

Influência das épocas do ano na morfometria testicular e epididimária, características do sêmen e proteínas do sêmen em SDS-PAGE em zebus e taurinos

Influence of Year Periods on Testicle and Epididymal Morphometry, Semen Characteristics and Seminal Proteins by SDS-PAGE in Zebu and Taurine

Marcelo George Mungai Chacur¹, Juliana Domingos Archanjo dos Reis¹, Lucas Silva Tavares¹, Klisman Sanches¹, Luciana Guaberto¹, Vagner Camarini Alves¹, Eunice Oba² & Alcides Amorim Ramos²

ABSTRACT

Background: Seminal plasma is a set of secretions from accessory male reproduction organs which influence spermatid functions. Climate changes that affect gametogenesis may produce low reproduction efficiency in bulls. Electrophoresis is a great help in the diagnosis of reproduction pathologies and in animal differentiation with regard to fertility within the context of climate changes. Current research aims at studying the influence of the rainy and dry periods in testicle and epididymis morphometry, semen characteristics and protein of seminal plasma by SDS-PAGE electrophoresis in extensively bred Nellore and Simental bulls.

Materials, Methods & Results: Five Nellore and two Simental bulls, at mean age of four years, were employed. Semen collection was undertaken during the rainy (spring and summer) and dry (autumn and winter) at 15-day intervals. One hundred and fifty-four ejaculations were analyzed and scrotal, testicle and epididymis measurement was provided. Samples of semen plasma were centrifuged and conditioned at -196°C till electrophoresis processing. Proteins were extracted from 200 μL from each sample in an extraction buffer composed of 0.625 M Tris - HCl, pH 6.8; 2% SDS, 5% β - mercaptoethanol and 20% glycerol. Proteins were quantified and electrophoreses processed. Data were evaluated by analysis of variance and means compared by Tukey's test at 5%. The expression $\text{TV} = 0.0396 \times (\text{average testicle length}) \times (\text{scrotal perimeter})^2$ was used for testicle volume (TV), with $\text{TV} = 460.14 \text{ cm}^3$ for the Simental breed during the rainy season and $\text{TV} = 571.26 \text{ cm}^3$ during the dry season. Nellore bulls showed $\text{TV} = 524.75 \text{ cm}^3$ during the rainy season and 515.13 cm^3 during the dry season. TV increased in Simental bulls during the dry period, whereas Nellore breed increased during the rainy one. There was an increase ($P < 0.05$) in big and total defects during the rainy season for both breeds. Further, 30 kDa in the seminal plasma occurred in all samples for both breeds and seasons under analysis. Band 179 kDa occurred in 43% and 14% of samples from Nellore and Simental breeds respectively. Molecular weights of identified bands in the gels varied between 4 and 205 kDa.

Discussion: Testicle length axis varied significantly between breeds at specific seasons. Variation may be due to adaptation and anatomic plasticity of the testicles within specific seasons of the year under analysis. TV rise in Simental bulls during the dry period may have contributed towards the decrease of minor and major spermatid defects with an improvement of semen quality. Spermatid motility during the dry period and total spermatid defects during the rainy season for Simental breed provided fall in semen quality. Morphological abnormalities of spermatozoa are lower in the dry season. Season affects testicle morphometry and protein composition of the bulls' seminal plasma. Protein band 179 kDa occurred in Nellore bulls during the two analyzed seasons, a fact that has not been described in the literature.

Keywords: bulls, sazonalidade, sêmen, seminal plasma proteínas.

INTRODUÇÃO

Diversos fatores afetam a reprodução animal, entre eles a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar [15]. A temperatura testicular em touros deve ser 4 a 5°C abaixo da temperatura corporal para que ocorra espermatogênese adequada [13]. Uma moderada elevação da temperatura testicular em touros reduz drasticamente a motilidade progressiva, o número de espermatozoides viáveis e aumenta a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais [16].

Mudanças climáticas que afetam a gametogênese podem levar a baixa eficiência reprodutiva de touros [25]. Na Índia, se observou elevação na motilidade espermática em touros de raças zebuínas em épocas do ano com temperaturas amenas [17]. A eletroforese é uma técnica que auxilia no diagnóstico de algumas patologias ou diferenciação de animais quanto ao suposto grau de fertilidade frente a alterações de clima e manejo [22].

