, 124, 112, 85, 73,

65, 64, 62, 61, 58,9, 55, 47, 46, 43, 41, 38, 36, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 27, 25, 22, 19, 18, 16, 14, 13,9, 13, 12, 11 e 6,9 kDa.

Contudo, nenhum dos grupos apresentou todas as bandas em um mesmo período. No momento -60, os dois grupos apresentaram 23 bandas, no momento -30 os **Prec** apresentaram 23 bandas enquanto os **Reg** apresentaram 18 bandas. Nos momentos 0, +30 e +60, os animais **Prec** e **Reg** apresentaram 21 e 20, 27 e 26 e 24 e 21 bandas, respectivamente, semelhante ao que foi relatado por Welter (2006) que ao trabalhar com touros da raça Nelore, encontrou 21 bandas protéicas no ejaculado destes animais, por meio de géis SDS-PAGE a 14% de acrilamida. No presente estudo, em ambos os grupos analisados, a maior expressão de bandas protéicas ocorreu no momento +30 (Fig. 3A), superando o valor encontrado por Welter (2006). Todavia, nos demais momentos os valores registrados se assemelharam aos relatados por este autor (Anexo 2).

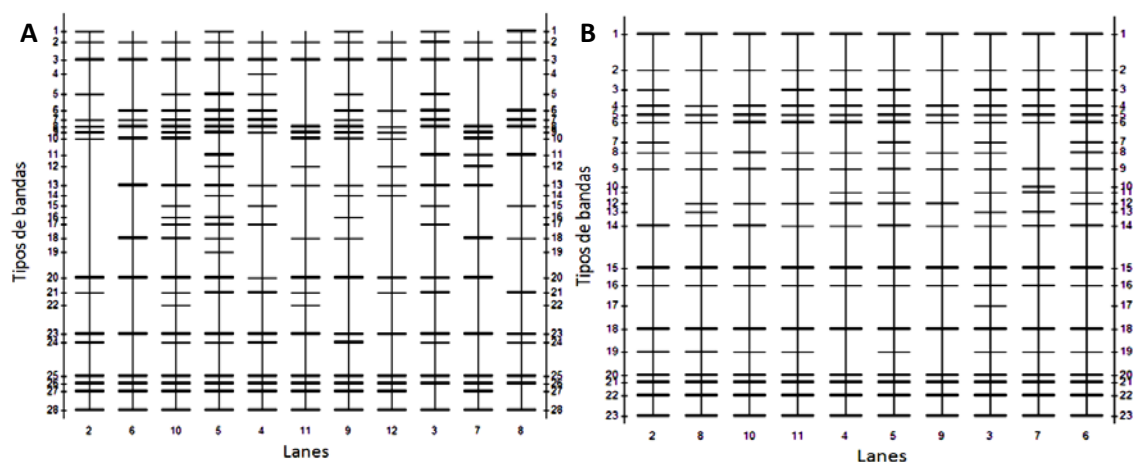


Figura 3: Diagramas dos géis SDS-PAGE dos momentos +30 (A) e 0 (B) do desenvolvimento sexual de touros Gir-Leiteiro.

As bandas de peso molecular de 112, 62, 55, 38, 30, 22, 19, 16, 13,9, 12 e 11kDa estiveram presentes em todos os momentos da puberdade para ambos os grupos.

Entretanto, nenhuma das bandas foi expressa em 100% dos animais dentro de um mesmo período observado, variando entre 12,5% a 75% em ambos os grupos. O

grupo de animais **Prec** apresentou, além das bandas supracitadas, a banda de 85kDa. Neste grupo, no momento 0 da puberdade, foi registrado maior número de animais expressando esta proteína (75%). Os animais **Reg** não apresentaram as bandas protéicas de 191, 124 e 64kDa em nenhum momento do desenvolvimento sexual.

Pela análise dos géis, pôde-se notar que existem diferenças individuais entre os perfis de proteínas no plasma seminal de cada animal, tanto dentro de período como entre os períodos, principalmente na faixa que compreende as cadeias polipeptídicas acima de 22kDa (Fig. 4: A e B). Resultados semelhantes foram obtidos por Roncoletta et al. (1999) ao trabalharem com touros da raça Gir de alta e baixa congelabilidade de sêmen e por Welter (2006), com touros da raça Nelore.

As proteínas de menor peso molecular também apresentaram variações individuais, mas quando os perfis foram comparados, dentro e entre períodos, houve menor variabilidade que os citados anteriormente. Com baixo peso molecular encontram-se as cadeias polipeptídicas em maior concentração no plasma seminal, com peso molecular aparente abaixo de 16kDa, sendo marcadas mais fortemente no gel (Fig. 4 A e B).

No presente estudo, as proteínas abaixo de 16kDa representaram 56,65%, 57,64%, 78,64%, 67,22% e 73,84% da proteína total contida no gel, para os períodos -60, -30, 0, +30 e +60, nos animais **Prec**, respectivamente. Os animais **Reg** apresentaram 66,43%, 72,14%, 80,16%, 73,13% e 76,35% para os mesmos períodos, respectivamente. Isto demonstra, segundo Roncoletta et al. (1999), Scheit et al. (1988) e Welter (2006) o predomínio de tais proteínas no plasma seminal de bovinos.

A densidade óptica (DO) das bandas presentes nos géis variou de acordo com sua concentração no plasma seminal. Desta forma, obteve-se a diferença entre as bandas protéicas tanto dentro de grupos quanto dentro dos períodos. As bandas de 238, 134, 85, 73, 61, 58,9, 47, 46, 43, 41, 34, 31, 25, 18 e 14kDa não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos e os períodos do desenvolvimento sexual.

Essas bandas apresentaram distribuição irregular dentro dos períodos, sendo ausentes em alguns momentos do desenvolvimento sexual. Isto reduziu o número de amostras de tais variáveis dentro da unidade experimental, podendo ter influenciado na resposta estatística das mesmas. Resultado semelhante, mas com outro grupo de bandas protéicas, foi observado por Alonso Marques et al. (2000). Roncoletta et al. (1999) também relataram resultados semelhantes, demonstrando a variabilidade do padrão de certas proteínas no plasma seminal de bovinos.

Entretanto, há proteínas que possuem uma frequência de distribuição consistente, servindo como parâmetro de análise. Dentre elas estão as proteínas com peso molecular de 112, 62, 55, 30, 22, 19, 16, 13,9, 12, 11 e 6,9kDa. Essas proteínas diferiram ($p<0,05$) dentro do período da puberdade (-60 a +60), mas não entre grupos ($p>0,05$).

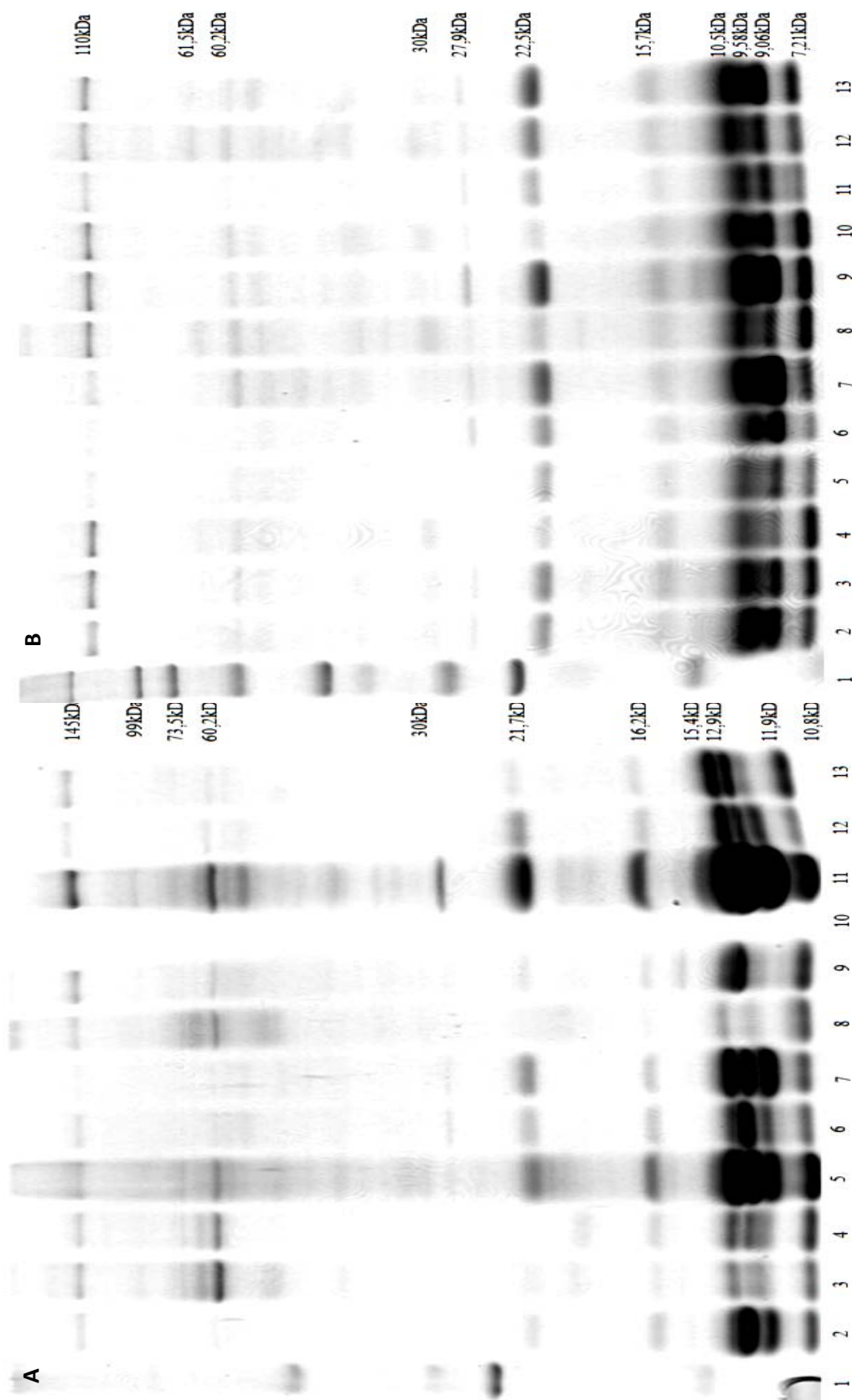


Figura 4: Gel em SDS-PAGE (1D) de animais nos momentos +30 (A) e +60 (B) do desenvolvimento sexual. Linhas contendo amostras dos animais **Prec** (3, 4, 8, 9, 11 e 13), animais **Reg** (2, 5, 6, 7, 10, e 12) e padrão do peso molecular (1).

As proteínas de 112kDa demonstram estarem mais presentes a medida que ocorre o desenvolvimento sexual, diferindo ($p<0,05$) dentro, mas não entre os grupos segundo a idade (Fig. 5A). Em razão dessa variável apresentar efeito de idade, sem contudo apresentar interação com grupo, ajustou-se um modelo de regressão representativo dos valores ($y=2,04+0,21x$; $R^2=0,19$) para ambos os grupos. Essa maior expressão dentro de tempo sugere ter correlação com a secreção de andrógenos, como reflexo do ganho de peso e do desenvolvimento testicular, dando a entender que a mesma seja associada positivamente com o desenvolvimento sexual e, conseqüentemente, com a fertilidade.

A banda de 62kDa apresentou diferença ($p<0,05$) apenas no momento +30 do desenvolvimento sexual (Fig. 5B) dentro de cada grupo, mas não entre grupos, não apresentando correlação com os parâmetros espermáticos. Contudo, esta proteína pode ter ligação com a secreção de testosterona, uma vez que o aumento da sua concentração ocorreu a partir da puberdade, atingindo seu pico 30 dias após e se estabilizando logo a seguir. Entretanto, a falta de ligação com outros parâmetros sexuais limitou tal observação.

A banda de 55kDa demonstrou ter maior secreção no início do desenvolvimento sexual em ambos os grupos (Fig. 5C), diminuindo sua expressão com o avançar da idade. Como foi registrado efeito de idade, sem, contudo, ter sido observada correlação com grupo, ajustou-se uma regressão sigmoidal, segundo o modelo de Boltzmann, representativo dos valores ($f=10,97+22,53/(1+\exp(-(x+18,68)/-5,18))$; $R^2=0,99$). Esta proteína demonstrou padrão inverso à banda de 112kDa, podendo indicar uma correlação inversa com o desenvolvimento sexual.

A modulação da expressão da banda de 30kDa foi similar entre os dois grupos, tendo maior secreção nos momentos 0 e +60 da puberdade (Fig. 5D), não diferindo ($p>0,05$) entre os grupos (**Prec** e **Reg**), apresentando, contudo, interação de idade e grupo. Em razão disto, se ajustou um modelo de regressão para cada um dos grupos (**Prec**: $y=1,09+0,15x$, $R^2=0,27$; **Reg**: $y=-0,77+1,62x-0,22x^2$, $R^2=0,44$).

A expressão das bandas de 22kDa, nos animais **Prec** e **Reg**, demonstrou similaridade com a expressão das bandas de 30kDa, tendo picos nos momentos 0 e +60 da puberdade. Estes momentos (0 e +60) diferiram dos demais nos dois grupos estudados (Fig. 5E). Em razão de ter sido registrado efeito de idade para esta variável, sem, contudo, apresentar interação com grupo, ajustou-se uma regressão que pudesse representar seus valores ($y=1,71+0,35x$; $R^2=0,28$) (Fig. 9).

A banda de 16kDa também apresentou maior expressão no momento 0 da puberdade tanto em animais **Prec** quanto **Reg**, mas não diferiu ($P>0,05$) entre grupos. As proteínas de 22kDa e 16kDa podem ter alguma ligação com a secreção de testosterona, semelhante à banda de 62kDa, demonstrando serem responsivas ao momento em que é esperada maior secreção deste hormônio. Contudo, como não foram determinadas as concentrações de testosterona durante o período de desenvolvimento sexual dos animais, não se pôde confirmar tal hipótese.

As proteínas de menores pesos moleculares (<22kDa) apresentaram em maior concentração no plasma seminal bovino, representando, respectivamente, 78,64% e 80,16% do total de proteínas no plasma seminal no momento 0 da puberdade para os grupos **Prec** e **Reg**, respectivamente. Isto pode ser observado quando comparada a intensidade individual das bandas que representam a concentração de proteína no

plasma seminal. Similar as proteínas de 30kDa e 22kDa, as de menores pesos moleculares (<16kDa) demonstraram pico de expressão nos momentos 0 e +60 da puberdade, podendo indicar o envolvimento destas proteínas com a testosterona secretada durante a puberdade (Fig. 6).

Assim, como para as demais proteínas estudadas, estas também não demonstraram diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos, mas apresentaram diferença ($p<0,05$) entre os estádios de desenvolvimento sexual, sendo que a banda de 12kDa apresentou interação entre idade e grupo.

Desta forma, ajustou-se um modelo de regressão para cada uma delas. A de 13,9kDa teve o modelo $y=-8,54+57,06x-7,74x^2$, $R^2=0,24$ e a de 11kDa teve o modelo $y=7,59+30,51x-2,39x^2$, $R^2=0,35$. Em decorrência da interação, idade x grupo,

observada na banda de 12kDa, ajustou-se um modelo para cada grupo. **Prec** (12kDa): $y=21,38+13,64x$, $R^2=0,24$; **Reg** (12kDa): $y=-43,45+91,16-12,70x^2$, $R^2=0,58$.

3.3 Correlações entre a intensidade das bandas protéicas, os parâmetros espermáticos e as proteínas com afinidade à heparina

Há vários relatos que demonstram a importância, tanto positiva quanto negativa, das proteínas no plasma seminal sobre a fertilidade do macho. Em função dessa ocorrência, buscou-se no presente estudo a correlação da densidade óptica (DO) das bandas protéicas com os parâmetros ponderais, espermáticos (Tab.3) e os valores dos picos protéicos com afinidade à heparina (Tab.4), segundo Martins (2010), nos períodos de -60 a +60 da puberdade.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos valores ponderais, espermáticos e dos picos protéicos com afinidade à heparina (Martins, 2010)

Variáveis	Estádio do desenvolvimento sexual (dias à puberdade)				
	-60	-30	0	30	60
Idade (meses)	16,26±1,49	17,18±1,50	18,14±1,54	19,08±1,52	20,10±1,58
Perímetro Escrotal (cm)	24,53±1,81	26,74±2,10	28,25±2,37	29,87±2,11	30,91±2,50
Peso (Kg)	272,63±40,50	301,21±41,90	330,63±34,93	357,63±37,26	373,25±31,56
Volume do Ejaculado (mL)	3,71±2,07	4,97±2,21	5,29±3,00	5,15±2,79	5,07±1,64
Concentração Espermática(x10 ⁶)	3,83±3,52	4,70±4,23	80,70±71,83	141,02±168,45	154,69±195,17
Motilidade Espermática (%)	5,75±7,29	7,87±11,65	22,25±17,79	42,00±19,25	39,06±21,23
Vigor (1-5)	1,06±1,08	1,44±1,19	2,56±1,09	3,06±1,39	3,19±1,22
Defeitos Maiores (%)	65,20±16,00	75,30±14,08	55,50±24,94	33,20±28,51	12,69±10,33
Defeitos Menores (%)	11,97±6,63	11,30±7,17	12,25±10,08	14,07±14,75	11,88±11,30
Defeitos Totais (%)	77,2±16,59	86,60±11,94	67,75±22,29	47,30±26,89	24,56±17,18
Normais (%)	22,80±16,59	13,37±11,94	32,25±22,29	52,71±26,89	75,44±17,18

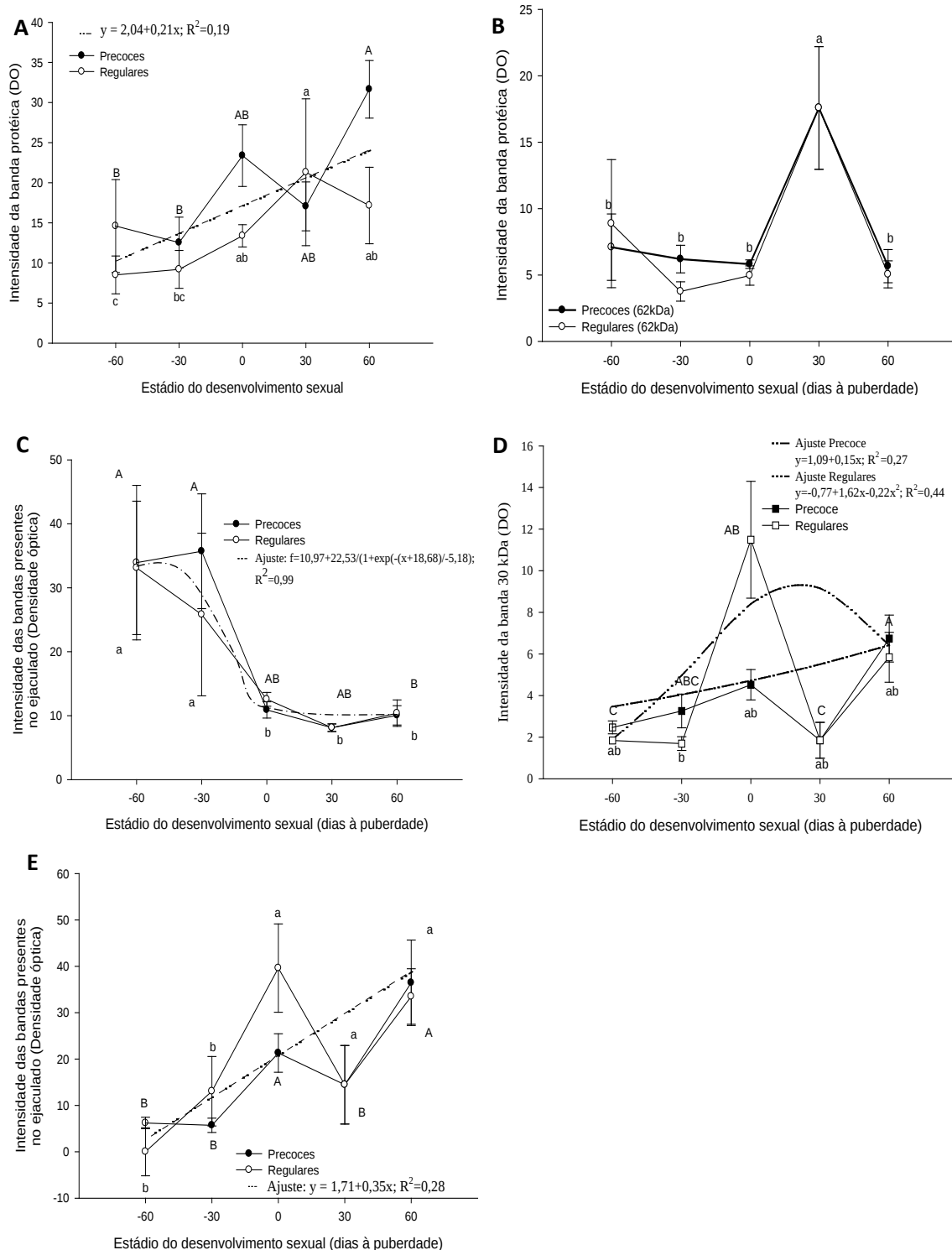


Figura 5: Média ($\pm$ erro padrão) da expressão das bandas protéicas de 112 (A), 62 (B), 55(C), 30 (D) e 20kDa (E) durante o desenvolvimento sexual. Letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem ($p < 0,05$), pelo teste de Duncan, nos animais **Prec** e **Reg**, respectivamente.

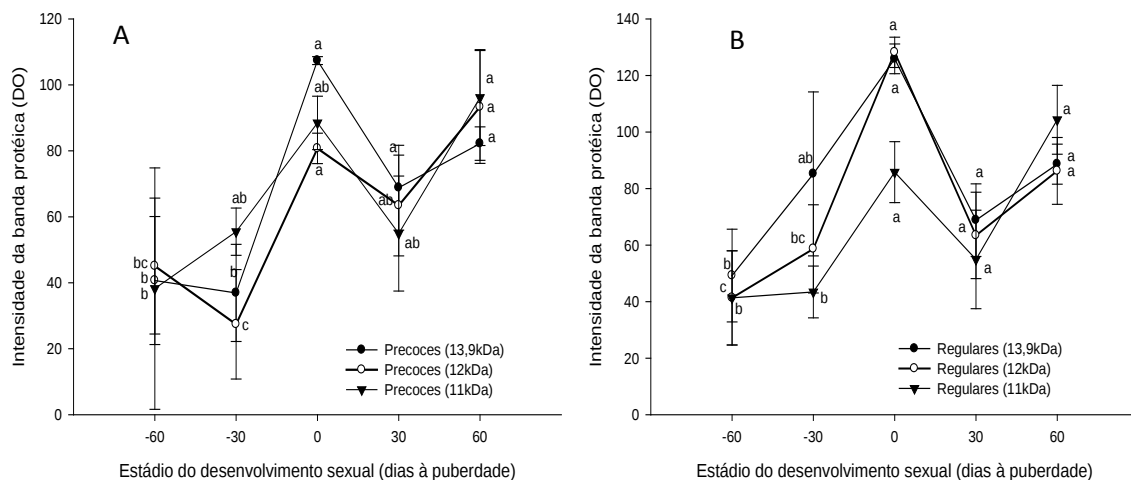


Figura 6: Média ($\pm$ erro padrão) da expressão das bandas protéicas de 13,9, 12 e 11kDa durante o desenvolvimento sexual. Letras distintas na mesma linha diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan nos animais **Prec** (A) e **Reg** (B), respectivamente.

Tabela 4: Média e desvio padrão dos picos protéicos com afinidade à heparina (Martins, 2010)

Variáveis	Estádio do desenvolvimento sexual (dias à puberdade)				
	-60	-30	0	30	60
Proteína total (mg/mL)	14,01 $\pm$ 10,29	13,13 $\pm$ 8,90	25,22 $\pm$ 22,55	33,38 $\pm$ 27,77	33,42 $\pm$ 13,80
Pico com afinidade a heparina 1 (mg/mL)	7,76 $\pm$ 3,99	7,14 $\pm$ 3,80	8,11 $\pm$ 5,45	10,68 $\pm$ 5,74	11,52 $\pm$ 3,70
Pico com afinidade a heparina 2 (mg/mL)	0,6 $\pm$ 0,42	0,57 $\pm$ 0,54	0,60 $\pm$ 0,49	0,96 $\pm$ 0,97	1,08 $\pm$ 0,94
Pico com afinidade a heparina 3 (mg/mL)	2,03 $\pm$ 3,13	2,16 $\pm$ 2,92	5,41 $\pm$ 6,27	6,75 $\pm$ 6,38	5,94 $\pm$ 3,37
Pico com afinidade a heparina 4 (mg/mL)	2,06 $\pm$ 2,75	2,15 $\pm$ 1,67	3,90 $\pm$ 4,29	6,06 $\pm$ 7,40	5,97 $\pm$ 3,96
Pico com afinidade a heparina 5 (mg/mL)	1,21 $\pm$ 1,61	01,16 $\pm$ 1,39	3,93 $\pm$ 4,76	5,69 $\pm$ 6,82	4,91 $\pm$ 2,55
Pico com afinidade a heparina 6 (mg/mL)	0,5 $\pm$ 0,67	0,41 $\pm$ 0,57	2,34 $\pm$ 3,10	2,40 $\pm$ 2,40	2,38 $\pm$ 1,64
Pico com afinidade a heparina 7 (mg/mL)	0,2 $\pm$ 0,36	0,13 $\pm$ 0,21	0,68 $\pm$ 0,92	1,27 $\pm$ 1,69	1,17 $\pm$ 0,98
Pico com afinidade a heparina 8 (mg/mL)	0,10 $\pm$ 0,12	0,09 $\pm$ 0,09	0,28 $\pm$ 0,33	0,42 $\pm$ 0,74	0,44 $\pm$ 0,45

As bandas protéicas com peso molecular aparente de 238, 191, 124, 85, 73, 65, 64, 62, 61, 58,9, 53, 43, 41, 36, 34, 32, 31, 29, 19, 18 e 14kDa não apresentaram correlação significativa ($p>0,05$) com nenhuma das características estudadas. Desta forma, não foram apresentadas, sendo expostas apenas as bandas que tiveram alguma correlação significativa com as variáveis abordadas (Tab. 5).