No Brasil, os zebuínos predominam na composição do rebanho, sendo exigidos em relação à eficiência da espermatogênese e os taurinos são empregados em programas estratégicos de reprodução graças à precocidade sexual. Dessa forma, o presente estudo se justifica para que novas informações sejam somadas com relação à produção de sêmen e composição protéica do plasma seminal em distintas épocas do ano. O objetivo do trabalho foi estudar a influência das épocas chuvosa e seca na morfometria testicular e epididimária, características do sêmen e proteínas do plasma seminal por meio da eletroforese SDS-PAGE em touros Nelore e Simental, criados extensivamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade rural pertencente ao município de Presidente Prudente, SP, com latitude 22° 23' Sul e longitude 51° 27' Oeste, precipitação média de 1.300 mm/ano, temperatura média anual de 28°C, clima quente com inverno seco. Em 2011/2012, período do experimento, na época seca (outono e inverno) as médias foram de: 22,8°C e 39% de umidade relativa do ar (URA) e 425 mm para o índice pluviométrico (IP); e na época chuvosa (primavera e verão) de: 25,6°C e 73% de URA e 890 mm para o IP. Os dados climáticos foram fornecidos pelo Centro de Meteorologia da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil. No recinto de avaliação clínico-reprodutiva e colheita de sêmen dos touros, foi utilizado um termômetro de globo portátil digital⁵.

Foram utilizados sete touros, sendo cinco Nelores e dois Simental, com idades médias de quatro anos, criados extensivamente, em um mesmo pasto de *Bra-chiaria decumbens*, com sal mineral e água *ad libitum*. As mensurações dos comprimentos (eixo dorso-ventral), larguras (eixo látero-lateral) e alturas (eixo crânio-caudal) dos testículos e as larguras (eixo látero-lateral) dos epidídimos, foram realizadas com paquímetro de aço¹, graduado em milímetros. A circunferência escrotal (CE) foi mensurada com fita métrica graduada em centímetros. Para o cálculo do volume testicular (VT), foi utilizada a expressão: $VT = 0,0396 \times (\text{média do comprimento dos testículos}) \times (\text{perímetro escrotal})^2$ [19].

Foram efetuadas colheitas de sêmen entre 7:00 h e 9:00 h, a cada 15 dias, em todos os touros, durante as épocas chuvosa (primavera e verão) e seca (outono e inverno), por meio da eletroejaculação², com aparelho automático, proporcionando maior conforto aos animais durante a colheita, sendo analisados 154 ejaculados. As amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria³, entre 35 e 37°C, para as análises imediatas do volume (mL), motilidade espermática progressiva (%), vigor espermático (1 a 5) e turbilhão (1 a 5). Com posterior diluição do sêmen em formol salino tamponado (1:100), para obtenção da concentração espermática em câmara de Neubauer e da morfologia espermática frente a avaliação de 200 espermatozoides com microscopia óptica⁴ de contraste de fase. Os touros foram classificados segundo as avaliações clínicas e espermáticas para efeito de seleção para monta natural, segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [12].

Os ejaculados foram centrifugados⁶ a 1500 g por 15 min, separando e estocando 1 mL do plasma seminal em criotubos de 2 mL, identificados e armazenados a -196°C em nitrogênio líquido até a extração das proteínas [18] e quantificação das mesmas [3]. Posteriormente, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cuba vertical de eletroforese ligada à fonte com voltagem de zero a 1000W (50V x 50 mA por 30 min.; e 300 V x 16 mA por 12 h). A revelação das bandas proteicas foi feita em solução a 2% de “Coomassie blue” R-250 até a visualização das mesmas, com posterior utilização de transluminador permitindo a captura, visualização e o processamento de imagens das bandas proteicas reveladas nos géis.

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, os dados foram avaliados pela análise de variância e posteriormente aplicado o teste de Tukey a 5% [1]. A análise foi realizada por meio do “software” SAS [24].

RESULTADOS

Com relação à morfometria testicular e epididimária, nas épocas chuvosa e seca, foram obtidas diferenças ($P < 0,05$) entre raças para: comprimento do testículo esquerdo, largura do testículo esquerdo, epidídimo esquerdo e direito. Na raça Simental, houve diferença ($P < 0,05$) para o comprimento do testículo direito e esquerdo sendo superior na época seca (Tabela 1). Para a época seca, entre raças, os comprimentos testiculares dos lados direito e esquerdo foram superiores ($P < 0,05$) na raça Simental. A circunferência escrotal não diferiu ($P > 0,05$) entre raças e entre épocas.

O volume testicular médio na raça Simental foi de 460,14 cm³ na época chuvosa e 571,26 cm³ na época seca. Com relação à raça Nelore, na época chuvosa os valores médios foram de 524,75 cm³ e de 515,13 cm³ na época seca. Verificou-se maior volume testicular na raça Simental na época seca e na Nelore na época chuvosa.

Para as características do sêmen, houve diferenças ($P < 0,05$) entre raças, nas épocas chuvosa e seca, para: volume, turbilhão, motilidade, vigor, concentração, defeitos maiores, defeitos menores e defei-

tos totais (Tabela 2). Entre raças, para as características do sêmen, houve superioridade ($P < 0,05$) na Simental para o volume do ejaculado em ambas as épocas. A porcentagem se elevou para os defeitos espermáticos maiores e totais na raça Simental, na época chuvosa. Entre raças, houve diferença ($P < 0,05$) com superioridade para a Nelore para: turbilhão, motilidade, vigor e concentração, nas épocas chuvosa e seca (Tabela 2).

Para fins ilustrativos, com relação aos géis da eletroforese do plasma seminal (Figuras 1 e 2), observa-se a presença em 100% das amostras das bandas proteicas de 14 e 21 kDa nas duas épocas estudadas. A banda de 30 kDa esteve presente em 100% das amostras (Figura 1) para a época chuvosa e seca nas duas raças. A banda de 179 kDa esteve presente em oito das 14 amostras avaliadas (Figura 2), sendo visualizada em seis amostras na raça Nelore e em duas nos touros Simental. Para os pesos moleculares das bandas proteicas encontradas no plasma seminal, houve variação entre 4 e 205 kDa. Vale destacar que a incidência das bandas de 14, 21, 30 e 179 kDa foi mantida nas amostras avaliadas.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das variáveis morfométricas do escroto, testículos e epidídimos em touros Nelore (N) e Simental (S), criados extensivamente em Presidente Prudente, SP, durante o período 2011/2012.

Variável	Raça	Época Chuvosa	Época Seca	P
CE	S	35,03±1,71 Aa	33,83±2,13 Aa	0,7608
	N	33,30±2,63 Aa	34,05±2,98 Aa	0,3087
TEC	S	9,47±1,92 Bb	12,61±1,45 Aa	0,0058
	N	11,95±1,28 Aa	11,22±1,17 Ba	0,0089
TEL	S	7,55±0,94 Aa	6,66±0,25 Ab	0,0318
	N	6,26±0,59 Ba	6,32±0,49 Bb	<0,0001
TEA	S	6,63±1,30 Aa	6,91±0,49 Aa	0,1257
	N	6,12±0,73 Aa	6,59±0,48 Aa	0,0864
TDC	S	9,55±1,99 Ab	12,30±0,97 Aa	0,0158
	N	11,56±1,38 Aa	10,86±0,97 Ba	0,4908
TDL	S	7,01±0,50 Aa	6,66±0,60 Aa	0,9391
	N	6,34±0,65 Aa	6,71±0,63 Aa	0,5303
TDA	S	6,49±0,56 Aa	7,05±0,22 Aa	0,0829
	N	6,57±0,84 Aa	6,72±0,66 Aa	0,5303
EPE	S	4,14±1,91 Aa	3,08±0,65 Ab	0,0760
	N	3,00±0,65 Ba	2,96±0,43 Ba	0,0437
EPD	S	3,92±1,73 Aa	3,41±0,56 Aa	0,5522
	N	2,92±0,56 Ba	3,10±0,55 Ba	0,0227