As intensidades das bandas, dentro de período, que tiveram correlação com alguma das variáveis são apresentadas na figura 7. Deve-se salientar que a densidade da banda representa sua concentração no plasma seminal, ou seja, quanto maior ou menor for sua densidade, maior ou menor será sua concentração neste fluido (Oberst et al., 2002).

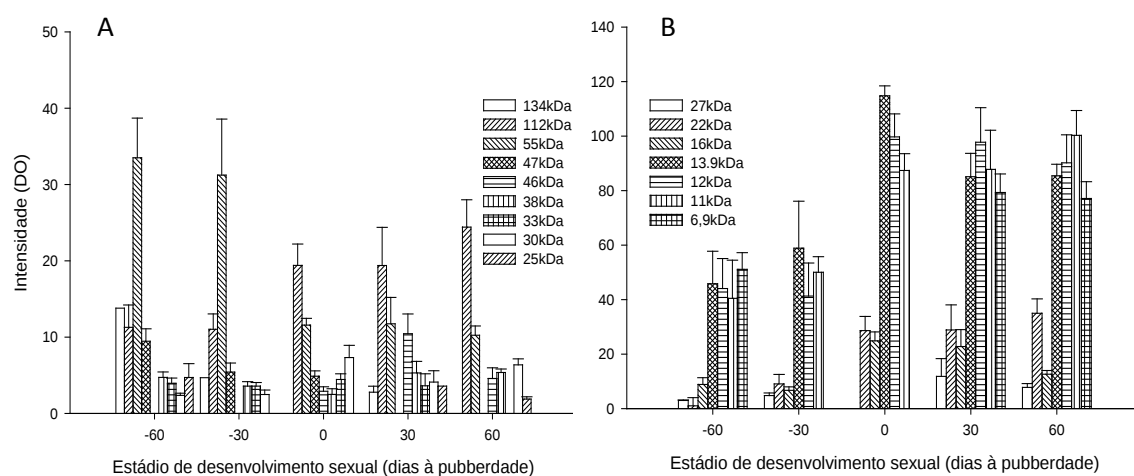


Figura 7: Densidade óptica (DO) das bandas 134, 112, 55, 47, 46, 38, 33, 30 e 25kDa (A) e das bandas 27, 22, 16, 13,9, 12, 11 e 6,9kDa (B), durante a peripuberdade.

As bandas de 55 e 47kDa, com significância mínima de 5%, tiveram correlação negativa com idade, perímetro escrotal (PE), peso corporal, concentração espermática, proteínas totais, picos 3, 4, 5, 6 e 7 de afinidade à heparina. A banda de 55kDa também apresentou correlação negativa com o número de células normais e o pico 1, e correlação positiva com o número de defeitos totais e maiores, enquanto a banda de 47kDa apresentou correlação negativa com a motilidade espermática.

Tabela 5: Correlações de Pearson e Spearman entre as bandas protéicas do plasma seminal (134 a 25kDa) e os valores ponderais, espermáticos e os picos protéicos com afinidade à heparina

Variável	Bandas Protéicas (kDa)								
	134	112	55	47	46	38	33	30	25
PE	-0,59 ¹	0,27 ¹	-0,41 ²	-0,73 ³	...	...	...	...	-0,63 ¹
Peso corporal	...	0,34 ¹	-0,53 ²	-0,51 ¹	...	...	...	...	...
Conc. Espermát.	...	0,32 ¹	-0,32 ¹	-0,54 ¹	...	...	...	0,46 ²	...
Motilidade*	...	0,37 ²	...	-0,58 ¹	0,49 ¹	...	...	...	...
Def. Maiores	...	...	0,42 ²	...	...	-0,43 ¹	...	...	...
Def. Menores	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Def. Totais	...	...	0,35 ¹	...	...	-0,48 ²	...	...	...
P1	...	...	-0,28 ¹	...	...	...	...	...	...
P2	...	...	...	...	...	...	-0,53 ²	...	...
P3*	...	...	-0,41 ²	-0,52 ¹	...	...	...	...	...
P4	...	...	-0,32 ¹	-0,84 ³	0,63 ²	...	-0,46 ¹	...	...
P5	-0,24	0,21	-0,49 ³	-0,64 ²	0,46 ¹	...	...	0,36 ¹	...
P6	...	...	-0,47 ³	-0,53 ¹	0,45 ¹	...	...	0,35 ¹	...
P7*	...	...	-0,51 ³	-0,60 ¹	0,54 ¹	0,08	-0,50 ¹	0,27	...
P8*	...	...	-0,23	-0,57 ¹	0,36	0,19	-0,37	0,26	...

PE: perímetro escrotal; Conc. Espermát.: concentração espermática; Def.: defeitos; Prot.: proteína; P1 a P6: picos com afinidade à heparina. *Variáveis correlacionadas pelo método de Spearman; ¹(p<0,05); ²(p<0,005); ³(p<0,0005).

As intensidades das bandas de 55 e 47kDa diminuíram dentro de tempo (Fig. 8), mostrando correlação de média a alta magnitude entre os parâmetros analisados. Isto demonstra a associação dessas proteínas com o desenvolvimento sexual, pois as variáveis: idade, peso corporal, perímetro escrotal, concentração espermática, defeitos maiores e totais, são inerentes à condição da puberdade.

Essas proteínas também demonstraram ter correlação negativa com os picos protéicos com afinidade à heparina, mostrando com isto, relação inversa com a fertilidade, uma vez que tanto esses picos protéicos (Martins, 2010) quanto esse GAG (Ax et al., 1999) já apresentaram correlação positiva com os padrões espermáticos e a fertilidade, respectivamente. Desta forma, estas proteínas podem servir como um indicador negativo do estado de maturidade sexual.

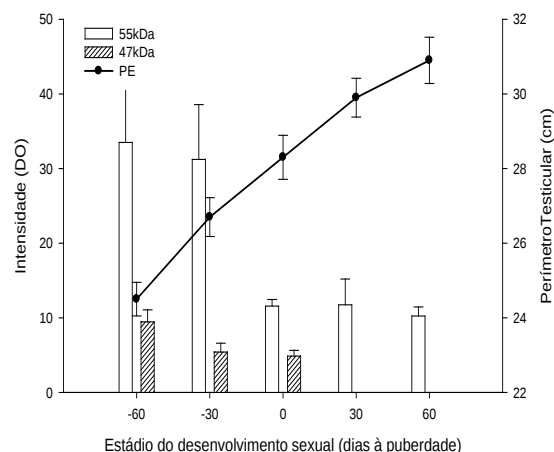


Figura 8: Densidade óptica das bandas de 55kDa e 47kDa e o crescimento testicular durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).

Há relatos na literatura que descreve a presença de proteínas com esses pesos moleculares no plasma seminal de touros. Contudo, em princípio, não demonstram serem as mesmas, pois a proteína de 55kDa relatada por Killian et al. (1993) e mais tarde denominada de osteopontina, é associada positivamente à fertilidade, sendo mais expressa em touros de alta fertilidade, contrário ao que se apresenta no presente estudo.

Entretanto, Eloy e Furtado (2008) ao utilizarem ovinos machos da raça Anglu-Nubiano, demonstraram haver correlação negativa entre uma proteína de 55kDa do plasma seminal e a congelabilidade de sêmen desses animais. Apesar de serem espécies diferentes, pode-se aqui ter um parâmetro sobre a presença de uma proteína de banda de tal peso molecular que possa ser desfavorável a fertilidade em machos, como as aqui relatadas.

A proteína de 47kDa foi relatada por Jones et al. (1980), como sendo uma proteína presente na cauda do epidídimo e andrógeno dependente. Todavia, apesar de não haver dados que confirmem tal hipótese, essa proteína teve sua expressão

diminuída e anulada após a puberdade com aumento da testosterona circulante, não demonstrando tal ação. Desta forma, fica aqui como perspectiva futura a discriminação detalhada destas proteínas que podem ter função indicadora quanto ao momento do início da puberdade em machos zebus.

As bandas de 134kDa e 25kDa apresentaram correlação negativa e de alta magnitude ($r=-0,59$; $p<0,05$) com o PE, demonstrando diminuir sua expressão à medida que ocorre o desenvolvimento testicular. Já a banda de 112kDa demonstrou correlação positiva de média magnitude com o PE, peso, concentração espermática, motilidade e concentração de proteínas totais, demonstrando ser associada à fertilidade do macho (Fig. 9).

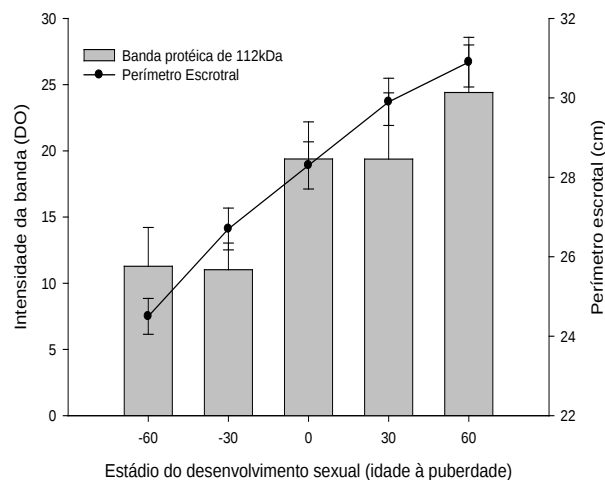


Figura 9: Intensidade da banda de 112kDa e o perímetro escrotal durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).

Não foram encontrados na literatura relatos envolvendo banda de peso molecular próxima ao registrado no presente estudo que tenha sido correlacionada aos padrões espermáticos em bovinos. No entanto, na espécie caprina, Eloy e Furtado (2008) ao utilizarem machos da raça Anglo-Nubiano de acordo com a capacidade de congelamento do sêmen, observaram bandas de 112kDa em animais que apresentaram boa congelabilidade. Estes autores consideraram ser possível que esta banda protéica possa vir a ser um interessante marcador de congelabilidade em caprinos.

Assim, apesar de não haver dados comparativos de congelabilidade de sêmen no presente estudo, pode-se especular que tal proteína seja favorável a fertilidade do macho, a partir dos dados aqui analisados, ficando aqui como perspectiva para novos estudos, o sequenciamento dessa proteína.

A proteína de 46kDa apresentou correlação positiva de média a alta magnitude com a motilidade espermática e os picos protéicos 4, 5, 6 e 7 com afinidade à heparina. Segundo Martins (2010), todos os picos protéicos com afinidade à heparina tiveram

correlação com os padrões reprodutivos estudados (idade, PE, peso corporal, motilidade espermática, defeitos maiores, menores e totais, volume e concentração espermática). Contudo, dentre os picos avaliados, observou-se que P5, P6 e, especialmente, o P7 apresentaram as maiores correlações com estes parâmetros. Desta forma, pode-se sugerir, segundo a correlação apresentada entre essa banda protéica e os parâmetros espermáticos, que esta proteína tenha repercussão positiva na reprodução do macho.

Soubeyrand et al. (1998) encontraram no plasma seminal de touros uma proteína de banda de 46kDa que identificaram como sendo um fragmento da fosfolipase A₂. Esta enzima é ligada diretamente à ação da heparina no processo de capacitação espermática, o que pode explicar a alta correlação encontrada entre a banda protéica de 46kDa, do presente estudo, e os picos com afinidade à heparina. Contudo, por não ter sido sequenciada tal banda, não se pode aqui inferir que esta seja a mesma encontrada por Soubeyrand et al. (1998).

A proteína de 38kDa apresentou correlação negativa de média magnitude com os defeitos maiores e total, e positiva com o número de células espermáticas normais, que demonstra associação com a espermatogênese. Já a proteína de 33kDa apresentou correlação negativa de média magnitude com a concentração de proteína total e os picos protéicos 2, 4 e 7 com afinidade à heparina, podendo ter papel inverso ao apresentado pela proteína de 38kDa.

A proteína de 30kDa demonstrou ter papel favorável à fertilidade, pois apresentou

correlação positiva de média a alta magnitude com a idade, o volume do ejaculado, a concentração espermática e os picos 5 e 6 de afinidade à heparina (Fig. 10). Segundo Manjunath et al. (1993), a proteína de 30kDa presente no plasma seminal pode ser a BSP-30 que se liga à membrana espermática e promove o sequestro de colesterol, tornando a membrana permeável para a entrada de cálcio e ativação da fosfolipase A2, que promoverá a capacitação dos espermatozoides. Todavia, maiores estudos necessitam ser realizados para que se possa confirmar tal hipótese.

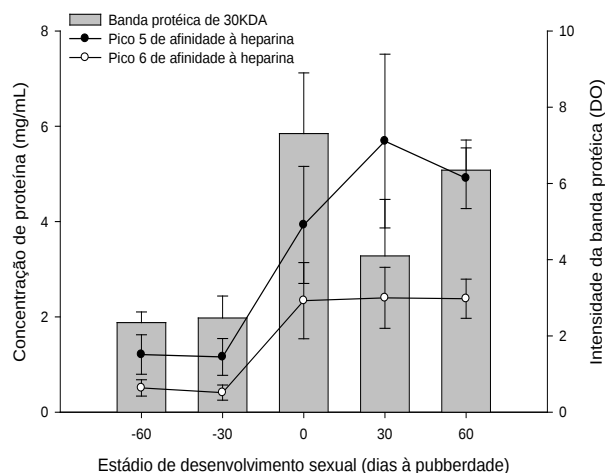


Figura 10: Densidade óptica da banda de 30kDa e a concentração de proteínas dos picos 5 e 6 de afinidade à heparina durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).

Dentre as BSPs, existem as de menores pesos (<22kDa) e que se apresentam em maior quantidade no plasma seminal bovino (Roncoletta et al., 1999). No presente estudo, foi constatada a presença de bandas protéicas de pesos moleculares menores ou iguais a 22kDa que estavam presentes desde o momento -60 até o +60 da puberdade, apresentando uma distribuição mais uniforme, dentro de animais e de tempo, comparadas às proteínas plasmáticas seminais de maior peso molecular.

As bandas protéicas de 22, 16, 12, 11 e 6,9kDa apresentaram correlação positiva e de média a alta magnitude com as variáveis idade, PE, peso corporal, concentração, motilidade e vigor espermático (Tab. 5). As proteínas de 22, 16, 12 e 11kDa também apresentaram correlação negativa com os defeitos maiores, demonstrando com isto, a ligação que estas proteínas têm com a fertilidade.

Resultados semelhantes, mas trabalhando com congelabilidade de sêmen bovino, foram relatados por Jobim et al. (2003) que registraram 12 bandas protéicas, nessa mesma faixa de peso molecular, das quais quatro apresentaram-se quantitativamente maiores ($p < 0,05$) nas amostras dos reprodutores bovinos pertencentes ao grupo de maior congelabilidade, bandas 3 (15-16kDa; pI 4,7-5,2), 7 (11-12kDa; pI 4,1-4,8), 11 (13-14kDa; pI 6,90-6,50) e 23 (18-20kDa; pI 4,8-5,2), enquanto que a banda protéica de 25-26kDa (pI 6,0-6,5), mostrou-se significativamente maior ($P < 0,05$) nos reprodutores de menor congelabilidade do sêmen, evidenciando a existência de diferenças no perfil protéico dos reprodutores com maior e menor congelabilidade do sêmen, o que sugere indiretamente os dados aqui apresentados, por associar essas proteínas à melhor qualidade seminal. Porém, como não foi realizada a identificação de cada proteína, não foi possível confirmar que sejam as mesmas.

A proteína de 27kDa encontrada no presente estudo (Tab. 6), segundo revisão de Souza (2007), pode ser uma isoforma da prostaglandina D sintetase (PGDS), a qual aumenta à medida que o animal envelhece. Este mesmo autor cita que apesar desta proteína ser mais abundante em touros de alta fertilidade, a PGDS está presente em quantidades variáveis em animais com diversos níveis de fertilidade, o que sugere que esta proteína seja benéfica, mas não crucial à fertilidade.

As proteínas de 22, 13,9, 12, 11 e 6,9kDa apresentaram também correlação positiva com os picos protéicos 3, 4, 5, 6 e 7 de afinidade à heparina, variando na magnitude e no grau de significância, conforme explicitado na tabela 5.

Dentre todas as bandas registradas no presente estudo, as de menores pesos moleculares foram as que mais

apresentaram correlação com os picos protéicos de afinidade à heparina, indicando associação com a fertilidade da célula espermática por caminhos que possam utilizar os GAGs nesse mecanismo, assim como apresentado nas proteínas do grupo das BSPs. Contudo, deve-se ressaltar que em razão de não ter sido realizada a identificação das bandas protéicas não se pôde inferir eventuais papéis a estas proteínas como se fossem pertencentes a esta mesma classe, mas apenas mencioná-las frente aos dados aqui levantados.

Entretanto, existem proteínas nessa faixa de peso molecular que são encontradas no plasma seminal de bovinos e são correlacionadas negativamente com a fertilidade. Corroborando esta afirmativa, Garcia e Graham (1987) demonstraram que uma fração protéica de baixo peso molecular ($< 12-14$ kDa) não foi benéfica para as células espermáticas durante a congelação. Al-Somai et al. (1994) encontraram que as proteínas aniônicas, com peso molecular entre 15 e 16 kDa, são maléficas à motilidade espermática, diferentemente dos dados aqui apresentados.

Tabela 6: Correlações de Pearson e Spearman entre as bandas protéicas do plasma seminal (22 a 6,9 kDa) e os valores ponderais, espermáticos e os picos protéicos com afinidade à heparina

Variável	Bandas Protéicas (kDa)						
	27*	22	16	13,9	12	11	6,9
PE	0,37 ¹	0,38 ²	0,38 ²	0,37 ²	0,46 ³	0,53 ³	0,47 ²
Peso	0,47 ²	0,55 ³	0,43 ²	0,54 ³	0,64 ³	0,55 ³	0,60 ³
Volume Ejaculado	...	0,31 ¹	...	0,40 ²	0,54 ³	0,28 ²	0,57 ³
Conc. Espermát.	0,46 ¹	0,51 ³	0,52 ³	0,43 ²	0,52 ³	0,57 ³	0,43 ²
Motilidade*	0,49 ²	0,30 ¹	0,33 ¹	...	0,46 ²	0,42 ²	0,66 ³
Vigor*	0,46 ¹	0,28 ¹	0,31 ¹	...	0,37 ²	0,35 ¹	0,54 ³
Def. Maiores	...	-0,55 ³	-0,31 ¹	...	-0,42 ²	-0,51 ³	...
Def. Menores	...	...	...	...	...	...	...
Def. Totais	...	-0,57 ³	...	...	-0,42 ²	-0,53 ³	-0,26
P1	0,43 ¹	...	...	...	0,38 ²	0,31 ¹	0,38 ¹
P2	...	...	...	...	...	...	...
P3*	0,58 ²	0,36 ¹	...	0,29 ¹	0,54 ³	0,35 ¹	...
P4	...	0,32 ¹	0,30 ¹	0,37 ²	0,44 ²	0,36 ¹	0,55 ²
P5	0,44 ¹	0,48 ³	0,40 ²	0,47 ³	0,59 ³	0,43 ²	0,50 ²
P6	0,54 ²	0,56 ³	0,40 ²	0,48 ³	0,63 ³	0,45 ²	0,36 ¹
P7*	0,50 ²	0,56 ³	0,34 ¹	0,44 ³	0,60 ³	0,42 ²	0,35 ¹
P8*	0,37 ¹	0,39 ²	...	...	0,40 ²	...	0,38 ¹

PE: perímetro escrotal; Conc. Espermát.: concentração espermática; Def.: defeitos; Prot.: proteína; P1 a P6: picos com afinidade à heparina. * Variáveis correlacionadas pelo método de Spearman; ¹ (p<0,05); ² (p<0,005); ³ (p<0,0005).

4. Conclusão

1. A concentração de proteínas totais no plasma seminal diferiu apenas dentro do período da puberdade sem sofrer influência da categoria animal, precoce ou regular.
2. As proteínas seminais de 134, 112, 55, 47, 46, 38, 33, 30, 27, 25, 16, 13,9, 12, 11 e 6,9kDa apresentaram correlação com os padrões espermáticos.
3. As bandas protéicas de 55 e 47kDa podem servir como possíveis marcadoras negativas da maturidade sexual.
4. Destacaram-se as proteínas de menor peso molecular (<22kDa) que apresentaram correlação com a maioria dos parâmetros espermáticos, tendo aumento na sua concentração com a maturidade sexual.

Referências Bibliográficas

- ALONSO MARQUES, V.; GOULART, L.R.; FELICIANO SILVA, A.E.D. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A2 concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrosome reaction. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p.825-829, 2000.
- AL-SOMAI, N.; VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; et al. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects motility of bull sperm. **Reproduction Fertility and Development**, v.6, n.2, p. 165-171, 1994.
- AX, R.L.; BELLIN, M.E.; ZHANG, H.M.; et al. New Approach to Estimating Bull Fertility. In: **Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI**. 1999, Greeley, Colorado.

- BELLIN, M.E.; HAWKINS, H.E.; OYARZO, J.N.; et al. Monoclonal antibody detection of heparin binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal Animal Science**, v.74, n.1, p. 173-182, 1996.
- BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E.; et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, n.8, p.2032-2039, 1998.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The Search is on: Finding Accurate Molecular Markers of Male Fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.9, p.1915-1925, 2001.
- BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; et al. Sexual development in early- and late-maturing Bos indicus and Bos indicus × Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1198-1217, 2004.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55 Kilodalton Fertility-Associated Protein in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, n.6, p. 1293-1301 1997.
- ELOY, A.M.X.; FURTADO, J.R. Marcadores de Congelabilidade no Plasma Seminal de Caprinos - Estudos Preliminares. **Comunicado Técnico**, Embrapa-Sobral, p.1-4, 2008. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/cot97.pdf>, Acessado em: 20/05/ 2010.
- GARCIA, M.A.; GRAHAM, E.F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. **Cryobiology**, v.24, n.5, p. 446-454, 1987.
- GERENA, L.R.; IRIKURA, D.; URADE, Y. et al. Identification of a fertility associated protein in Bull seminal plasma as lipocain-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, n.3, p. 826-833, 1998.
- IPE, D. Performing the Friedman test and the associated multiple comparison test using PROC GLM. **Proceedings of the Twelfth Annual SAS Users Group International Conference**, v.12, p.1146-1148, 1987.
- 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, n.3, p. 667-676, 1980.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, n.6, p.1202-1207, 1993.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.78, n.4, p.1216-1231, 1998.

MANJUNATH, P; CHANDONNET, L; LEBLOND, E. et al. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.48, n.1, p.27-37. 1993.

MARTINS, J.A.M. **Desenvolvimento reprodutivo e análise das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina, em tourinhos Gir selecionados para a produção de leite**. Tese (Doutorado). UFMG, Belo Horizonte/MG. 71f, 2010.

PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Fertilization. In: King GJ, Neimann-Sorensen A, Tribe DE (Ed.). **World animal science—Reproduction in domesticated animals**. New York: Elsevier, 1993. p.195-227.

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, p. 1-5, 1999.

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

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

SCHEIT, K.H.; KEMME, M.; AUMILLER, G.; et al. The Major Protein of Bull Seminal Plasma: Biosynthesis and Biological Function. **Bioscience Reports**, v.8, n.6, p.589-608, 1988.

SHARPE, R.M. Intratesticular factors controlling testicular function. **Biology of Reproduction**, v.30, n.1, p.29-49, 1984.

SOUBEYRAND, S.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Phospholipase A₂ from

bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. **Biochemical Journal**, v.329, (Pt 1), p.41–47, 1998.

SOUZA, J.A.T.; CAMPELO, J.E.G.; MACEDO, N.A.; et al. Biometria testicular, características seminais, libido e concentração de testosterona em ovinos da raça santa inês, criados a campo, na microrregião de campo maior, Piauí. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 10, n.1, p. 21-28, 2007.

VALE FILHO, V.R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. **Animal Reproduction**, v.1, n.7, p. 418-438, 1988.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame de sêmen e classificação por pontos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.3, p.7-13, 1997.

WELTER, B.M. **Proteínas do plasma seminal e sua relação com características espermáticas e nível sérico de testosterona em touros da raça nelore**. Dissertação (Mestrado). UFU, Uberlândia/MG, 43f, 2006.

WOLF, F.R., ALMQUIST, J.O., HALE, E.B. Prepubertal behavior and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal Animal Science**, v.24, n.3, p.761-765, 1965.

CAPÍTULO III

Experimento 02

Determinação de IGF-I, leptina e insulina no plasma seminal associados aos parâmetros andrológicos durante a peripuberdade de tourinhos Gir-Leiteiros

Resumo

Buscou-se com este estudo determinar o perfil dos valores de leptina, insulina e IGF-I no plasma seminal e suas correlações com os padrões espermáticos e protéicos seminais no período da peripuberdade (60 dias antes até 60 dias após a puberdade). Utilizaram-se 16 tourinhos da raça Gir-Leiteiro, separados em dois grupos, precoces e regulares, segundo a determinação da puberdade. As concentrações hormonais foram determinadas por radioimunoensaio e as proteínas por géis 1D em gradiente de 10 a 15% de poliacrilamida, sendo as proteínas com afinidade à heparina separadas por gel filtração por meio de cromatografia líquida de rápido desempenho em coluna de afinidade. Os dados andrológicos foram determinados segundo os critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. As concentrações de IGF-I no plasma seminal diferiram entre os períodos da puberdade ($p < 0,05$), mas não entre os grupos. Desta forma, agruparam-se os valores que apresentaram média para os períodos -60; -30; 0; 30 e 60 da puberdade, respectivamente, de $38,11 \pm 93,77$, $104,42 \pm 107,47$, $321,28 \pm 318,29$, $208,33 \pm 193,83$ e $264,91 \pm 278,97$ ng/mL, respectivamente. As concentrações de IGF-I no plasma seminal apresentaram correlação positiva com idade, peso, perímetro escrotal, motilidade e concentração espermática, e com as bandas protéicas de menor peso molecular (< 22 kDa). As concentrações de insulina no plasma seminal não diferiram entre grupos ou idades. Com isto, agruparam-se os dados apresentando médias de $35,15 \pm 16,93$, $36,60 \pm 26,21$, $26,82 \pm 09,81$, $43,56 \pm 31,71$ e $32,24 \pm 16,71$ μ U/mL para os períodos da puberdade de -60 a +60, respectivamente. As concentrações de insulina não apresentaram correlação com os parâmetros espermáticos, mas diferiram ($p < 0,05$) nos grupos que apresentaram maiores concentrações de defeitos maiores ($31,08 \pm 18,58$ mU / mL) em comparação com os que apresentaram menor concentração desses defeitos ($40,01 \pm 25,37$ mU / mL). A leptina no plasma seminal não diferiu entre os grupos ou estágio de desenvolvimento sexual, com concentrações de $23,10 \pm 10,43$, $24,35 \pm 9,42$, $22,41 \pm 9,90$, $23,76 \pm 9,69$ e $24,99 \pm 11,42$ ng/ml para os períodos de puberdade (-60 - 30, 0, 30 e 60), respectivamente, após terem sido agrupados. Esses resultados demonstram que a determinação da insulina e IGF-I no plasma seminal de touros na peripuberdade pode servir como ferramenta para avaliação da qualidade do espermatozoide e início da puberdade.

Palavras-chave: plasma seminal, proteínas, puberdade, zebu.

Abstract

This study aimed to evaluate the profile of leptin, insulin and IGF-I values in seminal plasma and estimate their correlations with sperm and seminal protein patterns during the peripuberty (60 days before until 60 days after puberty). A total used 16 crossbred Gyr-Dairy bulls, precocious and regular, groups classified according to the determination of puberty. Hormonal concentrations were determined by radioimmunoassay and the proteins by 1D gel with gradient from 10 to 15% polyacrylamide, and proteins with affinity to heparin were separated by gel filtration using fast performance liquid chromatography on affinity column. Andrological data were determined using the criteria of the Brazilian College of Animal Reproduction. The

concentrations of IGF-I in seminal plasma differed between the periods of puberty ($p < 0.05$), but not between groups. Thus, the values were grouped and showed a mean for the periods analyzed of 38.11 ± 93.77 , 104.42 ± 107.47 , 321.28 ± 318.29 , 208.33 ± 193.83 and 264.91 ± 278.97 ng/mL, respectively. The concentrations of IGF-I in seminal plasma were positively correlated with age, weight, scrotal circumference, sperm motility and concentration, and protein bands of lower molecular weight (< 22 kDa). The insulin concentrations in seminal plasma did not differ between groups or among age and, thus, after grouped showed means of 35.15 ± 16.93 , 36.60 ± 26.21 , 26.82 ± 09.81 , 43.56 ± 31.71 and 32.24 ± 16.71 μ U/mL for periods of puberty varying -60 to +60, respectively. The insulin concentrations not correlated with sperm parameters, but differed ($p < 0.05$) in groups of animals with higher concentrations of major defects (31.08 ± 18.58 μ U/mL) compared with animals lower concentration of sperm defects (40.01 ± 25.37 μ U/mL). Leptin in seminal plasma did not differ between groups or stage of sexual development, and showed concentrations of 23.10 ± 10.43 , 24.35 ± 9.42 , 22.41 ± 9.90 , 23.76 ± 9.69 and 24.99 ± 11.42 ng/ml for the periods of puberty (-60, -30, 0, 30 and 60), respectively, after grouping. These results demonstrate that the determination of insulin and IGF-I in seminal plasma of bulls in peripuberty can serve as a tool for evaluation of sperm quality and timing of puberty.

Keywords: puberty, protein, seminal plasma, zebu.

1. Introdução

O plasma seminal é uma complexa mistura de secreções originadas nos testículos, nos epidídimos e nas glândulas sexuais acessórias (Manjunath et al., 1993), servindo como veículo para os espermatozóides ejaculados, além de conter fatores que influenciam a capacidade de fecundação dos mesmos (Calvete et al., 1996). Frente à interação que há entre o fluido seminal e as células espermáticas, as pesquisas mais recentes apontam certos fatores de crescimento como determinantes na qualidade seminal. Dentre estes, o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-I) é considerado um dos mais importantes para o desenvolvimento das células germinativas e para a maturação do espermatozóide (Kinner, 1992).

A produção de IGF-I pela cultura das células de Sertoli e Leydig corrobora essa ideia, sugerindo que o IGF-I possa atuar como fator de diferenciação e desenvolvimento para a espermatogônia, o espermatócito e a espermátide, sugerindo

sua ação reguladora na função testicular (Hansson et al., 1989).

Alguns pesquisadores registraram resultados semelhantes com a leptina no plasma seminal, a qual influenciou tanto positiva (Andò e Aquila 2005) quanto negativamente (Glander et al., 2002) a célula espermática. Nos últimos anos, foi demonstrado que a leptina é capaz de agir em diferentes níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, além de na própria célula espermática (Nikbakh et al., 2010), podendo influenciar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da motilidade dos espermatozóides (Jorsaraei et al. 2008). Como demonstrado por Glander et al. (2002) que, ao trabalharem com homens como modelo de estudo, relataram que os níveis de leptina no plasma seminal foram, significativamente, menores nos pacientes com os parâmetros de espermograma normal, comparado às amostras de sêmen patológico, e mostraram correlação negativa com a motilidade dos espermatozóides humanos, sugerindo que a maior concentração de leptina tem

associação negativa sobre a função espermática.

A insulina também tem papel central na regulação da função gonadal, promovendo a diferenciação da espermatogônia em espermatócito primário por se ligar aos receptores de IGF-I (Nakayama et al., 1999). A importância deste hormônio na qualidade espermática foi constatada em homens insulina-dependentes, os quais apresentaram espermatozoides com severos defeitos estruturais, tendo menor motilidade espermática, por terem menor concentração de insulina no plasma seminal (Shrivastav et al., 1989). Além disto, demonstrou-se também que ambos, membrana plasmática do espermatozoide e seu acrossoma, são alvos citológicos para insulina (Silvestroni et al., 1992), podendo o mesmo interferir na capacidade fecundante desta célula.

Desta forma, embora o controle endócrino seja integral à função reprodutiva, alguns machos inférteis não demonstram anormalidades sistêmicas (Kandeel et al., 2001), podendo ter alterações apenas na condição local, no plasma seminal. Assim, os parâmetros endócrinos sozinhos nem sempre explicam as anomalias na produção espermática ou infertilidade, necessitando do maior número de informações possíveis para um diagnóstico. Buscou-se, com este estudo determinar o perfil dos valores de leptina, insulina e IGF-I no plasma seminal e suas correlações com os padrões espermáticos e protéicos seminais no período da peripuberdade

2. Material e Métodos

2.1 Local, dados climáticos, animais experimentais e manejo alimentar

O local, os dados climáticos, os animais experimentais e o manejo alimentar foram determinados segundo o descrito no capítulo dois desta tese.

2.2 Procedimento experimental

2.2.1 Coleta do plasma seminal

A coleta do plasma seminal foi realizada segundo o discriminado no capítulo dois desta tese.

2.2.1.1 Análise do plasma seminal para determinação das concentrações de IGF-I, Leptina e Insulina

Uma alíquota de 500µL das amostras coletadas em campo contendo 250µL de plasma seminal e 250µL de tampão foi submetida inicialmente a uma coluna de gel filtração, Superose-12[®] (HR 10/30, General Electric Company, Piscataway/USA), em sistema de cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC) com fase móvel composta por: Tris-20mmol; NaCl-50mmol; pH 8, para a verificação das diferentes frações ou picos de proteínas presentes no material analisado.

As frações dos picos correspondentes às representações gráficas (Figura 1) do total de proteínas presentes foram analisadas comparativamente entre tempos (-60, -30, 0, 30 e 60) e entre grupos de touros (Prec e Reg). Para a verificação da estimativa dos pesos moleculares, em cada pico ou fração distinta de proteína, foi feita a calibração da coluna com seis diferentes proteínas de peso molecular crescente (Aprotinina de pulmão bovino: 6,5 kDa; Citocromo C de coração de cavalo: 12,4 kDa; Anidrase Carbônica de bovinos: 29 kDa; Albumina Sérica Bovina: 66 kDa; Álcool Desidrogenase: 150 kDa; β-Amilase de batata doce: 200 kDa; Azul Dextran: 2,000 kDa – Todos os padrões foram comprados do fabricante Sigma-Aldrich[®]).

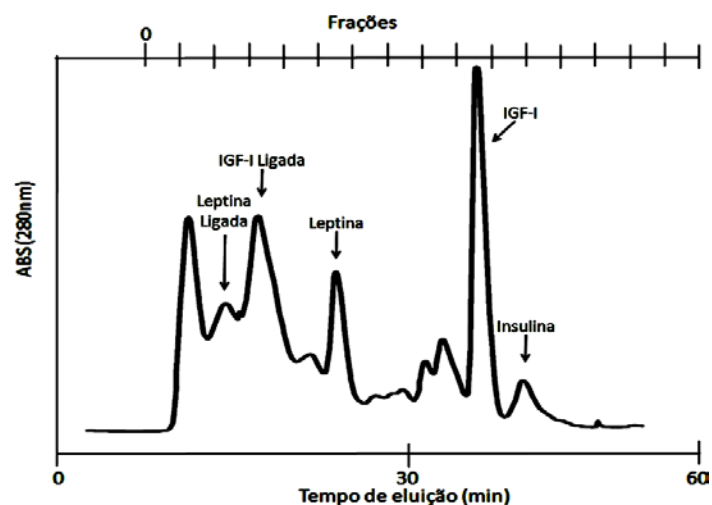


Figura 1: Representação gráfica do cromatograma de gel filtração (FPLC) do plasma seminal.

De acordo com a regressão logarítmica do valor do peso molecular das proteínas em função do tempo de retenção na coluna, foi realizado o cálculo aproximado do peso molecular das proteínas de cada pico, segundo a fórmula: $y = 3,31 - 6,66x + 4,46x^2$, $y = K_{av}$ (razão de diluição) e $x = \log$ do peso molecular.

As frações referentes aos pesos moleculares de cada hormônio (Insulina: 5,5kDa; Leptina livre: 16kDa, Leptina ligada: 250kDa, IGF-I livre: 7,5kDa e IGF-I ligado: 150kDa) foram separadas para posterior análise. Para o IGF-I e a leptina, as frações livres e as ligadas foram agrupadas em um mesmo tubo para que passassem pelo mesmo processo de análise, sendo que as frações correspondentes ao IGF-I passaram por extração ácido-alcoólica. Após a gel filtração, as amostras coletadas nos tubos de *ependorf* na saída do fluxo do FPLC que representavam cada pico, foram agrupadas por peso molecular em um tubo tipo *falcon* para serem liofilizadas. Após este procedimento as amostras foram mantidas a -20°C até o momento da análise.

As concentrações de IGF-I, insulina e leptina foram determinadas por radioimunoensaio. Foi utilizado o kit IRMA DSL-5600 Active[®] (Diagnostic Systems Laboratories, Texas/USA) para mensurar a concentração de IGF-I, o kit multi-espécie XL-85K[®] (LINCO Research, Missouri/USA) para leptina e o kit PI-12k[®] suína (LINCO Research, Missouri/USA) para determinação da insulina. Os controles de máximo e mínimo de todas as análises estiveram dentro da variação aceita pelos fabricantes, sendo que o coeficiente intra-ensaio para IGF-I foi de 21,36, enquanto os de leptina e insulina foram de 13,52 e 38,49, respectivamente.

2.2.1.1.1 Determinação das concentrações de IGF-I

Antes do ensaio radiométrico as amostras que estavam liofilizadas foram ressuspensas com água deionizada para o volume final de 100 μL . Para a determinação da concentração final foi feita a correção segundo o valor de diluição.

O procedimento radiométrico incluiu uma etapa de extração das amostras diluídas em solução ácida com etanol, onde o IGF-I foi

separado de sua proteína carreadora (IGFBP). Nesta etapa, 100µL das amostras foram pipetados em tubos tipo *falcon* e adicionados de 400 µL da solução de extração fornecida no kit e, então, agitadas em vórtex. Após este passo colocaram-se as amostras em centrífuga refrigerada a 5.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Sem agitar o precipitado, transferiram-se 100µL do sobrenadante límpido para o tubo de neutralização. Após este passo adicionaram-se 500µL da solução de neutralização ao segundo tubo (contendo o sobrenadante extraído). Este extrato da amostra neutralizado foi usado no ensaio.

Na segunda etapa do ensaio, 50µL das amostras-teste, controle e padrões foram transferidas para tubos teste de polipropileno e adicionadas de anti-IGF-I [I125]. Em seguida, as amostras foram incubadas durante três horas a 25°C em agitador ajustado para 180 rpm. Após a drenagem, os tubos permaneceram secando durante dois minutos. Em seguida foram submetidos a três enxágues com 3mL de água deionizada e, posteriormente, levados para a contagem da radiação em contador gama. Os resultados foram apresentados em ng/mL, segundo a contagem por minuto (CPM) obtida, após serem multiplicados pelo seu fator de diluição.

2.2.1.1.2 Determinação das concentrações de Leptina

As amostras liofilizadas de leptina foram ressuspendidas a 125µL com água deionizada momentos antes do ensaio. Para a determinação da concentração final foi feita a correção segundo o valor de diluição. O processo de análise da leptina envolveu três etapas. No primeiro dia de análise pipetaram-se 300µL do tampão de ensaio para determinação da ligação não específica nos tubos 3-4, 200µL para referência nos tubos 5-6 e 175µL nos tubos de número 7 até o final do ensaio. Pipetaram-se 100µL

do padrão e dos controles de qualidade em duplicata.

Em seguida, adicionaram-se 25µL das amostras em duplicata, com volume igual do anticorpo Leptina Multi-Espécie. Por meio de vórtex, homogeneizaram-se as amostras por um minuto após a adição do anticorpo; na sequência manteve-se o material incubado por todo período da noite a 4°C.

No segundo dia pipetaram-se 25µL de leptina humana [I125] em todos os tubos. Homogeneizaram-se as amostras por meio de vórtex, sendo incubadas por todo o período da noite a 4°C.

No terceiro dia, adicionou-se 1mL do reagente de precipitação em todos os tubos, exceto os tubos de contagem total (1-2). Após esta adição, misturou-se o material por meio de vórtex, sendo incubado por 20 minutos a 4°C. Em seguida todos os tubos, exceto os de contagem total, foram centrifugados por 20 minutos a 2.000g a 4°C. Os tubos foram aspirados retirando-se o sobrenadante e posto no leitor gama. Os resultados foram expressos em ng/mL, segundo a CPM obtida.

2.2.1.1.3 Determinação das concentrações de Insulina

As amostras de insulina liofilizadas foram ressuspendidas a 250µL com água deionizada antes do ensaio. Para a determinação da concentração final foi feita a correção segundo o valor de diluição.

O processo de análise da insulina envolveu duas etapas. No primeiro dia de análise pipetaram-se 300µL do tampão de ensaio para determinação da ligação não específica nos tubos 3-4, 200µL para a referência nos tubos 5-6 e 175µL nos tubos de número 7 até o final do ensaio. Pipetaram-se 100µL do padrão e dos controles de qualidade em duplicata. Após se pipetarem 25µL das

amostras em duplicata adicionaram-se 25µL de insulina [I125] em todos os tubos, realizando a mistura das amostras por meio de vórtex. Volume igual do anticorpo de insulina suína foi adicionado nas amostras que foram homogeneizadas por meio de vórtex por um minuto, com o material sendo incubado por todo o período da noite a 4°C.

No segundo dia adicionou-se 1mL do reagente de precipitação em todos os tubos, exceto os tubos de contagem total (1-2) e os de ligação não específica (3-4). Após esta adição, misturou-se o material por meio de vórtex e manteve-se incubado por 20 minutos a 4°C. Em seguida, todos os tubos, exceto os de contagem total, foram centrifugados por 20 minutos a 2.000g a 4°C. Posteriormente, os tubos foram aspirados retirando-se o sobrenadante e posto no leitor gama. Os resultados foram expressos em µU/mL, segundo a CPM obtida.

2.3 Análise Estatística

Após o ajuste dos dados de acordo com a idade em relação à puberdade (dias), no momento 0 (zero) foi realizada uma distribuição de frequência das idades dos 16 animais experimentais por meio do procedimento FREQ do SAS (2002). Adotou-se como ponto de separação dos grupos a mediana, 18 meses, das idades naquele período. Assim, animais com idades à puberdade menores do que a da mediana foram considerados precoces (**Prec**) e aqueles com idades superiores à mediana, foram considerados regulares (**Reg**).

Os valores de IGF-I, insulina e leptina foram submetidas aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e de assimetria e curtose, pelo procedimento UNIVARIATE com as opções NORMAL e PLOT do pacote estatístico SAS (2002). As variáveis IGF-I e insulina foram

transformadas logaritmicamente [$\log(x+1)$] para se ajustarem a curva normal (Sampaio, 2002).

O delineamento experimental adotado para análise das variáveis foi em blocos ao acaso em esquema de subparcelas com oito repetições. Os grupos constituíram as parcelas e as idades em que os animais foram avaliados, as subparcelas. As análises foram realizadas utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS segundo Littell, et al. (1998). O efeito de grupo foi obtido pelo teste F e os efeitos de idade foram estimados por meio de ajustamento de modelos de regressão linear e quadrática. As comparações entre as idades dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste SNK por meio do procedimento GLM do SAS (2002).

Os modelos de regressão das variáveis avaliadas em relação à idade à puberdade foram ajustados por meio do PROC REG do SAS (2002). Para os casos em que a interação entre grupo e idade foi significativa, ajustou-se um modelo de regressão para cada grupo. As correlações entre as variáveis paramétricas foram estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson por meio do PROC CORR e as associações entre as variáveis paramétricas e não-paramétricas pelo coeficiente de correlação de Spearman por meio do PROC CORR com a opção SPEARMAN do SAS (2002).

3. Resultados e Discussão

3.1 Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-I)

Os valores da concentração de IGF-I no plasma seminal dos animais estudados diferiram nos momentos do estágio de desenvolvimento sexual (-60 a +60) dentro de grupos ($p < 0,05$), mas não entre grupos (Tab. 1).

Tabela 1: Concentração de IGF-I no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais precoces (Prec) e regulares (Reg)

Estádio de Desenvolvimento Sexual (dias)	PRECOCES (ng/mL)	REGULARES (ng/mL)
-60	5,74 ^b ±7,21	66,45 ^b ±124,80
-30	101,98 ^{ab} ±125,85	106,87 ^{ab} ±94,34
0	220,19 ^{ab} ±328,32	436,82 ^a ±285,37
30	236,58 ^a ±163,38	183,61 ^{ab} ±225,31
60	379,99 ^a ±349,25	149,83 ^{ab} ±120,47

Letras distintas na mesma coluna diferem ($p < 0,05$) pelo teste SNK.

Assim, como houve efeito de idade, sem que fosse registrada interação com grupo, ajustou-se uma regressão representativa dos

valores de ambos os grupos, $y = 0,43 + 2,07x - 0,25x^2$ (Fig 2).

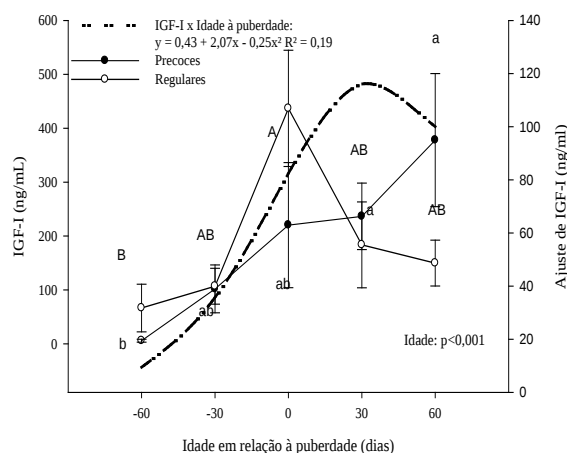


Figura 2: Concentração de IGF-I no plasma seminal de animais **Prec** e **Reg** durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão). Médias com letras minúsculas e maiúsculas distintas diferem entre as idades dentro dos grupos pelo teste SNK ($p < 0,05$).

O momento de acréscimo deste hormônio no plasma seminal ocorreu 30 dias antes nos animais **Reg**, no momento 0 do desenvolvimento sexual, frente aos animais **Prec**. Contudo, este valor é corrigido segundo o modelo de regressão ajustado para a idade. Como os animais não demonstraram diferença ($P > 0,05$) entre grupos, os dados foram agrupados para serem analisados conjuntamente (Tab. 2).

Tabela 2: Concentração de IGF-I no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual

Estádio de Desenvolvimento Sexual (dias)	Concentração de IGF-I (ng/mL)
-60	38,11 ^b ±93,77
-30	104,42 ^{ab} ±107,47
0	321,28 ^a ±318,29
30	208,33 ^a ±193,83
60	264,91 ^a ±278,97

Valores na mesma coluna acompanhados de letras diferentes diferem ($p < 0,05$) pelo teste de SNK.

A diferença no momento -60 da puberdade é representada por menor secreção de IGF-I (Fig. 3), sendo logo acompanhada por maior secreção à medida que se aproxima do momento 0 da puberdade.

Existem várias metodologias para se determinar o momento do início da puberdade em bovinos, entre as quais se destacam as que determinam a puberdade pelo tamanho mínimo das gônadas (Foot, 1969), as que determinam a puberdade pelo momento em que se encontra a primeira célula espermática no ejaculado (Castro et al., 1989) e as que consideram a puberdade como sendo o momento no qual o animal apresenta no mínimo 50×10^6 de espermatozoides no ejaculado com pelo

menos 10% de motilidade progressiva (Wolf et al., 1965).

Esta última metodologia foi utilizada no presente experimento, sendo sugerida como boa ferramenta para a determinação do momento do início da puberdade, frente às concentrações de IGF-I no momento 0 do desenvolvimento sexual (Fig. 3). Verificou-se que no momento 0 da puberdade ocorreu o pico de liberação de IGF-I no plasma seminal, podendo esta ocorrência ser reflexo de maior secreção de testosterona, uma vez que já é estabelecida (Spiteri-Greech e Nieschlag, 1993) a ligação deste fator de crescimento com as células de Leydig, favorecendo maior secreção deste hormônio.

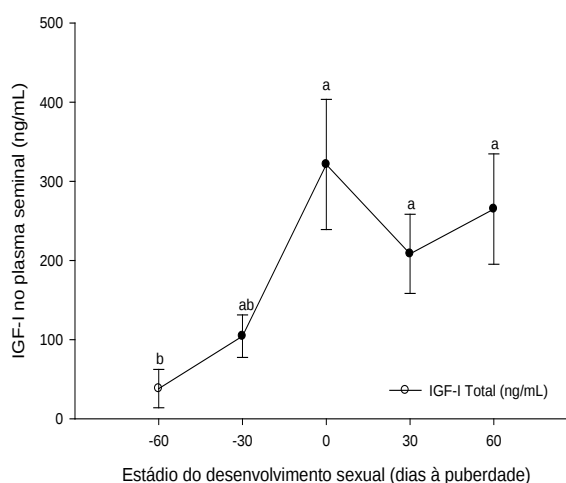


Figura 3: Concentração de IGF-I no plasma seminal de touros Gir-Leiteiro durante a peripuberdade (média±erro padrão). Letras distintas diferem pelo teste de SNK ($p < 0,05$).

Até 30 dias antes da puberdade as concentrações de IGF-I no plasma seminal foram baixas ($104,42 \pm 107,47$ ng/mL), considerando-se os demais momentos observados neste experimento (0, +30 e +60). Esses resultados são semelhantes aos apresentados por Henricks et al. (1998) e Souza (2004) que encontraram em touros taurinos de corte maturos, concentrações de $116,29 \pm 40,83$ e $132,3 \pm 15,8$ ng/mL, respectivamente. Hoeflich et al. (1999) encontraram concentração média de 144 ± 9 ng/mL, variando entre 79 e 238 ng/mL, em touros da raça Simental. Valor semelhante também foi encontrado em touros búfalos da raça Surti, $116,83 \pm 28,34$ ng/mL, variando de 41,4 a 198,95 (Selvarajua et al. 2009).

Esses valores são correspondentes aos encontrados no ejaculado de homens adultos que apresentam concentração média de $113,23 \pm 17,88$ ng/mL (Glander et al. 1996). Entretanto, deve-se ainda salientar que há diferença na concentração de IGF-I encontrada no plasma seminal de diferentes espécies. Segundo Lackey et al. (2002), cavalos e porcos apresentam concentrações plasmáticas seminais de IGF-I de 20 ± 2 ng/mL (variando de 15 a 25 ng/mL) e $17 \pm 1,15$ ng/mL (variando de 5 a 25 ng/mL), respectivamente. Esses valores representam até 18 vezes menos quando comparados com os resultados do presente estudo.