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ($P < 0,05$); ^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$). CE: Circunferência Escrotal; TEC: Comprimento do Testículo Esquerdo; TEL: Largura do Testículo Esquerdo; TEA: Altura do testículo Esquerdo; TDC: Comprimento do Testículo Direito; TDL: Largura do Testículo Direito; TODA: Altura do Testículo Direito; EPE: Epidídimo Esquerdo; EPD: Epidídimo Direito.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão para as características quantitativas e qualitativas do sêmen em touros Nelore (N) e Simental (S), criados extensivamente em Presidente Prudente, SP, durante o período de 2011/2012.

Variável	Raça	Época Chuvosa	Época Seca	P
VOL	S	12,39±2,57 Aa	10,66±3,82 Aa	0,3954
	N	7,12±3,79 Ba	7,20±3,09 Ba	<0,0001
TURB	S	1,07±0,98 Ba	0,40±0,16 Ba	0,2495
	N	1,60±1,46 Aa	1,63±1,55 Aa	0,0234
MOT	S	61,42±13,50 Ba	52,50±14,74 Ba	0,0869
	N	76,00±7,88 Aa	74,50±8,25 Aa	<0,0001
VIG	S	3,21±0,42 Ba	3,00±0,63 Ba	0,2085
	N	3,70±0,65 Aa	3,50±0,51 Aa	0,0037
CONC	S	154,50±118,75 Ba	112,83±41,11 Ba	0,9372
	N	200,70±76,98 Aa	236,10±196,68 Aa	0,9372
DEMA	S	18,75±7,48 Aa	10,33±3,72 Ab	0,0001
	N	10,94±6,85 Ba	5,86±2,15 Bb	0,0004
DEME	S	17,10±5,03 Bb	18,00±6,38 Aa	0,0337
	N	18,30±8,63 Aa	9,56±3,30 Bb	0,0497
DETO	S	35,85±8,22 Aa	28,33±7,00 Ab	<0,0001
	N	29,30±9,58 Ba	15,47±3,72 Bb	<0,0001

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna ($P < 0,05$); ^{a,b}Letra minúsculas diferentes na mesma linha ($P < 0,05$). VOL: Volume; TURB: Turbilhonamento; MOT: Motilidade; VIG: Vigor; CONC: Concentração; DEMA: Defeitos Maiores; DEME: Defeitos Menores; DETO: Defeitos Totais.

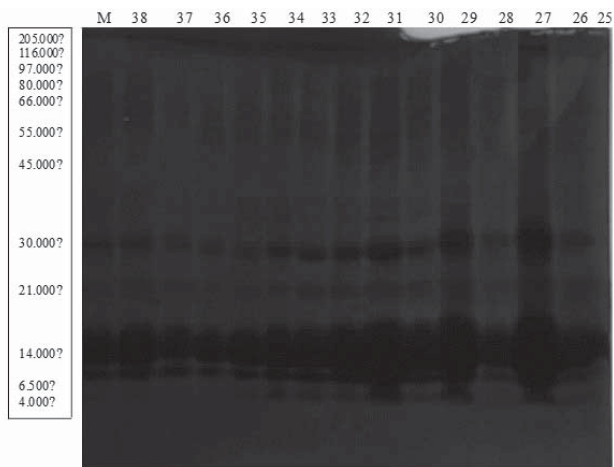


Figura 1. Gel de eletroforese em SDS-PAGE de amostras de plasma seminal em touros Simental (amostras: 25, 26, 37 e 38 época seca), Nelore (amostras: 27, 28, 29, 30 e 31 época chuvosa e amostras 32, 33, 34, 35 e 36 época seca).