Todavia, deve-se observar que somente os valores obtidos no período da pré-puberdade, 30 dias antes do momento zero, foram os que se assemelharam aos encontrados em animais adultos. É conhecido que as concentrações séricas de IGF-I em touros, assim como em humanos, tendem a elevar-se desde o período infantil até a puberdade, sendo que a partir deste ponto a concentração diminui atingindo um platô e se estabilizando (Ronge e Blum, 1989).

Segundo estes últimos autores, isso se deve ao fato do IGF-I responder por parte do desenvolvimento do organismo animal frente aos estímulos do hormônio do crescimento (GH) durante esta fase. No entanto, não foram encontrados relatos que categorizassem a secreção de IGF-I no plasma seminal durante a pré-puberdade até a maturidade sexual, tanto em humanos quanto em animais. Normalmente, são encontrados relatos que envolvem a secreção de IGF-I no plasma seminal com as características espermiáticas em animais adultos, mas não durante a fase de desenvolvimento sexual.

Porém, é conhecido que o IGF-I está envolvido na diferenciação e função das células de Leydig, estimulando a esteroidogênese por aumentar a densidade de receptores para gonadotropinas (LH/GnRH) e a expressão de enzimas-chave na esteroidogênese nestas células, consequentemente, sendo apontado como importante fator na espermatogênese (Spiteri-Greech e Nieschlag, 1993).

As funções testiculares do IGF-I parecem ser resultantes da sua produção local, sem uma contribuição endócrina. Isto é demonstrado quando se compararam as concentrações séricas com a do plasma seminal, sendo que estas últimas podem alcançar concentrações até 10 vezes maiores que às séricas (Ronge e Blum, 1989). Isto sugere fortemente que o IGF-I testicular tem papel determinante no desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig e das células germinativas, e que a falta dessa substância nos testículos pode induzir a infertilidade (Gnessi et al., 1997), podendo, desta forma, ser utilizado como ferramenta para determinação da puberdade, em virtude da sua ação sobre as células de Leydig, favorecendo o desenvolvimento testicular com consequente aumento de testosterona e por retroalimentação negativa, controlando a secreção local do IGF-I (Fig.4).

No entanto, os valores nos momentos 0, +30 e +60 do desenvolvimento sexual (Tab.2) apresentaram concentrações acima destas relatadas pelos autores supracitados. Esta resposta diferenciada pode ser

atribuída à metodologia adotada para a purificação deste hormônio no plasma seminal, onde se buscou tanto a proteína na sua forma livre (7,5kDa) quanto ligada (150kDa).

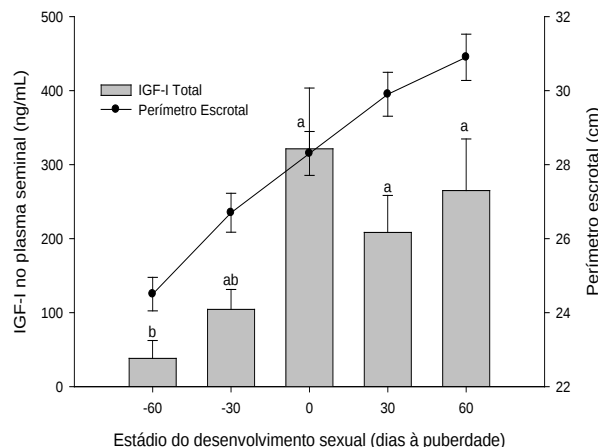


Figura 4: Concentração de IGF-I durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão). Letras distintas diferem pelo teste de SNK ($p<0,05$).

Os estudos que trabalharam com metodologias semelhantes, onde purificaram o IGF-I por meio de cromatografia, normalmente separavam somente a fração ligada para ser submetida à extração ácida-alcoólica. Desta forma, a diferença aqui observada entre os valores nos estádios do desenvolvimento sexual (Fig. 4) e os dados da literatura pode ser atribuída à metodologia utilizada.

Todavia, como não foi encontrado nenhum trabalho que tenha descrito as concentrações no plasma seminal de IGF-I para bovinos da raça Gir-Leiteiro, pode-se hipotetizar que esta raça apresenta padrões diferenciados frente às demais, necessitando, desta forma, de maiores investigações.

Há vários relatos (Glander et al., 1996; Henricks et al., 1998; Hess e Roser, 2001; MacPherson et al., 2002; Miao et al., 1998; Nakayama et al., 1999) que demonstraram correlação entre a concentração de IGF-I do

plasma seminal e as características espermáticas. Desta forma, determinou-se a correlação das concentrações de IGF-I no plasma seminal durante os cinco períodos de observação do desenvolvimento sexual (-60, -30, 0, +30 e +60) com os parâmetros espermáticos, como: motilidade, concentração, defeitos maiores, menores e totais, além do peso corporal e do desenvolvimento testicular nestes mesmos períodos (Tab. 3).

Os dados referentes aos padrões andrológicos foram apresentados por Martins (2010) (Tab. 4), ao trabalhar com os mesmos animais durante o mesmo período experimental. Desta forma, aqueles dados serão correlacionados com os novos dados gerados na sequência das análises experimentais do presente estudo.

Tabela 3: Correlação de Pearson entre a concentração de IGF-I no plasma seminal e a idade, peso corporal, perímetro escrotal, volume do ejaculado e concentração espermática

	Idade	Peso	PE	Vol	Conc
r =	0,39	0,39	0,40	0,10	0,42
p =	0,0003	0,0003	0,0003	0,037	0,0001

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1; PE: perímetro escrotal; Vol: volume do ejaculado; Conc: concentração espermática.

Tabela 4: Média e desvio padrão dos valores andrológicos de touros Gir-Leiteiro na peripuberdade (Martins, 2010)

Variável	Estádio do desenvolvimento sexual (dias à puberdade)				
	-60	-30	0	30	60
Idade (meses)	16,26±1,49	17,18±1,50	18,14±1,54	19,08±1,52	20,10±1,58
Perímetro Escrotal (cm)	24,53±1,81	26,74±2,10	28,25±2,37	29,87±2,11	30,91±2,50
Peso (Kg)	272,63±40,50	301,21±41,90	330,63±34,93	357,63±37,26	373,25±31,56
Volume do Ejaculado (mL)	3,71±2,07	4,97±2,21	5,29±3,00	5,15±2,79	5,07±1,64
Concentração Espermática(x10 ⁶)	3,83±3,52	4,70±4,23	80,70±71,83	141,02±168,45	154,69±195,17
Motilidade Espermática (%)	5,75±7,29	7,87±11,65	22,25±17,79	42,00±19,25	39,06±21,23
Vigor (1-5)	1,06±1,08	1,44±1,19	2,56±1,09	3,06±1,39	3,19±1,22
Defeitos Maiores (%)	65,20±16,00	75,30±14,08	55,50±24,94	33,20±28,51	12,69±10,33
Defeitos Menores (%)	11,97±6,63	11,30±7,17	12,25±10,08	14,07±14,75	11,88±11,30
Defeitos Totais (%)	77,2±16,59	86,60±11,94	67,75±22,29	47,30±26,89	24,56±17,18
Normais (%)	22,80±16,59	13,37±11,94	32,25±22,29	52,71±26,89	75,44±17,18

As concentrações de IGF-I no plasma seminal apresentaram correlações de média magnitude entre os parâmetros idade, peso corporal, perímetro escrotal e concentração espermática, enquanto baixa correlação com o volume do ejaculado (Tab. 3). Esses resultados estão de acordo com o exposto na literatura que indica o envolvimento deste hormônio tanto com o desenvolvimento corporal (Ronge e Blum, 1989) quanto com as células de Sertoli e Leydig (Gnessi et al., 1997), implicando o envolvimento deste hormônio na qualidade espermática. Contudo, não se pode aqui inferir que apenas este hormônio influencia na condição espermática, mas sim que o mesmo possa favorecê-la.

O número de células com defeitos maiores e totais apresentaram correlação de baixa magnitude, mas significativas ($p < 0,03$) com as concentrações de IGF-I (Tab. 5), o que demonstra o envolvimento do IGF-I na espermatogênese, uma vez que este hormônio não se correlacionou com os defeitos menores ($r = 0,06$), os quais são representativos da condição de maturação e não de desenvolvimento da célula espermática, corroborando a ideia do envolvimento deste hormônio com o desenvolvimento das células espermáticas.

Tabela 5: Correlações de Pearson e Spearman entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e os parâmetros espermáticos de touros Gir-Leiteiros

	Def. Maior*	Def. Menor*	Def. Totais*	Normais*	Motilidade**	Vigor**
r =	-0,28	0,06	-0,26	0,26	0,26	0,13
p =	0,021	0,598	0,032	0,032	0,02	0,288

Def.: Defeito; *Variáveis analisadas pela correlação de Pearson; ** Variáveis analisadas pela correlação de Spearman.

Como a correlação foi negativa com os defeitos espermáticos maiores e totais, demonstra-se uma ligação positiva deste hormônio com as células espermáticas, ou seja, quanto mais IGF-I existir no meio plasmático seminal, maior número de células espermáticas normais irá existir.

Henricks et al. (1998) demonstraram a presença do receptor de IGF-I sobre os espermatozóides e a habilidade deste hormônio, presente no plasma seminal, em estimular a motilidade espermática. Uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, da capacitação espermática e da exocitose acrossômica (Gupta, 2005).

Assim, o IGF-I pode atuar como fator quimiocinético na regulação do movimento das células espermáticas, como sugerido por Henricks et al. (1998). A motilidade e a velocidade dos espermatozóides refletem sua função mitocondrial indiretamente, o que fez com os pesquisadores relacionassem os parâmetros de movimentação com a fertilidade em touros. Desde que os receptores de IGF-I foram reportados sobre os espermatozóides, é concebível que o efeito do IGF-I para estimular a motilidade espermática possa ser atribuído ao efeito direto por meio dos seus receptores sobre estas células (Selvaraju et al., 2009).

No presente estudo, constatou-se correlação de baixa magnitude ($r=0,26$), mas

significativa ($p<0,02$), entre a concentração de IGF-I e a motilidade espermática. Talvez, não se tenha encontrado correlação de maior magnitude em decorrência da metodologia utilizada para avaliar a motilidade espermática, a qual foi realizada por avaliação subjetiva por meio de duplo cego (dois diferentes observadores sem o informe das avaliações prévias de cada um). Este tipo de avaliação pode ter mascarado as menores diferenças que pudessem ter existido.

Provavelmente, se equipamentos automatizados que hoje são utilizados para esta função tivessem sido utilizados, poder-se-ia esperar maior correlação. Mas, apesar de baixa, existe correlação o que sugere o que a literatura relata. Todavia, não houve correlação entre os valores de IGF-I e o vigor espermático.

O estudo de Martins (2010) (Tab. 6), que trabalhou com a purificação de proteínas com afinidade à heparina, constatou a presença de oito picos cromatográficos sob diferentes tempos de eluição frente às diferentes concentrações de NaCl utilizadas na fase móvel: P1 – 0M; P2 e P3 – 0,09M; P4 – 0,18M; P5 – 0,3M; P6 – 0,45M; P7 – 0,6M e P8 – 1,5M. A concentração deste sal na fase móvel determinou o grau de afinidade da proteína à heparina.

Assim, quanto maior quantidade de sal na solução necessária para desfazer a ligação entre a proteína e a matriz da coluna, maior o grau de afinidade. Com isto, as proteínas no estudo de Martins (2010) foram agrupadas na ordem crescente, proteínas

sem afinidade (P1) para a de maior afinidade (P8) (Tab. 6). Este autor encontrou correlações significativas entre os picos cromatográficos e os parâmetros ponderais e reprodutivos avaliados, com destaque aos picos de maior afinidade, em especial, o pico 7 (P7). Este pico apresentou as maiores correlações positivas com o perímetro escrotal, a motilidade e a concentração espermática, além de ser o

único correlacionado com o vigor espermático.

Desta forma, foi proposta a correlação destes picos cromatográficos com as concentrações plasmáticas seminais do IGF-I, uma vez que este hormônio correlacionou-se com os principais parâmetros espermáticos (Tab. 7).

Tabela 6: Média e desvio padrão da concentração dos picos protéicos com afinidade à heparina apresentados por Martins (2010)

Variável	Estádio do desenvolvimento sexual (dias à puberdade)				
	-60	-30	0	30	60
Proteína total	14,01±10,29	13,13±8,90	25,22±22,55	33,38±27,77	33,42±13,80
Pico com afinidade a heparina 1	7,76±3,99	7,14±3,80	8,11±5,45	10,68±5,74	11,52±3,70
Pico com afinidade a heparina 2	0,6±0,42	0,57±0,54	0,60±0,49	0,96±0,97	1,08±0,94
Pico com afinidade a heparina 3	2,03±3,13	2,16±2,92	5,41±6,27	6,75±6,38	5,94±3,37
Pico com afinidade a heparina 4	2,06±2,75	2,15±1,67	3,90±4,29	6,06±7,40	5,97±3,96
Pico com afinidade a heparina 5	1,21±1,61	01,16±1,39	3,93±4,76	5,69±6,82	4,91±2,55
Pico com afinidade a heparina 6	0,5±0,67	0,41±0,57	2,34±3,10	2,40±2,40	2,38±1,64
Pico com afinidade a heparina 7	0,2±0,36	0,13±0,21	0,68±0,92	1,27±1,69	1,17±0,98
Pico com afinidade a heparina 8	0,10±0,12	0,09±0,09	0,28±0,33	0,42±0,74	0,44±0,45

As concentrações de IGF-I no plasma seminal tiveram correlações de média magnitude para a concentração de proteína total e os picos 3, 4, 5, 6 e 7, apresentando correlação de média-alta magnitude com o pico 8 ($r=0,54$; $p<0,0001$) e baixa

correlação com o pico 1 ($r=0,25$; $p<0,03$), não se registrando correlação com o pico 2, demonstrando com esses resultados a ligação do IGF-I com as proteínas com afinidade à heparina (Tab. 7).

Tabela 7: Correlação de Pearson e Spearman entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e os picos protéicos com afinidade à heparina (Martins, 2010)

	Prot. Total	P1*	P2*	P3**	P4*	P5*	P6*	P7**	P8**
r =	0,37	0,25	0,08	0,41	0,41	0,45	0,41	0,50	0,54
p =	0,001	0,03	0,49	0,0004	0,0003	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001

*Variáveis analisadas pela correlação de Pearson; **Variáveis analisadas pela correlação de Spearman; Prot: proteína; P1-P8: pico com afinidade à heparina (de um a oito).

Sánchez-Luengo et al. (2005) demonstraram que o IGF-I participa dos processos de capacitação, passo no qual o espermatozóide torna-se “competente para a fecundação” por meio de uma série de mudanças fisiológicas, como mudança de: íons intracelular, fluidez da membrana plasmática, metabolismo e motilidade. Resultados semelhantes a estes foram demonstrados no presente estudo por meio da correlação que este hormônio apresentou com as proteínas com afinidade à heparina, uma vez que estas podem atuar neste processo espermático.

Segundo Martins (2010), todos os picos correlacionaram-se com os padrões reprodutivos estudados (idade, PE, peso vivo, motilidade espermática, defeitos maiores, menores e totais, volume e concentração espermática). Contudo, dentre todos os picos avaliados, observou-se que os de número 5, 6 e, especialmente, o 7 apresentaram as maiores correlações com estes parâmetros.

Deve-se salientar que estes picos, juntamente com o pico 8, são os que apresentaram maior afinidade à heparina, de acordo com seu grau de dissociação da coluna de afinidade. Isto ratifica as ideias levantadas por Desnoyers e Manjunath (1994) e Henricks et al. (1998) que associaram o IGF-I à capacitação e à motilidade espermática.

Marks e Ax (1985), ao utilizarem touros holandeses com no mínimo 2.000 serviços por animal e que apresentavam índices de não retorno do estro entre os 59 e 90 dias, concluíram que a ligação da heparina marcada aos espermatozóides está relacionada aos índices de não retorno do cio, podendo ser um teste adequado para se prever a fertilidade de touros.

Assim, uma vez que este GAG correlaciona-se com o índice de fertilidade de touros, se pode, de forma indireta,

relacionar o IGF-I encontrado no plasma seminal com este índice, frente à correlação apresentada entre este hormônio e as proteínas com afinidade à heparina, principalmente, por ser observada maior correlação com os picos de maior afinidade (P5, P6, P7 e P8). Contudo, mais estudos são necessários para que se possa avaliar esta proposta.

Complementando os estudos realizados com os picos protéicos de afinidade à heparina, foi proposta a correlação das concentrações de IGF-I no plasma seminal com a densidade óptica das bandas protéicas encontradas no presente estudo e apresentadas no capítulo dois desta tese. Segundo Desnoyers e Manjunath (1994) e Henricks et al. (1998) o IGF-I no plasma seminal pode ter função regulatória no pré- e pós-ejaculado afetando a capacitação e a motilidade espermática, em função da ligação de certas proteínas contidas no plasma seminal (BSP-A1, -A2, -A3 e -30kDa) a este fator de crescimento (Desnoyers e Manjunath, 1994). As IGFBPs, juntamente com as proteínas BSPs, podem servir como moduladores do IGF-I no plasma seminal bovino (Henricks et al., 1998).

Registraram-se correlações negativas e de média-alta magnitude entre as concentrações de IGF-I e as proteínas de peso molecular de 55, 47 e 33kDa (Tab. 8), o que demonstra ligação inversa entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e estas proteínas (Fig. 5). Estas bandas protéicas tiveram correlação negativa com as variáveis: peso corporal, PE, idade, motilidade espermática e com os picos de afinidade à heparina, como apresentado no capítulo dois deste estudo.

Assim, uma vez que a concentração de IGF-I no plasma seminal tem sido proposta como fator positivo da qualidade seminal, essa correlação negativa, juntamente com os outros dados abordados destas proteínas,

podem indicar que as mesmas servem como indicadores negativas da qualidade seminal.

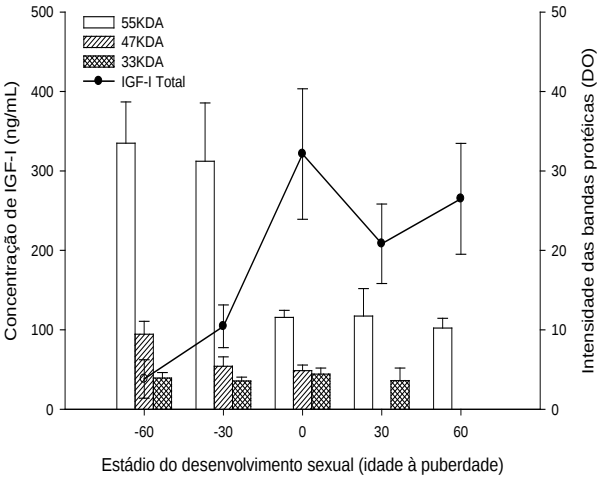


Figura 5: Concentração de IGF-I e a intensidade das bandas de 55, 47 e 33kDa durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).

Tabela 8: Correlação de Pearson e Spearman entre as concentrações de IGF-I no plasma seminal e a densidade óptica das bandas proteicas em gel SDS-PAGE

	55kDa	47kDa	33kDa	27kDa*	22kDa	13,9kDa	11kDa	6,9kDa
r =	-0,33	-0,63	-0,40	0,37	0,29	0,31	0,29	0,41
p =	0,01	0,003	0,04	0,04	0,04	0,02	0,04	0,01

*Variáveis analisadas pela correlação de Spearman.

As bandas proteicas de peso molecular de 27, 22, 13,9, 11 e 6,9kDa apresentaram correlação positiva com as concentrações de IGF-I no plasma seminal. Apresentaram ainda correlação positiva com os principais parâmetros espermáticos, o que demonstra a ligação do IGF-I com a boa qualidade seminal. As demais bandas proteicas não apresentaram correlação com a concentração de IGF-I durante o desenvolvimento sexual.

3.2 Insulina

Os valores da concentração de insulina no plasma seminal (Tabela 9) não diferiram ($p>0,05$) entre os estádios de desenvolvimento sexual (-60 a +60) e nem entre grupos (**Prec** e **Reg**; $p>0,05$).

Tabela 9: Concentração de insulina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais precoces e regulares

Estádio de Desenvolvimento Sexual (dias)	PRECOSES ($\mu\text{U/mL}$)	REGULARES ($\mu\text{U/mL}$)
-60	36,04 $\pm$ 21,45	34,16 $\pm$ 12,34
-30	42,75 $\pm$ 31,09	30,45 $\pm$ 20,47
0	26,55 $\pm$ 11,90	38,99 $\pm$ 27,90
30	42,31 $\pm$ 34,42	32,14 $\pm$ 22,13
60	28,28 $\pm$ 12,38	36,19 $\pm$ 21,17

Valores na mesma coluna e na mesma linha não diferem ($p < 0,05$) pelo teste F.

Apesar de não ter sido observada diferença ($p > 0,05$) entre os grupos e entre os estádios de desenvolvimento sexual dentro de cada grupo, os animais **Prec** demonstraram ter modulação diferente na secreção de insulina no plasma seminal quando comparados aos

animais **Reg** (Fig. 6). Os momentos em que os animais **Prec** demonstraram ter maior concentração de insulina foram coincidentes com as menores concentrações deste hormônio nos animais **Reg**.

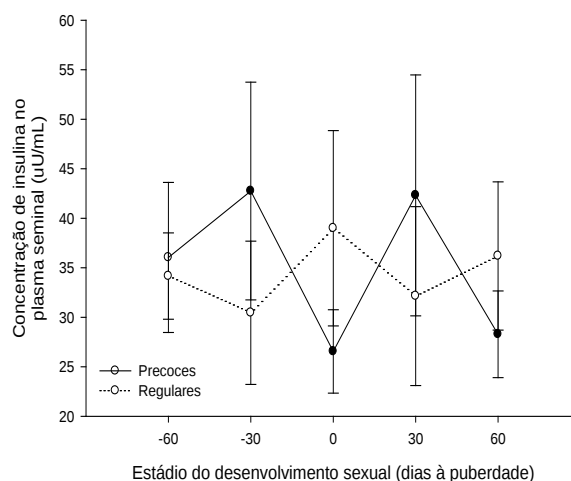


Figura 6: Concentração de insulina no plasma seminal de animais **Prec** e **Reg** durante o desenvolvimento sexual (média $\pm$ erro padrão).

Assim, por não haver diferença ($p > 0,05$) entre os grupos e entre os estádios de desenvolvimento sexual dentro de cada grupo os dados foram agrupados e analisados conjuntamente (Tab. 10).

Tabela 10: Concentração de insulina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual

Estádio de Desenvolvimento Sexual (dias)	Concentração de Insulina ($\mu\text{U/mL}$)
-60	35,15 $\pm$ 16,93
-30	36,60 $\pm$ 26,21
0	26,82 $\pm$ 09,81
30	43,56 $\pm$ 31,71
60	32,24 $\pm$ 16,71

Valores na mesma coluna não diferem ($p < 0,05$) pelo teste F.

Não foram encontrados relatos na literatura referentes às concentrações de insulina no plasma seminal de bovinos. No entanto, Póvoa Jr. et al. (1973) ao trabalharem com homens normospérmicos encontraram concentrações de $45,8 \pm 15,1 \mu\text{U/mL}$ no plasma seminal. Neste mesmo ano, Hicks et al. que trabalharam com homens não diabéticos encontraram concentração plasmática seminal menor ($19 \pm 3 \mu\text{U/mL}$) que as encontradas por Póvoa Jr. et al. (1973).

Alguns autores (Hicks et al., 1973), trabalhando com homens, relataram que a concentração plasmática seminal de insulina pode chegar até duas vezes a concentração sérica em humanos ($7,5 \pm 1,5$). Em bovinos, maior concentração de insulina também é verificada no plasma seminal frente à concentração sérica deste hormônio $34,56 \pm 22,01 \mu\text{U/mL}$ (dados do presente estudo) e $10,9 \pm 1,0 \mu\text{U/mL}$ relatados por Delavaud et al. (2002), respectivamente. Contudo, estes resultados devem ser analisados com cuidado, uma vez que não foi determinada a concentração sérica deste hormônio nos animais em estudo.

Na figura 7, pode ser observada uma modulação na concentração de insulina presente no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual. Esta modulação coincide com a variação da concentração de IGF-I no plasma seminal durante o mesmo período. Isto indica uma provável

retroalimentação negativa entre estes dois hormônios.

De forma sistêmica, a insulina conjuntamente com o hormônio do crescimento (GH) favorece a secreção de IGF-I pelas células hepáticas. Contudo, em um determinado ponto, o aumento da secreção de insulina, por retroalimentação negativa, diminui a secreção do GH, que consequentemente diminui a secreção de IGF-I hepático (Fortune, 2003). Apesar deste caminho de alça longa não ter sido efetivamente constatado quanto sua influência na secreção deste hormônio no plasma seminal, pode-se utilizá-lo como alternativa para explicar a modulação encontrada no presente estudo.

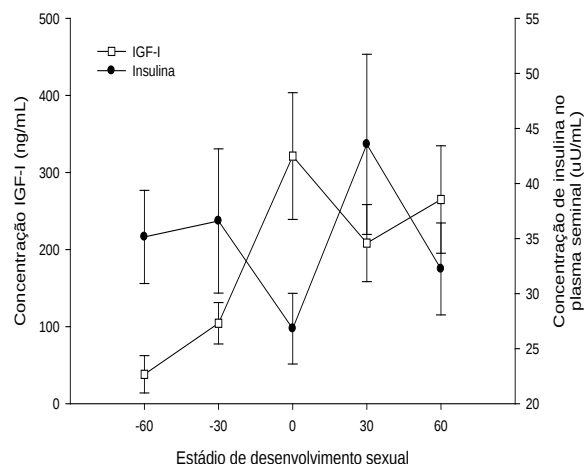


Figura 7: Concentração de insulina e IGF-I no plasma seminal de touros Gir-Leiteiro durante o desenvolvimento sexual (média±erro padrão).

Foi reportado que tanto a insulina quanto o IGF-I, promovem a diferenciação das espermatogônias em espermátocitos primários pela ligação com os receptores de IGF-I, sendo que ambas, membrana plasmática e acrossomal, representam alvos citológicos para a mesma (Nakayama et al., 1999). A insulina também é essencial para a movimentação da glicose através da membrana plasmática, induzindo o aumento do número de proteínas transportadoras específicas (Cunningham, 1997), auxiliando, desta forma, na motilidade espermática.

Assim, embasados por estes relatos, se objetivou a determinação da correlação das concentrações plasmáticas seminais da insulina com seus parâmetros andrológicos e com as concentrações plasmáticas seminais de IGF-I.

As concentrações de insulina no plasma seminal não se correlacionaram com as características avaliadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Garcia-Diez et al. (1991) que ao trabalhar com dois grupos de homens, normoglicêmicos e diabéticos, constataram maior concentração de insulina no plasma seminal, frente aos

valores séricos, de todos os grupos estudados, mas sem nenhuma correlação entre esses valores e os parâmetros espermáticos.

Contudo, Baccetti et al. (2002), ao trabalharem com homens diabéticos, demonstraram por meio da microscopia eletrônica de transmissão, que as células espermáticas deste grupo apresentavam graves defeitos estruturais, em comparação com as células espermáticas do grupo controle (normoglicêmico).

Estes mesmos autores relataram a possibilidade dos distúrbios reprodutivos reconhecidos em homens com diabetes Mellitus serem oriundos da interferência da doença sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em vários níveis, como indicado pelas características anormais das células espermáticas no ejaculado.

Desta forma, por não ter sido constatado diferença estatística ($p > 0,05$) entre grupos de animais e entre os períodos de desenvolvimento sexual destes mesmos grupos separaram-se os animais por concentração de defeitos maiores (G1: $>20\%$ e G2: $<20\%$), buscando confirmar o

que foi apresentado por Baccetti et al. (2002).

Houve diferença ($p < 0,05$) na concentração de insulina no plasma seminal entre os

grupos de animais com baixa concentração de defeitos maiores ($40,01 \pm 25,37 \mu\text{U/mL}$) e os que apresentaram elevadas concentrações destes defeitos espermáticos ($31,08 \pm 18,58 \mu\text{U/mL}$) (Fig. 8).

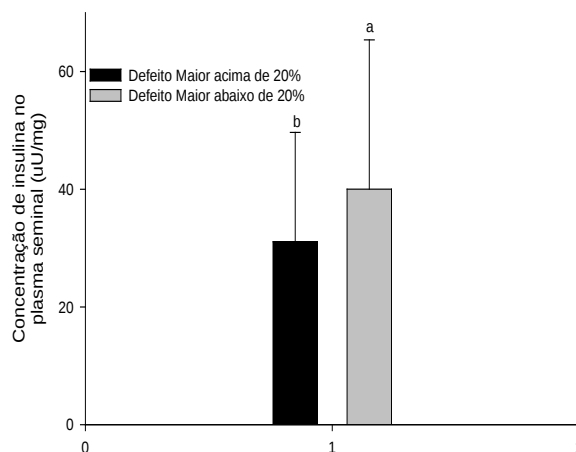


Figura 8: Concentração de insulina no plasma seminal de animais com concentração de defeito maior acima (G1) e a baixo (G2) de 20% (média±erro padrão). Letras distintas nas colunas diferem pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Apesar de não ter sido utilizada metodologia mais precisa como microscopia eletrônica, para que se pudesse identificar partes ultra-estruturais não captadas pela microscopia óptica em contraste de fase, os dados registrados corroboram os encontrados por Baccetti et al. (2002), e demonstram a importância deste hormônio na condição estrutural da célula espermática.

Apesar de neste estudo não ter sido observada correlação entre as concentrações plasmáticas seminais de insulina e os parâmetros espermáticos avaliados, a literatura cita que as mudanças na liberação deste hormônio no meio contendo células espermáticas são relacionadas às diferentes condições fisiológicas, como na mudança da condição de não capacitado para capacitado (Andò e Aquila, 2005).

Aquila et al. (2005) determinaram que a secreção de insulina a partir dos espermatozoides no meio de capacitação ocorre imediatamente, ao momento zero, sugerindo um possível envolvimento da insulina na indução deste processo.

Em razão do envolvimento deste hormônio com a capacitação espermática, segundo os dados de Aquila et al. (2005), foi determinada a correlação entre a concentração de insulina no plasma seminal e os picos protéicos com afinidade à heparina, visto a potencial ação que este GAG possui no processo de capacitação.

Apesar da constatação literária de que a insulina (Aquila et al., 2005) e a heparina (Miller et al., 1990) possuam ação no processo de capacitação, não foi encontrada nenhuma correlação entre este hormônio e

os picos de afinidade à heparina (Martins, 2010).

Buscou-se também determinar o envolvimento da insulina no plasma seminal e as proteínas presentes no mesmo, por meio da correlação entre estas variáveis. A intensidade das bandas protéicas correlacionadas foi determinada segundo o capítulo dois desta tese.

O plasma seminal dos touros Gir-Leiteiros demonstrou durante o período de análise 37 bandas distintas, variando entre animais e entre idades. Destas 37 bandas, as de peso molecular de 85 ($r=0,41$; $p=0,04$) e 46kDa ($r=0,54$; $p=0,02$) apresentaram correlação positiva, enquanto a de peso molecular de

112kDa ($r=-0,26$; $p=0,05$), negativa com a concentração de insulina no plasma seminal. Isto indica que certas proteínas podem ter ponto de regulação, positivo ou negativo, semelhantes aos da insulina. Contudo, maiores pesquisas são requeridas para se determinar a ligação entre este hormônio e tais bandas protéicas.

3.3 Leptina

Os valores da concentração de leptina no plasma seminal (Tabela 11) não diferiram ($p>0,05$) nem entre os estádios de desenvolvimento sexual (-60 a +60), nem entre grupos (**Prec** e **Reg**; $p>0,05$).

Tabela 11: Concentração de leptina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais precoces e regulares

Estádio de Desenvolvimento Sexual (dias)	PRECOSES (ng/mL)	REGULARES (ng/mL)
-60	26,39±13,11	20,01±6,19
-30	24,69±10,73	24,02±8,64
0	21,25±8,82	27,01±8,46
30	24,07±9,43	23,54±9,30
60	21,31±4,96	28,68±14,96

Valores na mesma coluna e na mesma linha não diferem ($p<0,05$) pelo teste F.

Assim, devido não ter ocorrido diferença estatística entre os grupos (**Prec** e **Reg**) e entre os estádios de desenvolvimento sexual

(-60 a +60) dentro de grupos, procedeu-se o agrupamento dos dados para análise (Tab. 12).

Tabela 12: Concentração de leptina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual

Estádio de Desenvolvimento Sexual (dias)	Concentração de Leptina (ng/mL)
-60	23,19±10,43
-30	24,35±9,42
0	22,41±9,90
30	23,76±9,69
60	24,99±11,42

Valores na mesma coluna e na mesma linha não diferem ($p<0,05$) pelo teste SNK.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham mensurado a concentração de leptina no plasma seminal de bovinos. Entretanto, Nikbakh et al. (2010) encontraram RNAm para receptores deste hormônio nas células espermáticas de touros. Estes autores sugeriram que a presença de tais receptores nestas células indica um papel fisiológico deste hormônio nas mesmas, assim como já constatado em humanos e suínos (Aquila et al., 2005; Aquila, et al., 2008).

Lackey et al. (2002), ao trabalharem com plasma seminal de humanos e suínos, encontraram concentrações de leptina, respectivamente, de $0,86 \pm 0,04$ e $10,88 \pm 0,84$ ng/mL, valores estes abaixo dos relatados nos animais do presente experimento ($23,76 \pm 9,97$ ng/mL).

von Sobbe et al. (2003), ao trabalharem com humanos, também registraram correlação entre as concentrações seminais e séricas de leptina. No entanto, em bovinos não foram encontrados relatos que tenham encontrado essa correlação. Entretanto, poderia se esperar que animais que tenham maior concentração sérica de leptina, também a tenham em maior concentração no plasma seminal. No entanto, quando se analisam os dados referentes à concentração sérica de leptina em bovinos encontram-se relatos de baixas concentrações como os registrados por Sansinanea et al. (2001) que, ao trabalharem com machos bovinos da raça Holandesa, castrados, encontraram concentração sérica média de leptina de $6,05 \pm 0,19$ ng/mL.

Parte da resposta, aqui apresentada, pode ser oriunda do tipo de kit utilizado para determinação deste hormônio. Delavaud et al. (2002) encontraram, para bovinos, que o kit multi-espécie para leptina determinou concentrações séricas, pelo menos, 50% abaixo daquelas encontradas quando se utilizou o kit para a espécie ovina, valores,

respectivamente de $2,4 \pm 0,2$ ng/mL e $5,9 \pm 0,4$ ng/mL.

Todavia, por não ter sido encontrado nenhum relato que tenha realizado a mensuração deste hormônio no plasma seminal de bovinos, não se compararam os valores séricos e plasmáticos seminais. Impossibilitando, desta forma, inferir se a maior concentração de leptina encontrada no presente estudo, comparada às concentrações em humanos e suínos, seja proveniente dos animais em estudo ou da metodologia aplicada.

No presente estudo, purificaram-se as proteínas com peso molecular aparente de 16kDa e 250kDa que são referentes a leptina livre e ligada, respectivamente, por meio de gel filtração em cromatógrafo de rápido desempenho antes das análises radiométricas o que pode explicar as respostas obtidas no presente estudo. Contudo, como não há relatos da concentração de leptina no plasma seminal de touros da raça Gir-Leiteiro, novas pesquisas devem ser realizadas para avaliar se a resposta é oriunda da raça ou da metodologia empregada.

Apesar de não haver diferença entre os estádios de desenvolvimento pode-se observar certa modulação da concentração da leptina dentro dos períodos (-60 a +60) (Fig. 9).

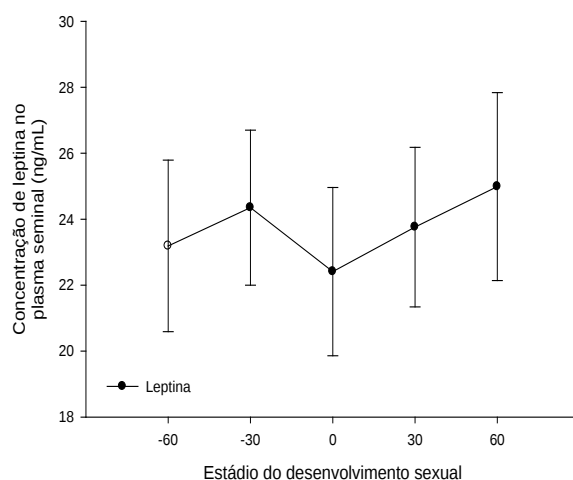


Figura 9: Concentração de leptina no plasma seminal de touros Gir-Leiteiro durante peripuberdade (médio±erro padrão).

Essa modulação na concentração de leptina dentro dos estádios de desenvolvimento

sexual foi acompanhada, inicialmente, pelas concentrações de insulina (Fig. 10).

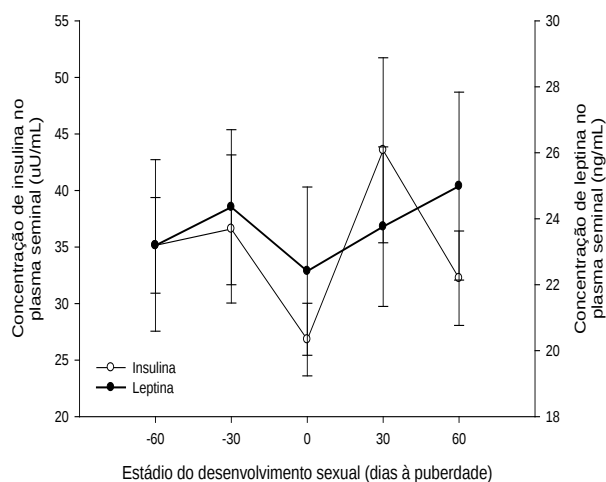


Figura 10: Concentrações de leptina e insulina no plasma seminal de touros Gir-Leiteiros durante o desenvolvimento sexual (médio±erro padrão).

Segundo Patel et al. (1998) há uma dependência da leptina pela insulina, ou seja, a ausência de insulina inibe a síntese de leptina, como evidenciado pela baixa concentração de leptina em ratos diabéticos induzido pela estreptozotocina, enquanto a

reposição de insulina resultou na restauração das concentrações de leptina.

Nos últimos anos, foi fortemente sugerido que a leptina seria capaz de agir em diferentes níveis do eixo hipotalâmico-

hipofisário-testicular, além da própria célula espermática (Nikbakh et al., 2010), e influenciar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da motilidade dos espermatozoides (Jorsaraei et al. 2008). Desta forma, estimou-se a correlação da leptina com os parâmetros espermáticos dos animais em estudo, juntamente com os valores de insulina e IGF-I, para se determinar a influência deste hormônio na qualidade seminal.

Nenhuma das características avaliadas apresentou correlação com a concentração de leptina no plasma seminal ($p > 0,05$). Contudo, a concentração de insulina apresentou correlação de baixa magnitude ($r = 0,21$) com a concentração de leptina no plasma seminal a uma significância de 6%, corroborando com a modulação destes dois

hormônios dentro dos estádios de desenvolvimento sexual (Fig.10). Segundo o estudo de Patel et al. (1998), isto pode sugerir uma provável dependência entre estes hormônios.

Contudo, essa afirmação deve ser analisada e interpretada com cautela, dada a baixa magnitude da correlação ($r = 0,21$) e o seu nível de significância (6%).

Por não ter sido registrada diferença estatística entre grupos e estádios de desenvolvimento sexual agruparam-se os animais segundo a quantidade de defeitos maiores, ficando classificados como G1 (concentração de defeitos maiores $>20\%$) e G2 (concentração de defeitos maiores $<20\%$) (Fig. 11).

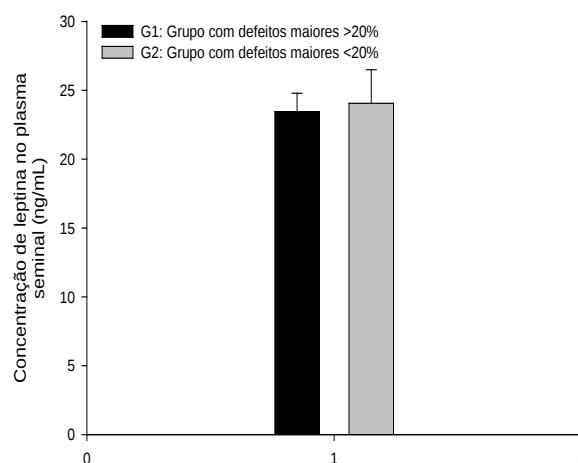


Figura 11: Concentração de leptina no plasma seminal segundo a concentração de defeitos maiores. G1: $>20\%$ e G2: $<20\%$. (média $\pm$ erro padrão).

O grupo G2, menor concentração de defeitos maiores, apresentou semelhante ao grupo G1 concentração de leptina no plasma seminal. Diferentemente dos dados aqui apresentados, Glander et al. (2002), ao trabalharem com homens como modelo de estudo, relataram que os níveis de leptina no plasma seminal foram, significativamente, menores nos pacientes

com os parâmetros de espermograma normal, comparado com as amostras de sêmen patológico, e mostrou uma correlação negativa com a motilidade dos espermatozoides humanos, sugerindo que a maior concentração de leptina tem efeitos negativos sobre a função espermática.

Provavelmente, a baixa especificidade do kit multi-espécie para determinação da concentração de leptina em bovinos não tenha permitido obter tal resposta. Todavia, mesmo que houvesse diferença, essa seria contraditória aos achados de Glander et al. (2002), pois aqui os animais com menor quantidade de defeitos maiores apresentaram maior concentração de leptina no plasma seminal.

Desta forma, apesar destes efeitos negativos, segundo Glander et al. (2002), sobre as células espermáticas, deve-se salientar os dados de Andô e Aquila (2005) que relataram que a leptina possui efeitos

positivos, juntamente com a insulina, nos processos metabólicos do espermatozóide, favorecendo tanto a capacitação quanto a motilidade espermática. Essa resposta pode, indiretamente, contrapor os relatos de Glander et al. (2002) quanto ao efeito da leptina na estrutura da célula espermática.

Assim, frente a essas observações, estimou-se a correlação entre os valores plasmáticos seminais de leptina e os picos protéicos com afinidade à heparina, uma vez que estes últimos possuem ação reconhecida nas funções de motilidade e capacitação espermática (Tab. 13).

Tabela 13: Correlação de Pearson e Spearman entre as concentrações de leptina no plasma seminal e os picos protéicos com afinidade à heparina

	Prot. Total	P1*	P2*	P3**	P4*	P5*	P6*	P7**	P8**
r =	...	...	...	...	...	...	...	...	0,24
p =	...	...	...	...	...	...	...	...	0,04

*Variáveis analisadas pela correlação de Pearson; **Variáveis analisadas pela correlação de Spearman; Prot: proteína; P1-P8: pico com afinidade à heparina de um a oito.

A concentração de leptina no plasma seminal durante o desenvolvimento sexual dos animais (-60 a +60) só apresentou correlação significativa e de baixa magnitude com o pico 8 das proteínas com afinidade à heparina ($r=0,24$) (Tab. 13). Este pico, segundo estudo de Martins (2010), representou o pico com maior afinidade a este GAG, sendo eluído na coluna de afinidade sob concentração de 1,5M de NaCl.

Neste mesmo estudo, Martins (2010) obteve correlação positiva deste pico protéico com a idade ($r=0,42$; $p<0,01$), com o perímetro escrotal ($r=0,38$; $p<0,01$), com o peso vivo ($r=0,52$; $p<0,0001$), com a motilidade espermática ($r=0,36$; $p<0,01$), com a concentração espermática ($r=0,53$; $p<0,0001$) e com o concentração de células normais no ejaculado ($r=0,58$; $p<0,0001$). Obteve também correlação negativa com a

concentração de células com defeitos maiores ($r=0,54$; $p<0,0001$) e defeitos totais ($r=0,58$; $p<0,0001$).

Tais resultados sugerem uma provável ligação entre a leptina e os fatores capacitantes no plasma seminal, frente ao perfil de afinidade à heparina que apresenta o pico 8 do estudo de Martins (2010). No entanto, essa hipótese precisa ser melhor estudada para se confirmar tal suposição.

Além dessas variáveis, correlacionou-se a concentração de leptina no plasma seminal com a intensidade das bandas protéicas presentes no ejaculado, segundo o capítulo dois desta tese. Das 37 bandas presentes, identificadas por SDS-PAGE, apenas três (peso molecular de 41, 33 e 14kDa) apresentaram correlação com a leptina. As bandas de 33 ($-0,39$; $p=0,04$) e 14kDa ($-0,46$; $p=0,05$) apresentaram

correlação negativa, enquanto a de peso molecular de 41kDa (0,48; $p=0,03$), correlação positiva. Contudo, essas bandas não apresentaram correlação com os parâmetros espermáticos e nem com o desenvolvimento ponderal. Desta forma, os dados aqui apresentados para leptina, ficaram sem uma maior ligação com os parâmetros espermáticos, salvo a sua correlação com o pico 8 de afinidade à heparina.

4. Conclusão

1. Insulina no plasma seminal mostrou certa interferência na qualidade estrutural da célula espermática, tendo maior concentração nos animais com menor número de células espermáticas com defeito maior;

2. As concentrações de leptina no plasma seminal não diferiram entre grupos ou idades e não apresentaram correlação com as variáveis analisadas;

3. Os valores de IGF-I no plasma seminal não diferiram entre grupos. Mas, apresentaram efeito do estágio de desenvolvimento sexual, tendo correlação com os padrões espermáticos e protéicos do plasma seminal.

Referências Bibliográficas

ANDÒ, S.; AQUILA, S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.245, n.1-2, p.1-6, 2005.

AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E.; et al. Autocrine Regulation of Insulin Secretion in Human Ejaculated Spermatozoa. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.552-557, 2005.

AQUILA, S.; RAGO, V.; GUIDO, C.; et al. Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa: evidence of their involvement in sperm capacitation and survival. **Reproduction**, v.136, n.1, p. 23-32, 2008.

BACCETTI, B.; la MARCA, A.; PIOMBONI, P.; et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human of Reproduction**, v.17, n.10, p. 2673-2677, 2002.

CALVETE, J.J.; MANN, K.; SANZ, L.; et al. The Primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. **FEBS Letters**, v.399, n.1-2, p.147-152, 1996.

CASTRO, V.M.; VALE FILHO, V.R.; REIS, S.R.; et al. Puberdade e início de maturação sexual em touros Nelore, de 10-14 meses de idade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. v. 1, p 183, 1989.

CUNNINGHAM, D.V.M. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

DELAVAUD, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; et al. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **Journal of Animal Science**, v.80, n.5, p.1317-1328, 2002.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal fluid bind to insulin-like growth factor-II. **Journal of Biology and Chemistry**, v.269, n.8, p.5776-5780, 1994.

FOOT, R.H. Physiological aspect of artificial insemination. In: COLE, H.H. and CUPPS, P. **Reproduction in Domestic**

Animals. 2nd. New York: Academic Press, 1969.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p.135-163, 2003.

GARCIA-DIEZ, L.C.; CORRALES HERNANDEZ, J.J.; HERNANDEZ-DIAZ, J.; et al. Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. **Archive of Andrology**, v.26, n.2, p.119-128, 1991. (Abstract)

GLANDER H. J.; KRATZSCH, J.; WEISBRICH, CH.; et al. Insulin-like growth factor-I and α_2 -macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. **Human of Reproduction**, v.11, n.11, p.2454-2460, 1996.

GLANDER, H.-J.; LAMMERT, A.; PAASCH, U.; et al. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. **Andrology**, v.34, n.4, p.227-233, 2002.

GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. **Endocrine Reviews**. v.18, n.4, p.541-609, 1997.

GUPTA, G.S. **Proteomics of Spermatogenesis**. In: Chapter 3, Non-Steroidal Signal Molecules In Spermatogenesis, p.47-76, 2005.

HANSSON, H.A.; BILLIG, H.; ISGAARD, J. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. **Biology of Reproduction**, v.40, n.6, p.1321-1328, 1989.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; et al. Identification of Insulin-Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility. **Biology of Reproduction**, v.59, n.2, p.330-337, 1998.

HESS, M.F.; ROSER, J.F. The effects of age and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor-I concentration in stallions, **Theriogenology**, v.56, n.5, p.723-733, 2001.

HICKS, J.J.; ROJAS, L.; ROSADO, A. Insulin regulation of Spermatozoa Metabolism. **Endocrinology**, v.92, n.3, p. 833-839, 1973.

HOEFLICHA, A.; REICHENBACHB, H.-D.; SCHWARTZB, J.; et al. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, n.1, p. 39-51, 1999.

JORSARAEI, S.G.A.; HIROAKI SHIBAHARA, H.; AYUSTAWATI; HIRANO, Y.; et al. The in-vitro effects of nicotine, cotinine and leptin on sperm parameters analyzed by CASA system. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.6, n.3, p. 157-165, 2008.

KANDEEL, F.R.; KOUSSA, V.K.T.; SWERDLOFF, R.S. Male Sexual Function and Its Disorders: Physiology, Pathophysiology, Clinical Investigation, and Treatment. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p. 342-388, 2001.

KINNER, M.K. Growth factors in gonadal development. **Journal of Animal Science**, v.70 (suppl 2), p.30-41, 1992.

LACKEY, B.R.; GRAY, S.L.; HENRICKS, D.M. Measurement of Leptin and Insulin-like Growth Factor-I in Seminal Plasma from Different Species. **Physiological Research**, v.51, n.3, p.309-311, 2002.

- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.78, n.4, p.1216-1231, 1998.
- MacCPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; et al. Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 and -5 in Equine Seminal Plasma: Association with Sperm Characteristics and Fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, n.2, p.648-654, 2002.
- MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; et al. Major proteins of bovine seminal vesicle bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.49, n.1, p.27-37, 1993.
- MARKS, J.L.; AX, R.L. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to bindings affinity of heparin to sperm. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.8, p.2078-2082, 1985.
- MARTINS, J.A.M. **Desenvolvimento reprodutivo e análise das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina, em tourinhos Gir selecionados para a produção de leite**. Tese (Doutorado). UFMG, Belo Horizonte/MG. 71f, 2010.
- MIAO, Z-R; LIN, T.K.; BONGS, T.A.; ZHOU, X.; et al. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. **Clinical Endocrinology**, v.49, n.2, p.235-239, 1998.
- NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; ABE, S.I. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. **International Journal of Developmental Biology**, v.43, n.4, p.343-347, 1999.
- NIKBAKH, G.; MEHR, M.R.A.; BAGHBANZADEH, A.; et al. Leptin Receptor mRNA in Bull Ejaculated Spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animal**, v.45, n.2, p.237-242, 2010.
- OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M.; CIMAROSTI, H. I.; et al. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 21-28, 2002.
- PATEL, B.K.; KOENIG, J.I.; KAPLAN, L.M.; et al. Increase in plasma leptin and Lep mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. **Metabolism**, v.47, n.5, p.603-7, 1998.
- PÓVOA JR.H.; REZENDE, M.T.L.; SOUZA, A.C.; et al. Insulina imunoreativa em líquidos biológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.71, n.4, p. 425-438, 1973.
- RONGE, H.; BLUM, J. Insulin-like growth factor I during growth in bulls. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.29, n.1, p.105-11, 1989.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: FEP MVZ Editora, 2002.
- SÁNCHEZ-LUENGO, S.; FERNÁNDEZ, P.J.; ROMEU, A. Insulin growth factors may be implicated in human sperm capacitation. **Fertility and Sterility**, v.83, n.4, 2005.
- SANSINANE, A.S.; CERONE, S.I.; ZONCO, I.; et al. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. **Nutrition Research**, v.21, n.7, p.1045-1052, 2001.
- SAS. **User's Guide**. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 2002.