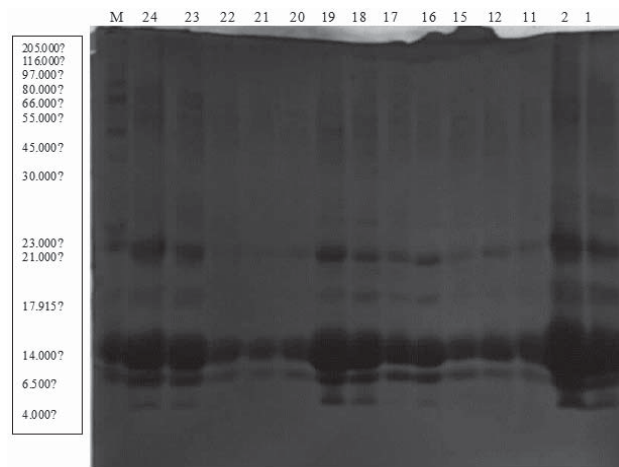


Figura 2. Gel de eletroforese em SDS-PAGE de amostras de plasma seminal em touros Simental (amostras: 1, 2, 11 e 12 época chuvosa), Nelore (amostras: 15, 16, 17, 18 e 19 época chuvosa e 20, 21, 22, 23 e 24 época seca).

DISCUSSÃO

As diferenças significativas ($P < 0,05$) observadas entre raças para TEC, TEL, EPE e EPD nas duas épocas avaliadas estão relacionadas com a origem genética distinta dos grupos utilizados, zebu e taurino. O eixo do comprimento testicular apresentou variação significativa entre raças nas épocas avaliadas podendo essa variação estar relacionada com a modelagem e plasticidade anatômica dos testículos perante as dis-

tintas épocas do ano analisadas, onde na raça Nelore o maior eixo do comprimento se fez presente na época chuvosa, possibilitando uma maior facilidade ao testículo para realizar trocas de temperatura com o meio ambiente devido às variações na volumetria testicular, concordando com registros da literatura [17,25]. A elevação do VT nos touros da raça Simental na estação seca pode ter contribuído para a redução dos defeitos espermáticos menores e maiores (Tabela 2), resultando

na melhoria da qualidade do sêmen. Para os Nelores, a elevação do VT ocorreu na época chuvosa, onde foi observada elevação dos defeitos menores e maiores dos espermatozoides (Tabela 2).

A despeito do volume testicular ter diminuído na raça Simental na época chuvosa, não houve diferença ($P > 0,05$) para a circunferência escrotal entre as épocas chuvosa e seca. Dessa forma, sugere-se utilizar o volume testicular como informação relevante na seleção andrológica.

Reprodutores bubalinos submetidos a temperaturas entre 38 e 39°C e alta umidade do ar entre 60% e 95%, a espermatogênese se manteve equilibrada com pequena porcentagem de espermatozoides com anormalidades morfológicas [8-10].

O volume do ejaculado está relacionado com diversos fatores, dentre eles o tamanho das glândulas sexuais acessórias, às quais são anatomicamente maiores nos animais de origem taurina, colaborando com uma expressiva parte do volume seminal. Para ambas as raças, houve redução ($P < 0,05$) na porcentagem de defeitos espermáticos menores, maiores e totais na época seca. Possivelmente, a menor temperatura ambiente e a menor umidade relativa do ar influenciaram na melhoria do quadro espermático, corroborando resultados obtidos por Horn *et al.* [15].

Houve elevação dos defeitos maiores e totais ($P < 0,05$) na época chuvosa para ambas as raças, concordando com pesquisas anteriores [13,16] que relataram queda na qualidade do sêmen na estação das chuvas. Valores esses, acima dos preconizados para fins de uso de touros para cobertura natural em condições extensivas de manejo, conforme o CBRA [12]. Verifica-se no presente estudo que os touros nascidos e criados sob as mesmas condições climáticas e nutricionais, revelaram diferenças em relação às características do sêmen, nas épocas avaliadas, com superioridade da raça Nelore, nas condições experimentais.

Segundo a literatura, a banda proteica de 14 kDa é responsável pela maturação do espermatozoide, colaborando para o aumento da fertilidade [14]. A banda proteica de 21 kDa, pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermáticas após choque térmico pelo frio, além de atuar como antioxidante, colaborando com a fertilidade [2].