SELVARAJU, S.; REDDY, I.J.; NANDI, S.; et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.113, n.1-4, p.60–70, 2009.

SHRIVASTAV, P.; SWANN, J.; JEREMY, J. Y.; et al. Sperm function and structure and seminal plasma prostanoid concentrations in men with IDDM. **Diabetes Care**, v.12, n.10, p. 742–744, 1989.

SILVESTRONI, L.; MODESTI, A. SARTORI, C. Insulinsperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome. **Archives of Andrology**, v. 3, n.3, p. 201-211, 1992.

SOUZA, L.W.O. Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF1 no plasma seminal de touros (*Bos taurus taurus*) submetidos à degeneração testicular. Tese de doutorado. Pirassununga/SP. 184f, 2004.

SPITERI-GREECH, J; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis—a review. **Jornal of Reproduction Fertility**, v.98, n.1, p.1–14, 1993.

VON SOBBE, H. -U.; KOEBNICK, C.; JENNE, L.; et al. Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadotrophic hypogonadism. **Andrologia**, v.35, n.4, p. 233–237, 2003.

WOLF, F.R., ALMQUIST, J.O., HALE, E.B. Prepubertal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.761-765, 1965.

CAPÍTULO IV

Experimento 03

Classificação andrológica por pontos (CAP) associada aos parâmetros hormonais e protéicos seminais durante a peripuberdade de tourinhos Gir-Leiteiros

Resumo

Objetivou-se com este estudo determinar a classificação andrológica por pontos (CAP) de touros Gir-Leiteiros, precoces e regulares, durante a peripuberdade associando-a com os dados hormonais e protéicos seminais obtidos neste período. A ordenação pela CAP foi realizada segundo o perímetro escrotal e a condição espermática. As concentrações hormonais foram determinadas por radioimunoensaio e as proteínas por géis 1D em gradiente de 10 a 15% de poliacrilamida, sendo as proteínas com afinidade à heparina separadas por gel filtração por meio de cromatografia líquida de rápido desempenho em coluna de afinidade. Os animais precoces tiveram CAP de $23,67 \pm 7,31$, $28,83 \pm 8,86$, $34,5 \pm 16,19$, $34,5 \pm 16,19$, $48,16 \pm 12,38$ e $66,50 \pm 14,12$ para os momentos -60, -30, 0, 30 e 60 da puberdade, respectivamente. Para estes mesmos períodos, os animais regulares tiveram valores da CAP de $26,00 \pm 9,97$, $32,00 \pm 12,00$, $39,83 \pm 12,95$, $57,33 \pm 10,80$ e $76,83 \pm 14,63$, respectivamente. Não foi constatada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. A CAP apresentou correlação positiva de alta magnitude com as variáveis: idade, perímetro escrotal, peso corporal, concentração espermática, número de espermatozóides totais e número de células normais, e apresentou também correlação com as bandas protéicas seminais de 112, 55, 47, 27, 25, 22, 18, 12 e 6,9kDa, além das concentrações de IGF-I, dos picos protéicos com afinidade à heparina e de proteínas totais. Estes resultados sugerem a importância que a CAP desempenha na classificação de animais com maior capacidade para a reprodução e de alto padrão andrológico ligados a fatores como peso, protéicos ou humorais de ação local.

Palavras-chave: IGF-I, insulina, leptina, proteína seminal, zebu.

Abstract

This study was carried out to evaluate breeding soundness (CAP) in , precocious and regular, bulls Gyr-Dairy during the peripuberty and its relationship with the hormone and seminal protein recorded in this period. The ranking of CAP was performed according scrotal circumference and sperm condition. The hormone levels in seminal plasma IGF-I, leptin and insulin were obtained by RIA and the values of seminal protein bands by one-dimensional electrophoresis. The CAP of precocious animals were 23.67 ± 7.31 , 28.83 ± 8.86 , 34.5 ± 16.19 , 34.5 ± 16.19 , 48.16 ± 12.38 and 66.50 ± 14.12 for -60, -30, 0, 30 and 60 days of puberty, respectively. While the CAP of regular animals were values of 26.00 ± 9.97 , 32.00 ± 12.00 , 39.83 ± 12.95 , 57.33 ± 10.80 and 76.83 ± 14.63 , respectively. There was not found statistical difference ($p > 0.05$) between groups. The CAP had a positive correlation of high magnitude with variables: age, scrotal circumference, live weight, sperm concentration, sperm number and total number of normal cells, also showing a correlation with the seminal protein bands of 112, 55, 47, 27, 25, 22, 18, 12 and 6.9 kDa, and the concentrations of IGF-I, the protein peaks with affinity to heparin and total protein. These results suggest the importance role of CAP in the classification of animals with high capacity for reproduction and andrological standard, linked to factors as weight, protein or humoral local action.

Keywords: IGF-I, insulin, leptin, seminal protein, zebu.

1. Introdução

A avaliação da fertilidade do touro depende de uma série de fatores associados, ou não, que vão desde os aspectos mais básicos, mas também fundamentais, do exame clínico e da biometria testicular, passando pela avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, até os parâmetros de avaliações funcionais, bioquímicos e hormonais (Salvador et al., 2008). Desta forma, observa-se que o potencial reprodutivo de um touro é a soma dos diversos fatores ligados à reprodução (Dias et al., 2009a).

Assim, diante da importância das características andrológicas, notadamente aquelas ligadas ao perímetro escrotal (PE) e qualidade do sêmen, têm sido propostos diferentes sistemas de pontuação do desempenho reprodutivo de touros que atuam como índices mais adequados de seleção andrológica. Os touros podem ser avaliados e submetidos a sistemas de tabelas de classificação andrológica por pontos (CAP) segundo Vale Filho (1988 e 1989) e Vale Filho et al. (2010), que lhes conferem classificações a partir do seu potencial reprodutivo (Dias et al., 2009a).

Nesses índices pontuam-se as características com maior correlação com a fertilidade (motilidade, perímetro escrotal e morfologia espermática) de acordo com a idade do animal. A pontuação máxima obtida é de 100 pontos, onde 20 pontos são atribuídos à motilidade, 40 à morfologia e 40 ao perímetro escrotal (Vale Filho, 1988 e 1989; Vale Filho et al., 2010). Touros clinicamente normais considerados aptos a reprodução devem apresentar valor mínimo de 60 pontos nesse índice (Folhadella et al., 2006).

Segundo Vale Filho (1989) e Vale Filho et al. (2001), a estimativa de um índice andrológico como a CAP, auxilia na comparação entre touros de mesma raça

quanto a sua capacidade fecundante. Desta forma, objetivou-se com este estudo determinar o padrão de secreção de testosterona durante a puberdade e a CAP durante a peripuberdade associando-a aos valores hormonais e proteínas seminais em touros da raça Gir-Leiteiro.

2. Material e Métodos

2.1 Local, dados climáticos, animais experimentais e manejo alimentar

O local, os dados climáticos, os animais experimentais e o manejo alimentar foram determinados segundo o descrito no capítulo dois desta tese.

2.2 Procedimento experimental

2.2.1 Coleta do plasma seminal

A coleta do plasma seminal foi realizada segundo o discriminado no capítulo dois desta tese.

2.2.2 Classificação andrológica por pontos (CAP)

Os animais foram pontuados segundo Vale Filho (1988, 1989) e Vale Filho et al. (2010) (Anexo 3), numa escala de 3 a 20 pontos segundo as características de motilidade, de 3 a 40 pontos segundo a morfologia espermática e de 10 a 40 pontos segundo o perímetro escrotal. Esta última variável levou em consideração a idade do animal para se determinar a pontuação empregada.

Após a classificação pela CAP, os dados foram ajustados à puberdade (Wolf et al., 1965), segundo Brito et al. (2004), para, então, serem comparados entre os grupos, precoces (**Prec**) e regulares (**Reg**) e o período do estágio de desenvolvimento sexual (-60, -30, 0, +30 e +60), sendo, então, correlacionados com os valores de IGF-I, leptina, insulina, proteínas seminais e de afinidade à heparina.

2.3 Coleta do soro sanguíneo para determinação da concentração de testosterona

As coletas foram realizadas em dois momentos (setembro e dezembro) quando os animais apresentavam média de idade de 18,8 e 21,8 meses, sendo realizadas a intervalos de duas horas, durante 10 horas consecutivas, nos horários: 08:00h, 10:00h, 12:00h, 14:00h, 16:00h e 18:00h. As amostras foram coletadas na veia jugular, utilizando-se tubos *vacutainer* sem anticoagulante.

Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm, por 15 minutos, para obtenção do soro, sendo armazenados a -196 °C (nitrogênio líquido), para posterior análise no Laboratório de Enzimologia de Bioquímica de Proteínas, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

Para a coleta do sangue dividiram-se os animais em grupos de 10 para se evitarem intervalos muito longos entre um mesmo animal dentro de coletas subsequentes. Com este procedimento, mesmo na situação de um animal ser o primeiro numa coleta e o último na coleta subsequente, a diferença na sequência das coletas não ultrapassaria a 20 minutos, considerando-se o tempo de coleta por animal de apenas dois minutos.

Somente ao final do período experimental, antes das análises laboratoriais, é que se dividiram os animais nos grupos de **Prec** e **Reg**, como explicado no capítulo dois. Desta forma, os 30 animais alocados inicialmente no experimento foram todos coletados. Mas, somente os 16 que constituíam os grupos amostrais foram analisados.

2.3.1 Análise do soro sanguíneo para determinação da concentração de testosterona

A concentração sérica de testosterona foi determinada segundo Loi et al. (2006) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em método isocrático, utilizando-se para isso integrador Chromatopac C-R4A, System Controller SCL-10, UV-VIS Spectrophotometric detector SPD-10AV, Auto injetor SIL-10A, Liquid chromatograph LC-10AD e Column oven CTO-10A, todos equipamentos da empresa Shimadzu.

O sistema HPLC foi equipado com uma coluna de fase reversa C-18 (Discovery®, Supelco) com 250mm de comprimento, 4,6mm de diâmetro e 5µm de tamanho de partícula, sem pré-coluna. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água (35:65, v/v), sendo a mesma deaerada por 12 minutos por sucção com bomba de vácuo e agitação em ultrassom. A taxa de fluxo empregada no sistema foi de 1mL/min e o volume de injeção de 50µL. A temperatura do CTO, onde a coluna era mantida, foi ajustada para 38°C, com o intuito de diminuir o tempo de eluição da testosterona. A absorbância foi mensurada em 234nm, sendo este comprimento de onda ótimo para a testosterona e satisfatório para o padrão interno (propilparabeno), segundo Loi et al. (2006). Os tempos de eluição do padrão interno (PI) e da testosterona, nas amostras de soro, foram de 15,4 e 20,2min, respectivamente (Fig. 01).

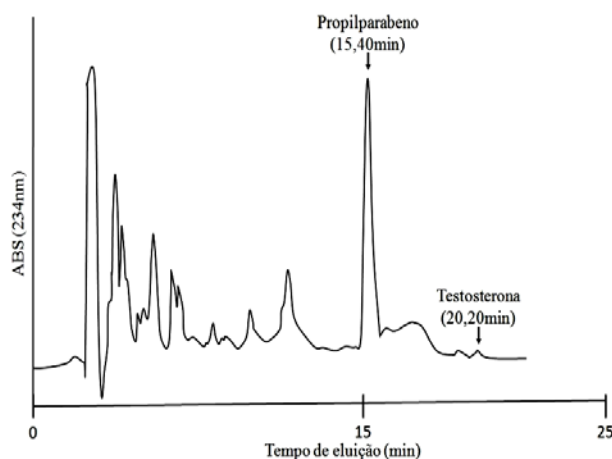


Figura 01: Cromatograma (HPLC) apresentando o tempo de eluição do padrão interno (propilparabeno), 15,40min, e da testosterona, 20,20min.

A curva de calibração do equipamento foi realizada com o preparo de soluções de testosterona pura (17β -hydroxy-4-androstene-3-one, $\geq 99,9\%$; Sigma Aldrich) em metanol (P.A.) variando de 10ng/mL a 200ng/mL. O ponto mínimo de detecção do aparelho foi de 6ng/mL e o de quantificação foi de 13ng/mL, com volume de injeção de 50 μ L e atenuação zero no integrador.

O propil parabeno (padrão interno; $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) (Fig. 02) foi

utilizado para aumentar a acurácia e precisão da detecção dos menores limites. Este padrão apresentava estabilidade durante a análise, tempo de eluição menor do que o da testosterona e seu pico não interferia com a matriz das amostras do soro.

Para o preparo da solução trabalho, o padrão era pesado e diluído em metanol até a concentração de 1 μ g/mL.

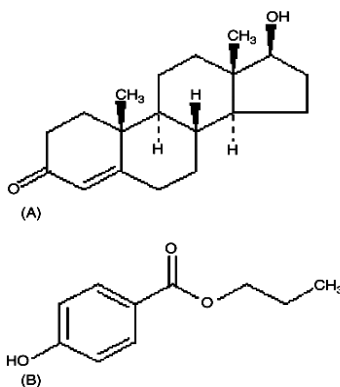


Figura 02: Estrutura da testosterona (A) e do propilparabeno (B). Fonte: Loi et al. (2006).

Para análise das amostras de testosterona utilizaram-se 2mL de soro que foram

transferidos para tubo de centrífuga de 15mL para posterior adição de 50 μ L da

solução de trabalho do PI (1µg/mL). Após agitação em vórtex por 30s, 5mL de dietileter contendo 2% de isopropanol foram adicionados passando, então, a nova solução em vórtex por 1min. Após estes procedimentos o tubo foi centrifugado por 10min a 3360 rpm (1856g) a 10°C. A fase clara orgânica foi separada e colocada em tubos de *vacutainer* e levada ao equipamento *speedvac* por um período de 45min para evaporação do solvente orgânico. Estas amostras eram então ressuspensas com 100µL de metanol e vortexadas por 1min, a seguir se adicionava mais 100µL de acetonitrila e, novamente, passava-se a amostra pelo vórtex.

Em razão da não utilização de uma pré-coluna no sistema HPLC, optou-se por filtrar todas as amostras antes da injeção das mesmas no sistema de cromatografia, evitando o entupimento da coluna. Para isso utilizou-se filtro Millipore® com membrana HV em PVDF de 0,45 mm e 13mm de diâmetro.

As amostras de soro que não continham 2mL, eram medidas por meio de micropipetas e realizava-se a proporção referente aos 2mL para que se obtivesse resultado preciso quanto a pré-concentração de 10x. Para determinação dos valores de testosterona a partir das áreas registradas pelo Chromatopac C-R4 obteve-se, por meio da média dos pontos da curva de calibração, a equação: $y = 5,56x^2 + 464,89x + 88,90$ ($R^2 = 0,99$).

Em razão das amostras não conterem unicamente testosterona após sua extração e também por não se conhecer a hidrofobicidade de todas as substâncias que se encontravam presentes no momento da análise optou-se, então, pela lavagem da coluna com acetonitrila a 100% a cada 20 amostras analisadas ou a cada vez que a linha de base do Chromatopac não corrigisse o desvio registrado, passando 10 volumes de coluna, semelhante ao tempo

proposto para o equilíbrio da mesma. Desta forma, todas as substâncias que possuíam uma hidrofobicidade maior do que a testosterona e mantinham-se ligadas em razão da baixa concentração de acetonitrila utilizada na fase móvel eram retiradas, favorecendo com isso a correção da linha de base do integrador.

2.4 Análises Estatísticas

Após o ajuste dos dados de acordo com a idade em relação à puberdade (dias), no momento 0 (zero) foi realizada uma distribuição de frequência das idades dos 16 animais estudados por meio do procedimento FREQ do SAS (SAS, 2002). Adotou-se como ponto de separação dos grupos a mediana, 18 meses, de idade naquele momento. Assim, animais com idades à puberdade menores do que a da mediana foram considerados precoces (**Prec**) e aqueles com idades maiores do que a mediana, foram considerados regulares (**Reg**).

O índice da CAP, por possuir pontuação a partir de dados subjetivos como a motilidade espermática, foi considerado variável não paramétrica. O delineamento experimental adotado para análise das variáveis foi em blocos ao acaso em esquema de subparcelas com 8 repetições. Os grupos constituíram as parcelas e as idades em que os animais foram avaliados, as subparcelas. As análises foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS segundo Littell, et al. (1998).

O efeito de grupo foi obtido pelo teste F e os efeitos de idade foram estimados por meio de ajustamento de modelos de regressão linear e quadrática. As comparações entre as idades dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Friedman.

Os modelos de regressão das variáveis avaliadas em relação à idade à puberdade foram ajustados por meio do PROC REG do SAS (2002). Para os casos em que a interação entre grupo e idade foi significativa, ajustou-se um modelo de regressão para cada grupo. As correlações entre as variáveis paramétricas e não-paramétricas foram obtidas pelo coeficiente de correlação de Spearman por meio do PROC CORR com a opção SPEARMAN do SAS (2002).

Os dados relacionados à testosterona são descritivos, pois os mesmos não tiveram consistência quanto à comparação dentro de tempo e entre grupos em razão da perda de amostras durante o procedimento de análise laboratorial. Desta forma, foram apresentados conjuntamente, sem distinção de grupo.

3. Resultados e discussão

3.1 Classificação andrológica por pontos (CAP) de tourinhos Gir-Leiteiros na peripuberdade

Os valores da CAP para os momentos -60, -30, 0, +30 e +60 da puberdade para os animais **Prec** foram de $23,67 \pm 7,31$, $28,83 \pm 8,86$, $34,5 \pm 16,19$, $48,16 \pm 12,38$ e $66,50 \pm 14,12$. Os animais **Reg** apresentaram para estes mesmos momentos valores de $26,00 \pm 9,97$, $32,00 \pm 12,00$, $39,83 \pm 12,95$, $57,33 \pm 10,80$ e $76,83 \pm 14,63$. Ambos os grupos apresentaram CAP >60 no período +60, sugerindo o momento da maturidade sexual desses animais, uma vez que este valor representou a maior CE e a melhor qualidade das células espermáticas.

Os animais **Reg** apresentaram maiores valores da CAP durante todo o período do desenvolvimento sexual. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Fig. 3). Todavia, deve-se salientar que os dados foram ajustados para idade à puberdade. Desta forma, em razão dos animais **Prec** terem entrado na puberdade

mais precocemente que os **Reg**, apresentaram pesos corporais mais leves, o que pode ter interferido na resposta final do grupo, já que a CAP é regida pela idade, perímetro escrotal e morfologia espermática, favorecendo os animais **Reg** que no momento das comparações dos estádios de desenvolvimento sexual, foram mais pesados, por serem mais velhos, tendo o desenvolvimento testicular favorecido.

Esta hipótese é corroborada pelos resultados obtidos por Dias et al. (2009a) que ao trabalharem com touros da raça Nelore, em regime extensivo, encontraram que os animais com CAP abaixo de 60 pontos tinham os menores pesos, sugerindo que o peso corporal exerce influência na determinação da condição reprodutiva e na classificação desses animais quanto à CAP, o que também foi sugerido por Coulter (1986) em touros *Bos taurus taurus*.

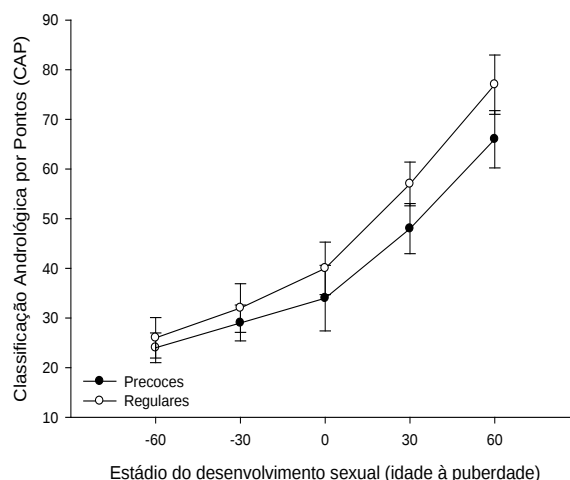


Figura 03: Classificação andrológica por pontos (CAP) dos animais **Prec** e **Reg** durante o desenvolvimento sexual.

Contudo, apesar dos animais **Reg** serem mais pesados, não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos quanto a CAP. A falta desta diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos pode ser explicada pelo manejo alimentar empregado. Pois, no presente experimento, os animais foram criados em sistema intensivo, alimentados com dieta de elevado conteúdo protéico recebendo 1% do peso vivo (PV), além de silagem de milho como volumoso. Isto pode ter repercutido nos valores do perímetro escrotal e, conseqüentemente, na morfologia espermática, fatores relevantes na quantificação da CAP.

Esta ideia é corroborada pelos dados de Correa et al. (2006) que trabalharam com 516 touros jovens da raça Tabapuã, de um e dois anos de idade, criados sob três regimes alimentar (R1: pasto, com suplementação mineral; R2: pasto com suplementação de cana-de-açúcar, 0,5% de uréia e 2kg/animal/dia de concentrado comercial com 84%NDT e 18%PB no período da seca (julho a setembro) e R3: animais estabulados que receberam, a partir do desmame (maio), dieta balanceada composta por cana-de-açúcar, capim-

elefante, uréia (0,5%) e concentrado comercial (88%NDT e 19%PB), que variou de 2kg/animal/dia até atingir 6kg/animal/dia na idade adulta (27 meses de idade)).

Estes autores encontraram efeito do regime alimentar ($P<0,05$) sobre o peso corporal, circunferência escrotal (CE), volume do ejaculado e CAP. Os animais do R3 foram mais pesados do que os do R2, e estes mais do que os do R1, sendo que os melhores resultados para CE e CAP foram encontrados para animais do R3, e não houve diferença ($P>0,05$) entre os animais do R1 e R2. Como a CAP é índice de classificação dos touros aptos à reprodução, foi observado, por estes autores, que o manejo alimentar aumentou os valores da CAP.

Outro estudo (Garnero et al., 1999) corrobora os resultados do presente trabalho ao indicar interações entre as medidas testiculares e o peso corporal em bovinos. Estas interações sugerem a existência do envolvimento dos processos fisiológicos que controlam a função reprodutiva e o desenvolvimento ponderal dos touros, podendo, desta forma, a biometria testicular

e o peso vivo, avaliados em animais jovens, serem potenciais indicadores do desenvolvimento ponderal do touro na fase adulta (Moura et al., 2002).

Contudo, é necessário ressaltar que a CAP é um índice dinâmico e, já que o PE somente atinge um platô de crescimento nos touros zebuínos em torno dos 40 meses (Quirino et al., 1999), os valores da CAP tendem a

aumentar com o avançar da idade (Silva, 2007), podendo os valores aqui apresentados se igualarem, numericamente, após a maturidade sexual.

Entretanto, por não ter sido encontrada diferença ($p>0,05$) entre os animais **Prec** e **Reg**, e não ter ocorrido interação entre os grupos e os estádios de desenvolvimento sexual, agruparam-se os resultados (Tab. 1).

Tabela 1: Classificação andrológica por pontos (CAP) de touros Gir-Leiteiro durante a peripuberdade

Estádio do desenvolvimento sexual	CAP (Média±SD)
-60	24,83±8,42 ^e
-30	30,42±10,19 ^{de}
0	37,17±14,26 ^{cd}
30	52,75±12,06 ^b
60	71,67±14,73 ^a

Letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste Friedman ($p<0,05$).

Como esperado, os valores da CAP aumentaram com o avançar da idade, apresentando diferenças estatísticas entre os

estádios de desenvolvimento sexual ($p<0,05$) (Fig. 04).

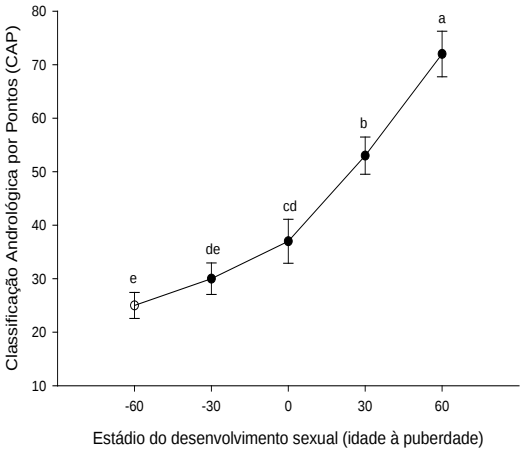


Figura 04: Classificação andrológica por pontos (CAP) durante o desenvolvimento sexual. Letras distintas diferem pelo teste de Friedman ($p<0,05$).

Como mostrado na figura 4, os animais atingiram CAP acima de 60 pontos (tous

de classificação boa), 60 dias após a puberdade, momento do início da

maturidade sexual destes animais, apresentando média de idade de 20,1 meses. Estes resultados demonstraram a eficácia da CAP na determinação do momento da maturidade sexual quando se realiza o acompanhamento dentro do período da peripuberdade.

Contudo, Freneau et al. (2006) relataram que a CAP não capta as modificações seminais de touros em fase puberal e sim de touros adultos, portanto não seria ferramenta de avaliação de touros nesta fase, sendo útil somente para identificar tourinhos mais precoces, como os que aqui se apresentaram.

Estes mesmos autores, utilizando a análise da CAP, verificaram que, pelas características seminais puberais terem sido de baixa qualidade, o maior aporte de pontos foi dado pelo perímetro escrotal, sendo quase insignificante em relação à morfologia e à motilidade espermática, mostrando que a CAP seria uma ferramenta muito mais importante para identificar touros pela sua precocidade do que para descarte de animais nessa fase de desenvolvimento (Freneau et al., 2006).

Contudo, deve-se salientar que os animais andrológicamente superiores em idades precoces serão os de maiores potenciais reprodutivos à maturidade sexual (Mathevon et al., 1998). Assim, segundo Picard-Hagen et al (2002), avaliações andrológicas precoces são importantes formas de se avaliar a função sexual de touros jovens, permitindo o seu melhor uso como futuros reprodutores, demonstrando, com isto, a importância destas avaliações em animais novos para que se possa direcionar, precocemente, os animais que poderão ser candidatos a reprodutores. Corroborando esta ideia, Folhadella et al. (2006) observaram que a seleção andrológica de touros da raça Gir deve ser iniciada antes dos 18 meses, possibilitando identificar entre 18 e 24 meses animais

precoces e maduros quanto ao potencial reprodutivo.

As observações de Folhadella et al. (2006) foram semelhantes aos constatados no presente estudo ao que sugerem associação das variáveis da CAP e os parâmetros espermáticos (Tab. 03).

A CAP apresentou correlação positiva de alta magnitude com as variáveis: idade, perímetro escrotal, peso vivo, concentração espermática, número de espermatozóides totais e número de células normais. Apresentou também correlação positiva de média magnitude com a motilidade e vigor espermático. Além de apresentar correlação negativa e de alta magnitude com as variáveis: defeitos maiores e totais.

Resultados semelhantes foram relatados por Folhadella et al. (2006), como citado anteriormente, que ao trabalharem com touros Gir-Leiteiros com idade variando entre 18 e 38 meses registraram que a CAP foi altamente correlacionada, de forma positiva, com o perímetro escrotal, e negativa, com os defeitos maiores e totais, ou seja, quanto maior a circunferência escrotal e menores os defeitos maiores e totais, maior será a CAP.

Folhadella et al. (2006) também encontraram correlação de média magnitude entre CAP e motilidade, diferindo de Johnson et al. (1995), que encontraram alta magnitude, mas semelhantes aos resultados de Salvador et al. (2002) e Freneau et al. (1997). As características de maiores magnitudes de correlação que envolveram a CAP foram: perímetro escrotal, defeitos maiores e defeitos totais, ou seja, exatamente aquelas que compõem este índice.

3.2 Correlação dos valores de IGF-I, leptina, insulina e proteínas do plasma

seminal com a classificação andrológica por pontos (CAP)

Os capítulos 1 e 2 desta tese determinaram os valores das proteínas, do IGF-I, da leptina e da insulina contidos no plasma seminal durante a peripuberdade. Como os

dados da CAP foram ajustados a puberdade, seguindo os critérios estabelecidos nos dois primeiros capítulos deste estudo, estabeleceu-se a correlação deste índice com os valores hormonais e protéicos do plasma seminal. Estes resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 02: Correlação da CAP e dos parâmetros hormonais e protéicos do plasma seminal de touros Gir-leiteiros durante a peripuberdade

	IGF-I	Prot Tot	112 kDa	55 kDa	47 kDa	27 kDa	25 kDa	22 kDa	18 kDa	12 kDa	11 kDa	6,9 kDa
r =	0,38 ¹	0,52 ¹	0,30 ²	-0,43 ¹	-0,71 ¹	0,44 ²	-0,84 ¹	0,50 ¹	0,88 ²	0,47 ¹	0,59 ¹	0,40 ²

¹: p<0,005; ²: p<0,05.

Observou-se correlação positiva e de média magnitude da CAP com as concentrações de IGF-I e das proteínas totais e com as proteínas de 112, 27, 22, 12 e 6,9kDa e de alta magnitude com a proteína de 18kDa. A CAP também apresentou correlação negativa de média magnitude com as proteínas plasmáticas seminais de 55 e 47kDa e de alta magnitude com a de 25kDa. As demais proteínas, assim como os valores de insulina e leptina do plasma seminal, não apresentaram correlação com a CAP.

Como abordado no capítulo dois desta tese, as concentrações totais de proteínas e as proteínas de 112, 22, 12 e 6,9kDa apresentaram correlação positiva com os parâmetros ponderais e espermáticos durante o desenvolvimento sexual, justificando, desta forma, tal correlação com a CAP. Contudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre as proteínas de 27 e 18kDa e estes mesmos parâmetros, podendo estas proteínas serem utilizadas como marcadoras da CAP durante o desenvolvimento sexual de touros Gir-Leiteiros, uma vez que apresentaram correlação positiva e de alta magnitude com a mesma.

Contudo, deve-se salientar, a correlação obtida entre a CAP e as concentrações plasmáticas seminais de IGF-I. Este fator de crescimento tem destaque no desenvolvimento sexual, atuando nos testículos tanto por meio do desenvolvimento das células germinativas e somáticas (Kinner, 1992) quanto nas próprias células espermáticas, promovendo maior velocidade linear das mesmas por se ligarem a seus receptores presentes nestas células (Nakayama et al., 1999).

Assim, frente à correlação aqui apresentada entre essas variáveis, pode se esperar que animais com maior CAP tenham maior concentração de IGF-I no plasma seminal, demonstrando com isso, maior aplicabilidade deste índice frente à escolha de futuros reprodutores.

Deve-se também ser ressaltada a importância das proteínas com afinidade à heparina. Estas proteínas tem ação central quanto a viabilidade da célula espermática por atuarem na capacitação espermática e reação acrossômica (Killian et al., 1993), e favorecer, desta maneira, a fecundação. Por isto, estimou-se esta correlação a partir do estudo de Martins (2010), segundo explicitado no capítulo dois desta tese, com

os valores da CAP do presente experimento (Tab. 3).

Tabela 03: Correlação da CAP e as proteínas com afinidade à heparina do plasma seminal de touros Gir-leiteiros durante a peripuberdade

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
r =	0,41 ²	0,28 ³	0,45 ¹	0,52 ¹	0,54 ¹	0,57 ¹	0,60 ¹	0,43 ²

¹: P=<0,0005; ²P=<0,005; ³: P=<0,05; P1-8: pico de afinidade à heparina de um a oito.

Como exposto no capítulo dois, todos os picos apresentaram correlação com os padrões reprodutivos estudados (idade, PE, peso vivo, motilidade espermática, defeitos maiores, menores e totais, volume e concentração espermática) (Martins, 2010). Contudo, dentre todos os picos avaliados, observou-se que 5, 6 e, especialmente, o 7 apresentaram as maiores correlações com estes parâmetros. Estes picos, juntamente com o pico 8, são os que apresentaram maior afinidade à heparina, de acordo com seu grau de dissociação da coluna de afinidade.

Isto sugere a importância que a CAP desempenha na classificação de animais com maior capacidade para a reprodução. A correlação obtida entre a CAP e todos os picos de afinidade à heparina, com exceção do P2, foi positiva e de média-alta magnitude (Fig. 5).

Entretanto, estes resultados vão de encontro aos dados apresentados por Salvador (2005) e Folhadella (2008) que, ao trabalharem com touros da raça Nelore e Gir, respectivamente, não encontraram correlação entre a CAP e os picos protéicos com afinidade à heparina. Talvez a falta de correlação apontada por estes autores se deva a metodologia empregada, onde seus desenhos experimentais pontuaram apenas determinado momento da vida reprodutiva dos animais utilizados. Diferente do que é aqui apresentado, onde se determinou o acompanhamento andrológico dos animais

durante o desenvolvimento sexual, indo de 60 dias antes até 60 depois da puberdade.

Como explicitado na figura 06, a distribuição das concentrações dos picos protéicos de afinidade à heparina demonstraram ter resposta biológica, apresentando distribuição sigmoideal, tendo menor concentração no período de 60 dias antes e maior 60 dias após a puberdade, o que demonstra que as secreções destas proteínas podem ter ligação com os andrógenos testiculares que seguem esta distribuição. Isto, em parte, explica a sua correlação com a CAP, uma vez que este hormônio terá resposta direta na qualidade espermática e no diâmetro testicular.

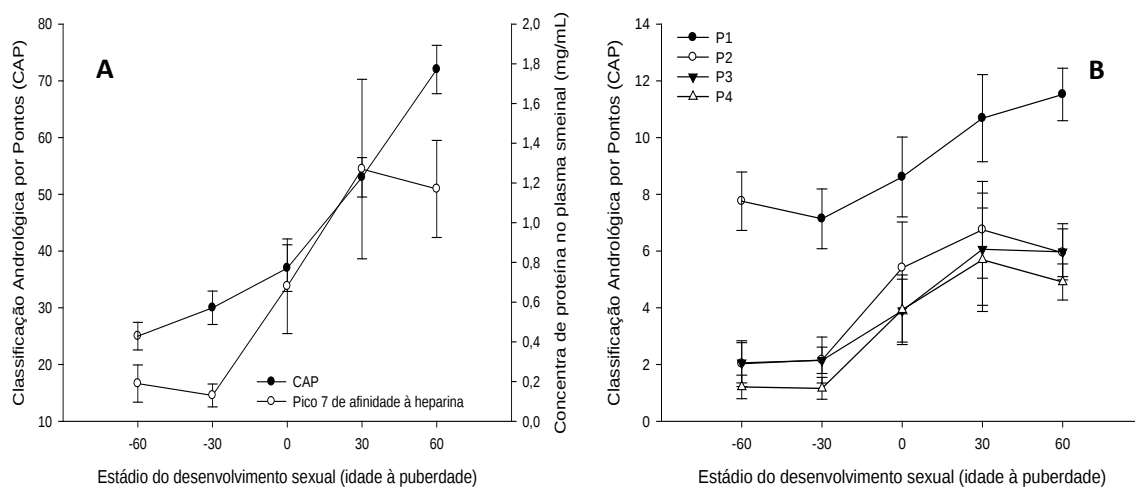


Figura 5: CAP e o pico 7 de afinidade à heparina (A) e os picos de afinidade à heparina 1, 2, 3 e 4 (B) durante o desenvolvimento sexual.

Contudo, essa observação deve ser vista com cautela uma vez que não se determinaram, no presente estudo, os valores deste andrógeno durante a peripuberdade para que, então, se determinasse a sua correlação com a CAP.

A importância desta correlação entre CAP e proteínas com afinidade à heparina é demonstrada por Marks e Ax (1985), que ao utilizarem touros holandeses com índices de não retorno do estro entre 59 e 90 dias e, no mínimo, 2.000 serviços por animal, demonstraram que a ligação da heparina marcada aos espermatozoides esteve relacionada aos índices de não retorno do cio, podendo, assim, ser um teste para predizer a fertilidade de touros.

O acompanhamento de todas essas variáveis durante a peripuberdade, realizado no presente estudo, pôde fornecer subsídios quanto à importância deste índice na classificação dos futuros reprodutores e demonstrar a ligação direta deste índice com a função reprodutiva do macho, servindo como ferramenta complementar na escolha de animais que serão direcionados a reprodução.

Todavia, deve-se ressaltar novamente o que foi apresentado por Freneau et al. (2006), que relataram que a CAP não capta as modificações seminais de touros em fase puberal e sim de touros adultos. Porém, este índice serve para indicar os animais que se apresentam precoces e com melhor qualidade seminal dentro do rebanho, frente às correlações aqui apresentadas. Assim, servindo como uma ferramenta a mais no momento de selecionar, precocemente, um futuro reprodutor.

3.3 Descrição dos valores séricos de testosterona no momento da puberdade

Como descrito anteriormente, os dados referentes à testosterona são descritivos, pois houve perda laboratorial que acarretou na diminuição das unidades amostrais e, com isto, impediu a execução da análise estatística destes dados. Não sendo possível separar estes dados por grupo (**Prec e Reg**).

Os valores referentes aos seis momentos da coleta (8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 e 18:00h) dos dois períodos analisados são apresentados na figura 6.

Tanto na primeira quanto na segunda coleta os animais apresentaram oscilação nos valores de testosterona dentro das 10 horas de coleta (8 às 18 horas), apresentando maiores valores nas primeiras coletas, realizada as 8:00h da manhã. A amplitude dos valores na primeira e na segunda coleta é de 0,94 a 17,62 e 1,24 a 15,65, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Sanwal et al. (1974) que ao trabalharem com touros Noruegueses vermelhos, obtiveram amplitude

de 0,75 a 15,26, semelhante ao resultados apresentados por Barbosa (1987) que trabalharam com touros da raça Canchim e Nelore.

Estes autores sugeriram que essa modulação da secreção de testosterona verificada dentro do período de coleta pode ser ocasionada pelo tempo médio de vida plasmático da testosterona frente aos seus estímulos secretórios ocasionados pelo hormônio luteinizante.

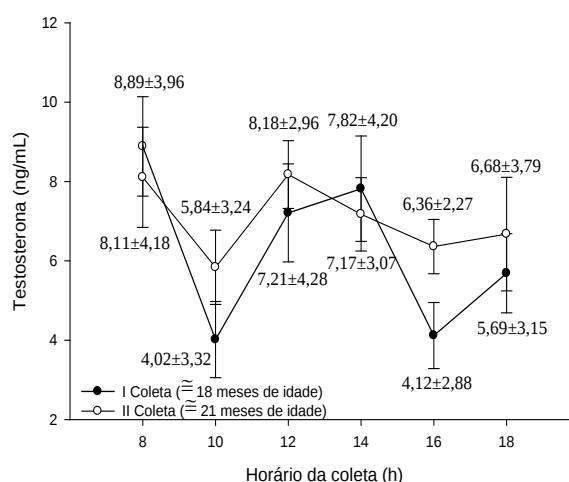


Figura 07: Concentração sérica de testosterona de touros Gir-Leiteiros com média de idade de 18 e 21 meses durante a primeira e segunda coleta, respectivamente. (média±erro padrão).

Tanto na primeira quanto na segunda coleta os pontos de menor concentração de testosterona foram os de 10:00 e 16:00 horas. Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa (1987) que, ao trabalhar com touros da raça Canchim, coletando por 24 horas com intervalos de 2 horas entre as coletas, encontrou variações nas concentrações séricas de testosterona, com pontos de menores valores dentro das 24 horas, observados às 06:00, 16:00 e 22:00 horas. Este mesmo autor encontrou pontos diferentes do nadir sérico de testosterona em touros da raça Nelore, ao observar menores valores de testosterona nos momentos 02:00, 08:00, 12:00 e 18:00 horas. Constatou ainda diferença na

concentração média diária entre estas duas raças, com touros Nelore apresentando média de 3,1±3,7 ng/mL e os Canchim de 1,2±1,8 ng/mL.

Estes valores estão aquém dos resultados encontrados no presente estudo, com touros da raça Gir-Leiteiro, quando na primeira coleta a média diária foi 6,18±3,97 ng/mL e na segunda foi 7,07±3,26 ng/mL. A diferença entre os dados de literatura supracitados e os do presente estudo pode estar associada às diferenças no manejo alimentar e na seleção para precocidade sexual.

Sanches et al. (1998a), em Uberaba/MG, mostraram que o manejo nutricional de tourinhos da raça Nelore teve influência significativa sobre o aumento na secreção de testosterona entre as idades de 11 e 15 meses, com animais suplementados com dietas contendo mais energia apresentando concentração sérica de testosterona mais elevadas.

Contudo, deve-se ressaltar que a metodologia empregada para a determinação das concentrações séricas de testosterona no presente estudo utilizou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa. Este método apesar de ser mais laborioso, tem maior poder de determinação dos valores pesquisados.

Loi et al. (2006) validaram a técnica, neste sistema, para a determinação das concentrações de testosterona. Ressaltaram que por esta metodologia a determinação dos valores de testosterona são maiores comparados com os obtidos por técnicas de radioimunoensaio. Isto se deveu, provavelmente, à eliminação da reação cruzada e a purificação utilizada nos passos iniciais do processo.

Desta forma, diferente dos valores apresentados por Sanwal et al. (1974), Sanches et al. (1998b), Moura et al. (2002) e Dias et al. (2009b), que se assemelham aos de Barbosa (1987), os dados aqui apresentados são mais elevados que os comumente encontrados na literatura, permanecendo como hipótese para a busca da resposta com base unicamente na metodologia empregada ou na contribuição dos animais analisados ou o somatório dos dois.

4. Conclusão

A CAP pode ser utilizada para a determinação da maturidade sexual precoce de touros da raça Gir-Leiteiro, tendo

correlação com os principais parâmetros andrológicos, assim como com a concentração de IGF-I e das principais proteínas seminais.

Referências Bibliográficas

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

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; et al. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1198-1217, 2004.

CORREA, A.B.; VALE FILHO, V.R.; CORRÊA, G.S.S; et al. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.5, p. 823-830, 2006.

COULTER, G.H. Puberty and postpuberal development of beef bulls. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 142-148, 1986.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; et al. Classificação andrológica por pontos (CAP) de touros nelore (*Bos taurus indicus*) de dois e três anos de idade, criados sob pastejo. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, p. 1094-1099, 2009a.

DIAS, J.C.; ANDRADE, V.J.; EMERICK, L.L.; et al. Teste da libido em touros jovens Guzerá e suas associações com características reprodutivas e níveis séricos

de testosterona. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.4, p.204-213, 2009b.

FOLHADELLA, I.M. **Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. 2008. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

FOLHADELLA, I.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; et al. Características andrológicas de touros da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.809-815, 2006.

FRENEAU, G.E.; GUIMARÃES, J.D.; VALE FILHO, V.R. Avaliação de touros nelores submetidos a biopsia testicular Aberta pela evolução do índice andrológico por pontos (ICAP). **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, 5 (Supl.1), p.461-463, 1997.

FRENEAU, G.E.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES JR., A.P.; et al. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1107-1115, 2006.

GARNERO, A.V.; LÔBO, R.B.; OLIVEIRA, H.N. et al. Estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos de características alternativas na raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.162.

JOHNSON, W.H.; THOMPSON, J.A.; KUMIDIKA, J. et al. The determination and correlation of reproductive parameters of performance-tested Hereford and

Simmental bulls. **Theriogenology**, v.44, n.7, p.973-982, 1995.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated Proteins in Holstein Bull Seminal Plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, n.6, p.1202-1207, 1993.

KINNER, M. K. Growth factors in gonadal development. **Journal of Animal Science**, v.70 (suppl 2), p.30-41, 1992.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v.78, n.4, p.1216-1231, 1998.

LOI, V.; VERTZONI, M.; VRYONIDOU, A.; et al. Development and validation of a simple reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of testosterone in serum of males. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.2, p.527-32, 2006.

MARKS, J.L.; AX, R.L. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to bindings affinity of heparin to sperm. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.8, p.2078-2082, 1985.

MARTINS, J.A.M. **Desenvolvimento reprodutivo e análise das proteínas do plasma seminal com afinidade à heparina em tourinhos Gir selecionados para a produção de leite**. Tese (Doutorado). UFMG, Belo Horizonte/MG. 71f, 2010.

MATHEVON, M.; BUHR M.M.; DEKKERS, J.C. Environmental, management and genetic factors affecting sêmen production in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.12, p. 3321 – 3330, 1998.

MOURA, A.A.A.; RODRIGUES, G.C.; MARTINS FILHO, R. Desenvolvimento ponderal e testicular, concentrações periféricas de testosterona e características de abate em touros da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2 suppl., 2002.

NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; ABE, S. I. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. **International Journal of Developmental Biology**, v.43, n.4, p.343–347, 1999.

PICARD-HAGEN, N.; SOURBE, O.; LYAZRHI, F. et. al. Effect of **Precocious** collection on sêmen output and quality in young Holstein bulls. **Theriogenology**, v.57, n.5, p. 1551-1562, 2002.

QUIRINO, C. R.; BERGMANN, J.A.G.; VALE FILHO, V.R.; et. al. Relação fenotípica entre características físicas do sêmen, perímetro escrotal e libido, em touros Nelore. XVI Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, 16, 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: FEP-MVZ, v.1, p.38, 1998.

SALVADOR, D. F.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R.; et al. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.3, p. 587-593, 2008.

SALVADOR, D. F. **Perfil cromatográfico e eletroforético de proteínas do sêmen com afinidade a heparina de touros jovens da raça nelore e suas associações com a seleção andrológica, congelação do sêmen e reação acrossômica induzida (RAI)**. 2005. 57p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária,

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SALVADOR, D.F.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R. et al. Perfil andrológico de touros da raça Nelore com três e quatro anos de idade, criados extensivamente em condições do estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.64-67, 2002.

SANCHES, A.C.; LÔBO, R.B.; BEZERRA, L.A.F. et al. Efeito do manejo nutricional sobre medidas lineares e níveis de testosterona em touros zebuínos jovens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECHNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998a. p.46.

SANCHES, A.C.; LÔBO, R.B.; BEZERRA, L.A.F. et al. Variação da secreção de testosterona no desenvolvimento corporal e idade à puberdade em touros *Bos Indicus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECHNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998b. p.43.

SANWAL, P. C.; SUNDBY, A.; EDQVIST L.E. Diurnal variation of peripheral plasma levels of testosterone in bulls measured by a rapid radioimmunoassay procedure. **Acta Veterinary Scandinavica**, v.15, n.1, p.90-99, 1974.

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

SILVA, A.S.F. **Maturidade sexual e congelabilidade do sêmen de tourinhos Gir-I, sob manejo alimentar estratégico**. Dissertação (Mestrado) UFMG, Belo Horizonte-MG, 42f, 2007.

VALE FILHO, V.R. Padrões do sêmen bovino para o Brasil: análise e sugestões.

In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8, 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1989, p. 94-118.

VALE FILHO, V.R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In_[Anais] **VII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. v.1, n.7, p.418-438, 1988.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; QUIRINO, C.R. et al. Perfil andrológico de touros da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) de um e dois anos de idade, criados extensivamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.2, p.189-192, 2001.

VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; AZEVEDO, N.A. Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. In_Anais [do] **VII Simpósio de produção de gado de corte. III Simpósio internacional de produção de gado de corte**. Ed. VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M.; PAULINO, P. V. R., [et al.] – Viçosa, MG, p.363-400, 2010.

WOLF, F.R., ALMQUIST, J.O., HALE, E.B. Prepubertal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal Animal Science**, v.24, n.3, p.761-765, 1965.

CAPÍTULO V

Sugestões e Recomendações

Conforme sugerido na discussão dos dados recomenda-se a identificação das proteínas de peso molecular de 55 e 47kDa, de forma criteriosa, utilizando-se espectrometria de massa e mapa 2D, para que se possa determinar sua verdadeira ação frente ao desenvolvimento sexual e, então, confirmá-las ou não, como marcadoras negativas do desenvolvimento sexual em touros da raça Gir-Leiteiro.

Sugere-se também o desenvolvimento de kits comerciais para determinação da precocidade sexual utilizando as proteínas 55 e 47kDa, como marcadoras negativas, associadas com as proteínas de baixo peso molecular (<20kDa), como marcadoras positivas. Devendo-se determinar as proteínas contidas no plasma seminal de touros Gir-Leiteiro através de géis de

gradiente de 5 a 20% de acrilamida para melhorar a separação das bandas protéicas.

Uma vez que a literatura ressalta a importante ligação existente entre os andrógenos e as secreções plasmáticas seminais, as quais podem influenciar tanto o perfil protéico quanto o hormonal no plasma seminal, devem-se verificar as associações entre esses esteróides e os dados aqui apresentados, durante o desenvolvimento sexual.

Por fim, novos estudos para verificar se as concentrações elevadas de IGF-I no plasma seminal, aqui relatadas, foram resposta do animal ou da metodologia empregada devem ser realizadas, pois não há dados concernentes a estas variáveis nesta raça.

ANEXO 01A: Géis de eletroforese no período de -60 e -30 da puberdade.

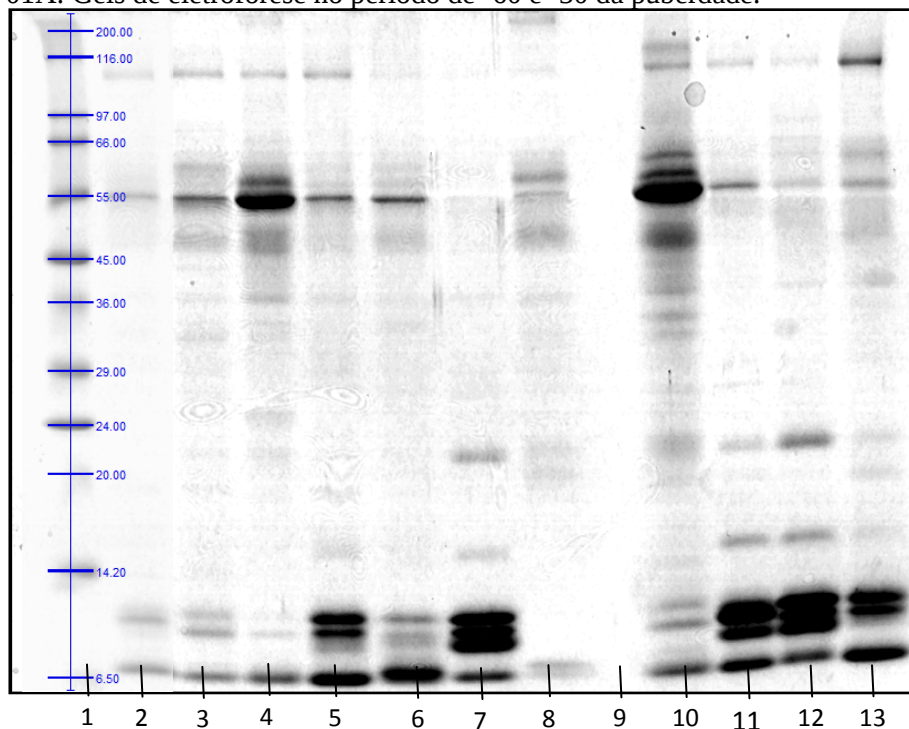


Figura 01: Gel eletroforético 1D do período -60d da puberdade. O número 1 representa a canaleta contendo o padrão do gel. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Precs**. As demais representam os animais **Reg**. A canaleta 9 não contém proteína.