A capacitação do espermatozoide recebe o auxílio da proteína de 30 kDa colaborando de forma positiva com a fertilidade [21]. A proteína de 65 kDa

atua de forma positiva na espermatogênese, sendo importante para a fertilidade [20]. A banda proteica de 179 kDa, segundo a literatura consultada não foi descrita no plasma seminal de bovinos, onde no presente estudo foi identificada na raça Nelore nas épocas seca e chuvosa. Por outro lado, na raça Simental essa banda proteica foi identificada na estação chuvosa. Provavelmente, essa proteína possa estar relacionada com alguma proteção aos espermatozoides na época mais quente do ano.

As “Bovine Seminal Plasma Proteins” (BSPs) são proteínas produzidas nas vesículas seminais, ricas em fibronectina tipo II e responsáveis por 70% das proteínas totais do plasma seminal de bovinos, e existem três tipos: BSP-A1, BSP-A2, e BSP-A3 [22]. Em 100% dos touros Nelore com boa qualidade do sêmen houve a presença de bandas proteicas de 13, 18 e 20 kDa no plasma seminal com pesos moleculares entre 5 e 105 kDa, conforme Chacur *et al.* [7]. As estações do inverno e verão influenciaram no perfil proteico do sêmen em reprodutores Limousin, onde a qualidade do sêmen foi superior na presença simultânea das bandas de 20, 55, 66 e 80 kDa nas duas estações [5]. Ainda na raça Limousin, a proteína de 40 kDa foi identificada em reprodutores com baixa qualidade do sêmen no verão [4]. Na raça Tabapuã, os touros produziram sêmen de boa qualidade no inverno tendo as bandas de 20, 55, 66 e 80 kDa isoladas no plasma seminal [9]. Em um estudo com Pardo-Suíços, touros com sêmen de boa e má qualidade foram avaliados quanto ao perfil proteico do plasma seminal, sendo que a boa qualidade esteve relacionada com as bandas de 55 e 66 kDa [11].

A despeito dos touros Nelore e Simental terem sido nascidos e criados na mesma propriedade, verificou-se peculiaridades nas raças diante das épocas estudadas, com relação às características do sêmen, morfometria testicular e epididimária e na composição proteica do plasma seminal, sugerindo que novos estudos devam ser realizados para ampliar a compreensão dos efeitos das épocas do ano nas características reprodutivas dos touros criados extensivamente.

CONCLUSÃO

A época seca influenciou na morfometria testicular com aumento do eixo do comprimento na raça Simental. A época chuvosa influenciou na redução do volume testicular na raça Simental. A morfologia espermática foi influenciada pela época seca com redução dos defeitos maiores e totais nas raças Nelore e Simental.

Verificou-se a presença de grande diversidade de bandas protéicas no plasma seminal, sendo as bandas de 14 e 21 kDa identificadas em todos os touros Nelore e Simental, sugerindo ação benéfica das mesmas no quadro espermático. A banda proteica de 179 kDa foi encontrada na raça Nelore nas duas épocas, não sendo descrita na literatura.

SOURCES AND MANUFACTURERS

¹MITUTOYO, Kanagawa, Japan.

²NEOVET, Autoejac®, Uberaba, MG, Brazil.

³FANEM, Modelo 100®, São Paulo, SP, Brazil.

⁴NIKON, Eclipse 200®, Tokyo, Japan.

⁵HI-SEG, HT-30®, São Paulo, SP, Brazil.

⁶FANEM, Baby 2 - 206R®, São Paulo, SP, Brazil.

Funding. Financial assistance for this research was provided by CNPq.