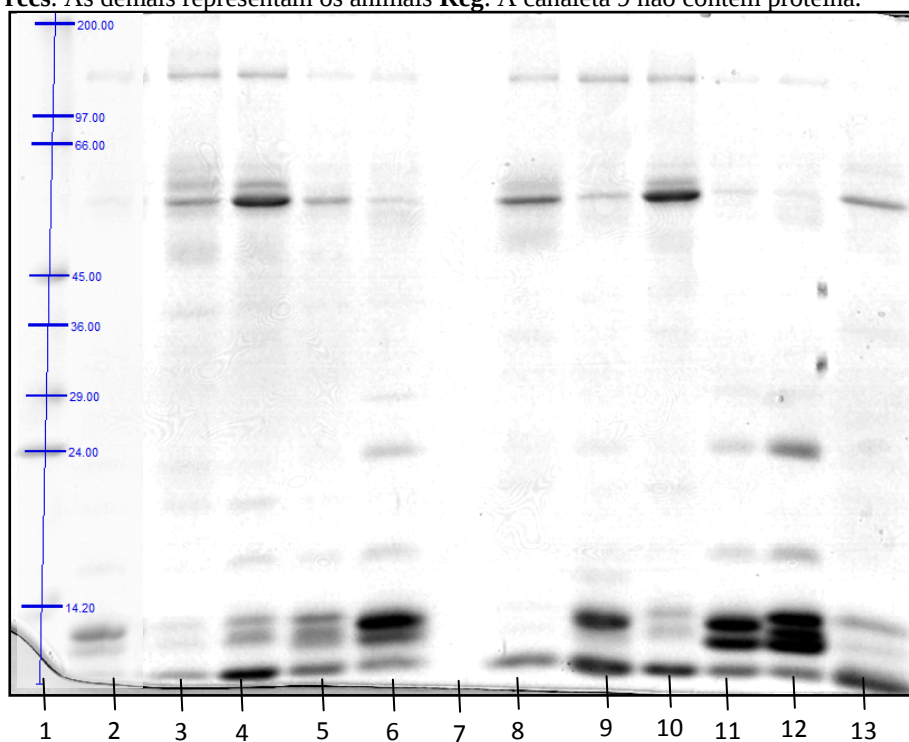


Figura 02: Gel eletroforético 1D do período -30d da puberdade. O número 1 representa a canaleta contendo o padrão do gel. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Precs**. As demais representam os animais **Reg**. A canaleta 7 não contém proteína.

ANEXO 01B: Géis de eletroforese no período de 0 e +30 da puberdade.

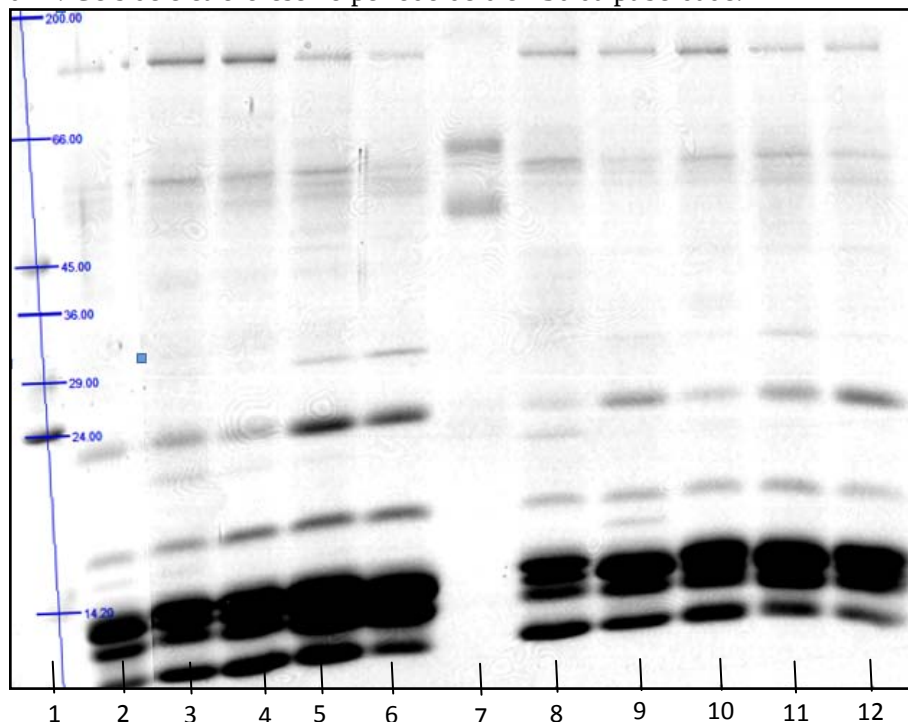


Figura 03: Gel eletroforético 1D do período -30d da puberdade. O número 1 representa a canaleta contendo o padrão do gel. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 12 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec**. As demais representam os animais **Reg**. A canaleta 7 não contém proteína.

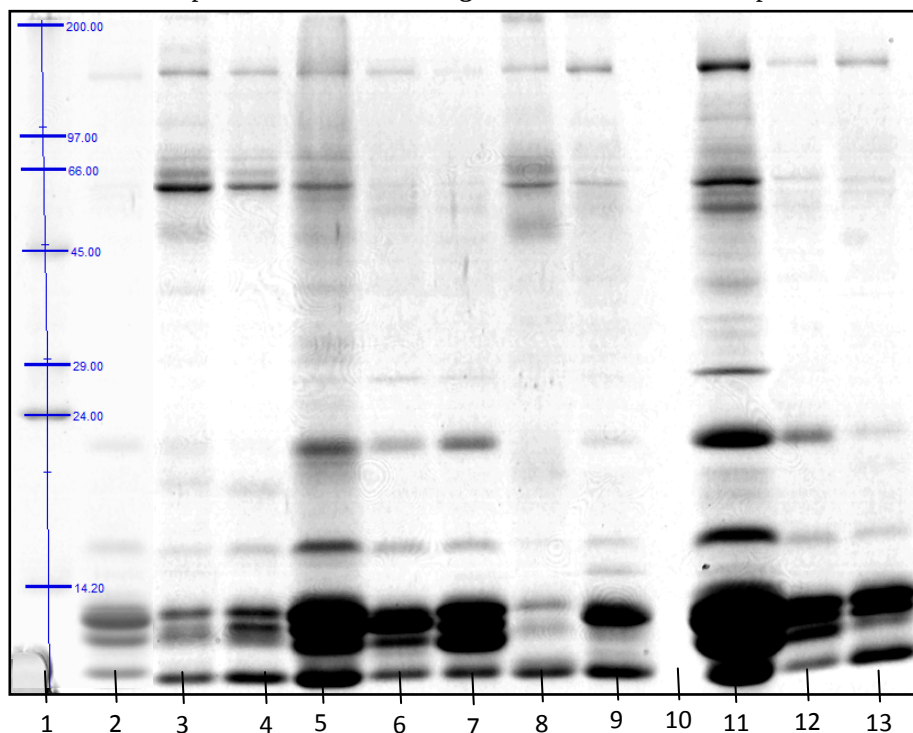


Figura 04: Gel eletroforético 1D do período +30d da puberdade. O número 1 representa a canaleta contendo o padrão do gel. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec**. As demais representam os animais **Reg**. A canaleta 10 não contém proteína.

ANEXO 01C: Gel de eletroforese no período de +60 da puberdade.

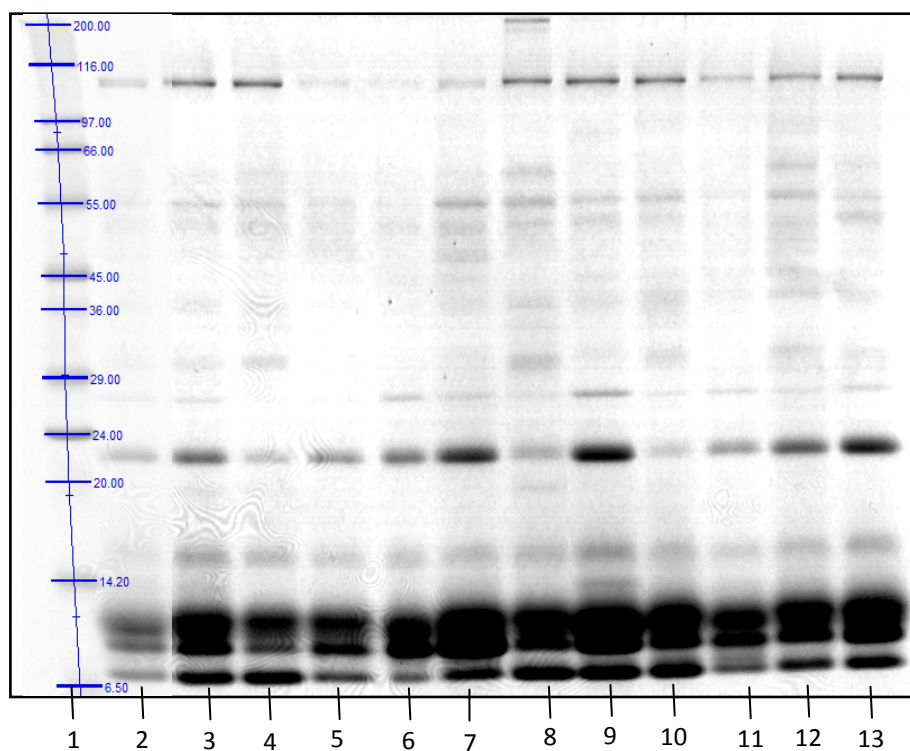


Figura 05: Gel eletroforético 1D do período +60d da puberdade. O número 1 representa a canaleta contendo o padrão do gel. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec**. As demais representam os animais **Reg**.

ANEXO 02A: Diagrama dos géis de eletroforese no período de -60 e -30 da puberdade.

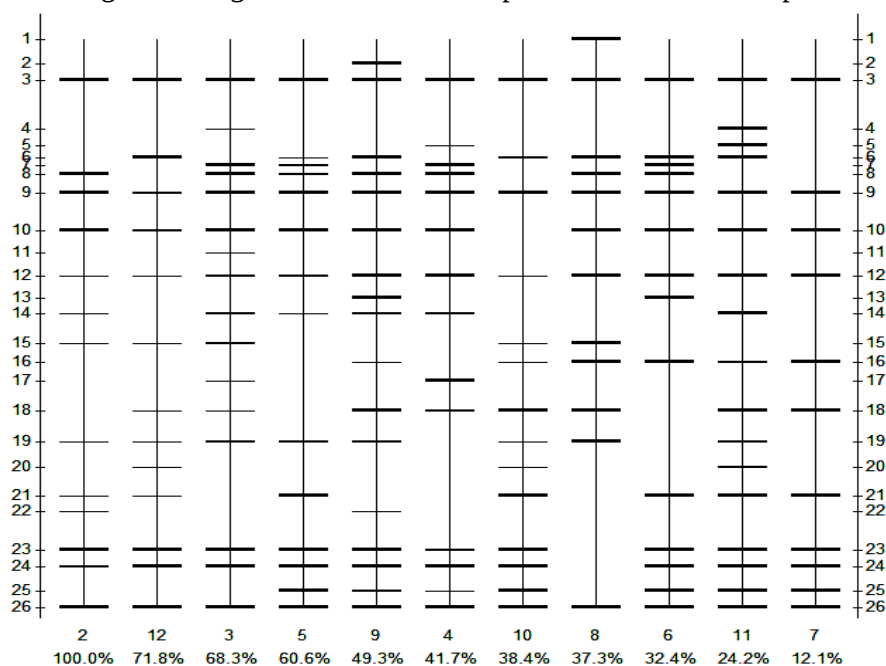


Figura 01: Diagrama comparativo das canaletas do gel eletroforético 1D do período -60d antes da puberdade. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec**. As demais representam os animais **Reg**.

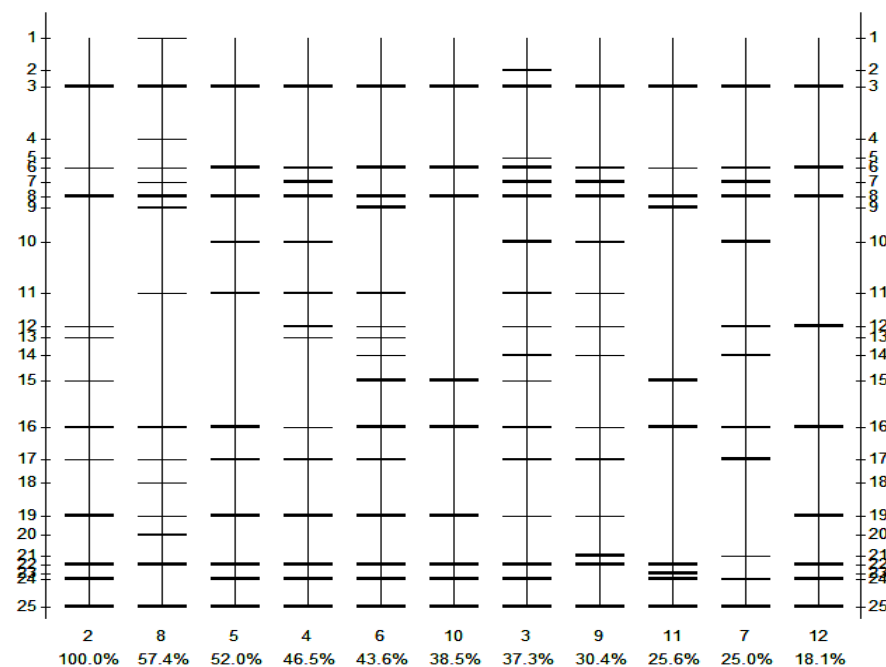


Figura 02: Diagrama comparativo das canaletas do gel eletroforético 1D do período -30d antes da puberdade. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec**. As demais representam os animais **Reg**.

ANEXO 02B: Diagrama dos géis de eletroforese no período de 0 e +30 da puberdade.

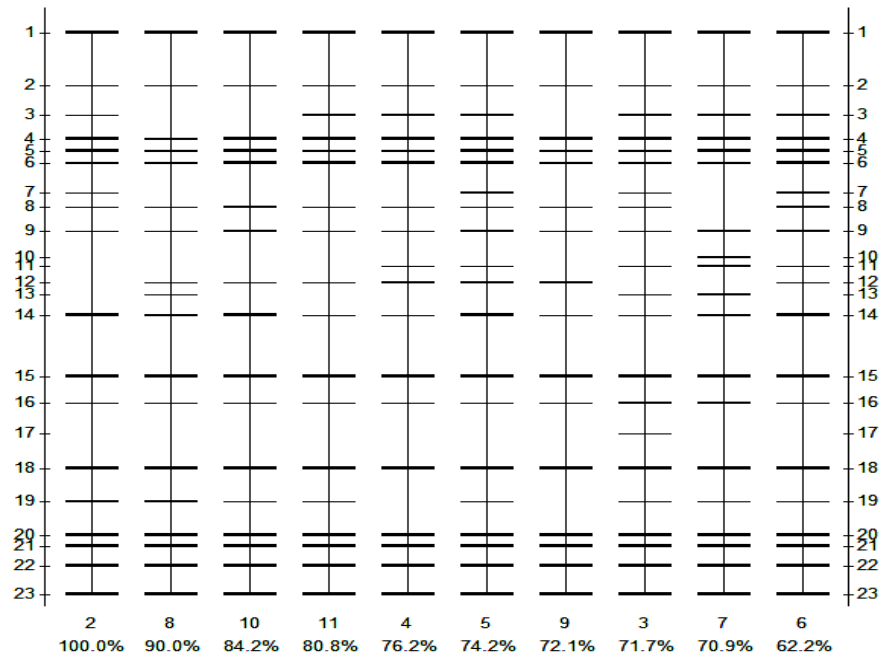


Figura 03: Diagrama comparativo das canaletas do gel eletroforético 1D do período 0d da puberdade. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec.** As demais representam os animais **Reg.**

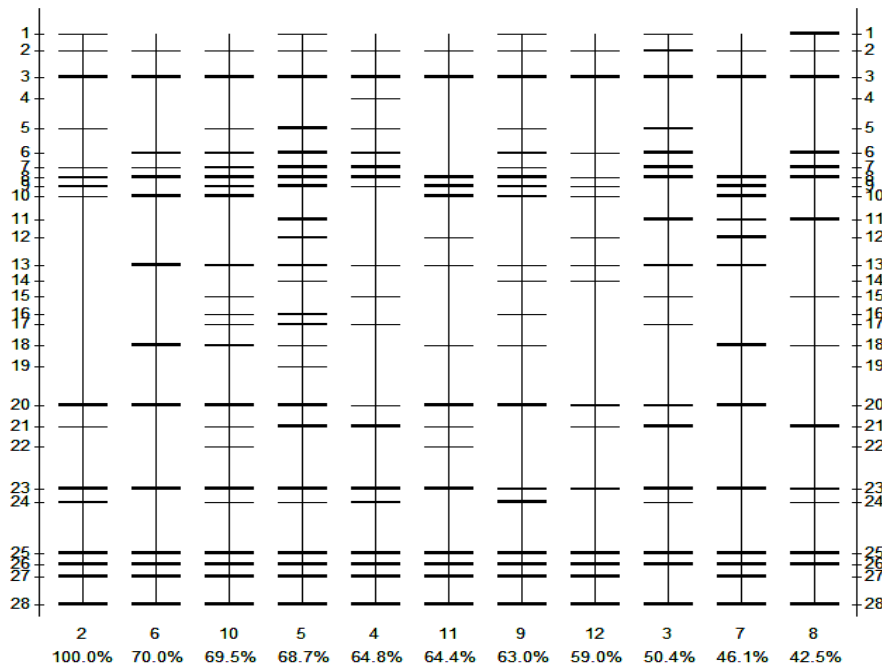


Figura 04: Diagrama comparativo das canaletas do gel eletroforético 1D do período +30d antes da puberdade. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec.** As demais representam os animais **Reg.**

ANEXO 02C: Diagrama do gel de eletroforese no período de +60 da puberdade.

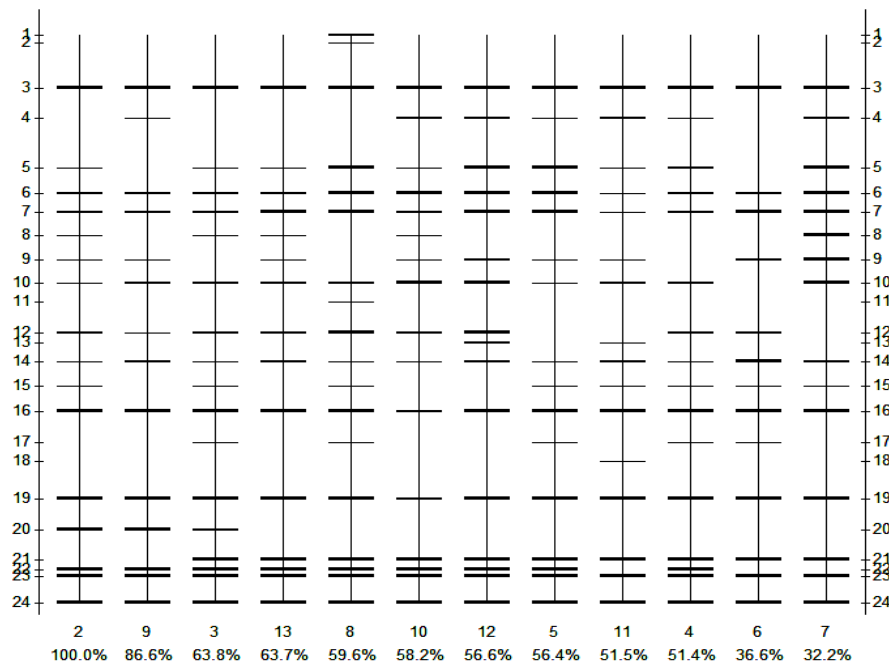


Figura 04: Diagrama comparativo das canaletas do gel eletroforético 1D do período +60d antes da puberdade. Os números 3, 4, 8, 9, 11 e 13 representam as canaletas contendo a proteína dos animais **Prec**. As demais representam os animais **Reg**.

ANEXO 03: CAP – Classificação Andrológica Por Pontos para touros, baseada na circunferência escrotal e características do sêmen (Índice Andrológico)

	(Excelente)	(Bom)	(Regular)	(Fraco)
Motilidade Espermática De Massa (1-5) Individual (%)	Vigor 5 Acima de 70	Vigor 4-5 60-70	Vigor 4 50-60	Vigor 3 (0-3) Abaixo de 50
Total de Pontos	20	12	10	3
Morfologia Espermática Defeitos Maiores, % Total de Defeitos, %	Abaixo de 10 Abaixo de 25	10-19 26-39	20-29 40-59	Acima de 29 Acima de 59
Total de Pontos	40	25	10	3
Circunferência Escrotal Idade Meses				
<i>Bos taurus</i> <i>Bos indicus</i>	Diâmetro em cm			
06-08 12-17	Acima 26	24-26	Abaixo 24	Abaixo 24
09-11 18-23	Acima 30	27-30	Abaixo 27	Abaixo 27
12-14 24-30	Acima 34	30-34	Abaixo 30	Abaixo 30
15-20 31-40	Acima 36	31-36	Abaixo 31	Abaixo 31
21-30 41-60	Acima 38	32-38	Abaixo 32	Abaixo 32
>30 >60	Acima 39	34-39	Abaixo 34	Abaixo 34
Total de Pontos	40	24	10	10

Tabela proposta por Vale Filho (1988). Baseada na tabela do BSE “Breeding Soundness Evaluation”, da American Society of Theriogenology, USA. 1976. Chenoweth, P. J. and Ball, I., in: Morrow, D. A. Current Therapy in Theriogenology Saunders Co. Phyladelphia – USA. 1980, p. 330-339. VALE FILHO et al. Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. In: **Anais... VII SIMCORTE**, p. 363-412, Viçosa/MG, 2010.

Nota: somente indicada para touros clinicamente normais (sem distúrbios funcionais). Para se classificar os defeitos espermáticos dos tipos maiores e menores, sugere-se o espermiograma proposto por Blom (1973) (BLOM, E. The ultrastructure of some sperm defects and a proposal for new Bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25, p.283-391, 1973).

Interpretação: Satisfatório: 60-100.

ANEXO 04: Ficha para espermograma

Espermograma	Realizado por :								Data da coleta			
Fazenda:	Proprietário:								Nº da Folha:			
Nº de Ordem:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nº Touro (identificação)												
ASPECTOS MORFOLÓGICOS												
DEF. MAIORES (%)												
Acrossoma												
Gota Cit. Proximal (GCP)												
Subdesenvolvido												
Cabeça Isol. Patológica												
Delgado na Base												
Piriforme												
Pequena Anormal												
Contorno Anormal												
Pouch Format. (diadema)												
Teratológica (form. duplas)												
Peça Intermediária (PI)												
Cau. Fort. Dob./Enr.												
Cauda Enr. Cabeça												
Outros												
DEF. MENORES (%)												
Gota Cit. Distal (GCD)												
Cabeça Delgada												
GCLP (perda menb. acr)												
Cabeça Isol. Normal												
Abax./Retro./Obliq.												
Cauda Dob./Enr.												
TOTAL DEFEITOS (%)												
OBS.:												
Nº de Ordem:												
Nº Touro (identificação)												
Data de nascimento:												
Idade (Meses):												
Peso (Kg):												
ASPECTOS FÍSICOS												
Volume												
Motilidade de massa (1-5)												
Motilidade individual (%)												
Vigor (1-5)												
CONCENTRAÇÃO (x 10⁶)												
DISTÚRBIO												
CE												
Consistência												

ANEXO 05: Quadro da CAP estimada no início do período experimental

Trinta tourinhos oriundos de cinco rebanhos de alta pressão de seleção para produção de leite¹ e para precocidade sexual², após chegarem à Fazenda Experimental com 14 meses de idade, foram mantidos 30 dias em regime de adaptação, permanecendo por nove meses em Uberaba (MG), recebendo alto nível nutricional⁴, sendo submetidos ao CAP aos 15 meses de idade, para a determinação do grau de maturidade sexual⁵

Idade média (meses)	n	% (30 animais)	CAP
15	1	3,33	≥60
	6	20	30 a 55
	23	76,67	<30
16	12	40	≥60
20	2	6,67	<40

¹Produção de leite: 6000kg/leite/lactação; ²Fazenda experimental Getúlio Vargas (Epamig/Uberaba-MG); ³ração balanceada comercial com 20% de proteína bruta, servida em cocho individual; ⁴CAP: a partir de 112 meses para Bos taurus taurus (VII SIMCORTE, 2010); ⁵6,7% não atingiram a maturidade sexual, mesmo tendo atingido 24 meses de idade.