Ethical approval. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP, sob o protocolo n. 909.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Banzato D.A. & Kronka S.N. 2006. *Experimentação Agrícola*. Jaboticabal: FUNEP, 247p.
- 2 Barrios B., Pérez-Pé R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muiño-Blanco T. & Cebrián-Pérez J.A. 2000. Seminal plasma protein revert the cold-shock damage of ram sperm membrane. *Biology of reproduction*. 63(1): 1531-1537.
- 3 Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-54.
- 4 Chacur M.G.M., Castillo A.M.N., Godoy G.B., Gandolfo V.S., Machado Neto N.B., Kronka S.N. & Guaberto M.L. 2009. Season influence upon seminal plasma proteins in Tabapua breed Bos taurus indicus. *Animal Reproduction*. 6(1): 339.
- 5 Chacur M.G.M. & Machado Neto N.B. 2007. Influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal de touros Limousin. *Veterinária Notícias*. 13(1): 47-53.
- 6 Chacur M.G.M., Machado Neto N.B. & Cristancho D.R. 2006. Winter-springer and Summer influence upon seminal plasma proteins in bulls. *Animal Reproduction*. 3(2):251.
- 7 Chacur M.G.M., Martinez A.I.S. & Machado Neto N.B. 2006. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore Bos taurus indicus. *Veterinária Notícias*. 12(1): 87-93.
- 8 Chacur M.G.M. & Oba E. 2005. Estresse térmico em touros bufalinos *Bubalus bubalis*, avaliações das características fisiológicas da reprodução. *Veterinária Notícias*. 11(1): 111-112.
- 9 Chacur M.G.M., Oba E., Ferreira J.C.P. & Velloso N.M. 2010. Physiological changes occurred in buffalo bulls *Bubalus bubalis* subject to thermal stress. In: *Proceedings of the 9th World Buffalo Congress* (Buenos Aires, Argentina). pp.116-119.
- 10 Chacur M.G.M., Oba E., Ferreira J.C.P. & Velloso N.M. 2010. Thermal stress in buffalo bulls *Bubalus bubalis* evaluation of reproductive characteristics. In: *Proceedings of the 9th World Buffalo Congress* (Buenos Aires, Argentina). pp.120-123.
- 11 Chacur M.G.M., Sirchia F.P., Ruiz A.C.L. & Guaberto M.L. 2010. Season influence upon seminal plasma proteins in Brown-Swiss bulls. *Reproduction, Fertility and Development*. 22(1): 310-311.
- 12 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p.
- 13 Coulter G.H. 1988. Thermography of bull testes. In: *Proceedings of the 12th Technical Conference on Animal Insemination and Reproduction* (Milwaukee, USA). pp.58-62.
- 14 Einspanier R. 1991. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179(2):1006-1010.
- 15 Horn M.M., Moraes J.C.F. & Galina C.S. 1997. Qualidade de sêmen de touros Aberdeen Angus e Ibagé frente à degeneração testicular experimental. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 5: 356-359.
- 16 Kastelic J., Cook R.B., Pierson R.A. & Coulter G.H. 2001. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production and seminal quality in 129 beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 65(2): 111-115.

- 17 **Kodagalli S.B. 1962.** Seasonal variation in semen characteristics and reaction time of Khillar breed. *Indian Veterinary Journal*. 39: 593-599.
- 18 **Laemilli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. *Nature*. 277: 680-685.
- 19 **Lunstra D.D.; Gregory K.E., Cundiff L.V. 1988.** Heritability estimates and adjustment factors for effects of bull age and age of dam on yearling testicular size in breeds of beef bulls. *Theriogenology*. 30(1): 127-136.
- 20 **Morani C.S.E., Roncoletta M., Franceschini P.H., Lima V.H., Rodrigues H.L., Oliveira A.M. & Silva C. 1998.** Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações na precocidade sexual em bovinos de raça Nelore doadores de sêmen. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*. 35(6): 1015-1021.
- 21 **Ramakrishnan M., Anbazhagan V., Pratap T.V., Marsh D. & Swamy J.M. 2001.** Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Journal Biophysical*. 8(4): 2215-2215.
- 22 **Roncoletta M. 2003.** Perfil Bidimensional de Proteínas de Membrana de Espermatozoides e de Plasma Seminal, relacionados com fertilidade e com a congelabilidade de sêmen de touros. 89f. Jaboticabal, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- 23 **Roncoletta M., Franceschini P.H., Lima V.F.M.H., Rodrigues L.H., Oliveira M.A. & Silva C. 1999.** 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 Veterinary Research and Animal Science*. 36: 109.
- 24 **SAS. 2005.** SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc. Cary. NC.
- 25 **Vale-Filho V.R. 2001.** Subfertilidade em touros: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia*. 35(2): 81-87.

