

INFLUÊNCIA DA ESTAÇÃO DO ANO SOBRE AS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE TOUROS LIMOUSIN

Marcelo George Mungai Chacur¹, Nelson Barbosa Machado Neto²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal em touros Limousin. Coletou-se amostras de sêmen de 12 animais com dois anos de idade por eletroejaculação, durante o inverno, com sete dias de intervalo, em um total de 55 amostras. No verão, nove desses touros foram reavaliados pelo exame andrológico. Amostras do sêmen foram centrifugadas a 1500 g/15 min e acondicionadas em tubos "ependorf", estocadas a -20°C até o processamento. As proteínas foram extraídas de 200 µL de cada amostra em 2mL de tampão de extração composto por 0,625M Tris-HCl; pH 6,8, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol e 20% de glicerol. As proteínas foram quantificadas e as eletroforeses realizadas; e os géis fixados e corados na mesma solução com 2% de Coomassie Blue R250. Nos touros A, C, D, E, H e I a ausência de proteínas de alto peso molecular (APM 55KDa, 66KDa e 80KDa) foi verificada no inverno e uma que se supõe ser de baixa fertilidade (BF 40 KDa) ausente no touro D, no verão. Os touros F, G e J mostraram presença de proteínas de APM (55KDa) no inverno. Nos touros H, I e J, proteínas APM (55KDa, 66KDa ou 80KDa) estiveram presentes com uma condição satisfatória de sêmen. O touro I mostrou presença de proteínas APM (66KDa e 80KDa) no verão. Sugere-se que as diferentes estações do ano podem influenciar a presença ou ausência de proteínas no plasma seminal.

Palavras-chave: Influência da estação, defeitos espermáticos, proteínas do plasma seminal, eletroforese, touro, Limousin.

INTRODUÇÃO

A habilidade para a seleção de touros com alta fertilidade resulta na produção de doses de sêmen com qualidade superior, aumentando a taxa de concepção. Normalmente a análise do sêmen se baseia na motilidade, concentração e morfologia, nem sempre resultando na seleção de touros férteis. Por monta natural um touro fértil deixa cerca de 120 a 400 descendentes, quando selecionado por meio da avaliação andrológica. Utilizando-se a inseminação artificial, esse número pode ultrapassar os 100.000 descendentes, demonstrando a importância de se utilizar indivíduos com características desejáveis, conforme normas da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2003).

Um dos parâmetros morfométricos utilizados na seleção de touros é o perímetro escrotal (PE), facilmente mensurável e de alta repetibilidade. Este permite estimar o potencial reprodutivo de machos jovens, por estar associado ao desenvolvimento testicular, à produção diária de espermatozoides e à puberdade (SMITH, 1989; SILVA, 1993; PINEDA et al., 2000). A presença de um maior volume testicular por unidade de peso corporal foi relatada em animais precoces, com pesos aproximados de 300 kg e idades entre 8 e 30 meses (FIELDS, 1979).

O índice de massa corpórea (IMC) associado ao perímetro escrotal e a qualidade do sêmen em touros jovens têm sido importante para a seleção de animais com maior potencial para as produções qualitativa e quantitativa de sêmen e conseqüentemente melhor fertilidade (PINHO, 2000).

Killian et al. (1993) relataram a presença

¹ Médico Veterinário. Professor Titular. Doutor. FCA – Universidade do Oeste Paulista. Rod. Raposo Tavares, km 572 – Limoeiro, Campus II, Cep 19067-175. Presidente Prudente – SP. Brasil. chacur@unoeste.br.

² Engenheiro Agrônomo. Professor Titular. Doutor. FCA. Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE.

de quatro “proteínas associadas com a fertilidade”, dando início às pesquisas com proteínas do plasma seminal.

O plasma seminal serve como veículo para os espermatozoides ejaculados, consistindo em uma mistura de secreções dos testículos e glândulas sexuais acessórias, com função carreadora dos gametas masculinos até o trato genital feminino; viabilizando a fertilização. Os perfis eletroforéticos das proteínas do plasma seminal auxiliam na avaliação clínica, em casos de infertilidade em touros (MANJUNATH, 1987; EINSPANIER, 1991; GASSET, 1997; MORTARINO, 1998; RONCOLETTA; FRANCESCHINI, 1999).

A biologia molecular na área da reprodução animal traz novas ferramentas para o melhoramento genético, por meio da utilização de marcadores bioquímicos em líquidos orgânicos que demonstrem o potencial genético de um animal, cuja seleção de genótipos superiores, para determinadas características reprodutivas possa ser incrementada (RONCOLETTA; FRANCESCHINI, 1999).

As proteínas solúveis e estruturais têm um importante papel no metabolismo do espermatozoide, com interferência na fertilidade dos touros (KILLIAN, 1999; RONCOLETTA; FRANCESCHINI, 1999). O plasma seminal em mamíferos contém um grupo de proteínas que ligam-se ao espermatozoide, sendo conhecidas como BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30KDa, que possivelmente induzem modificações moleculares na membrana plasmática, essenciais para a capacitação (THERIEN, 1998; BERGERON, 2004). O objetivo desse trabalho foi estudar a influência da estação do ano sobre as proteínas do plasma seminal em touros da raça Limousin.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 touros da raça Limousin, identificados pelas letras: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L; com 24 meses de idade, criados na região de São José do Rio Preto, SP. Realizou-

se cinco colheitas de sêmen por animal, nos meses de agosto e setembro (inverno) pelo método da eletroejaculação³, com intervalos de sete dias, perfazendo 55 ejaculados. Ocorreram 5 tentativas frustradas, na obtenção do sêmen. Em janeiro (verão), colheu-se um ejaculado de cada um dos seguintes animais: A, B, C, D, E, F, G, H e I.

Avaliou-se os animais no inverno e verão, quanto ao índice de massa corpórea (IMC), calculado por meio da seguinte expressão matemática: $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$, considerando-se a altura na cernelha e quanto ao perímetro escrotal⁴ (PE).

O sêmen foi analisado macroscopicamente quanto ao volume, cor e aspecto, e microscopicamente quanto ao turbilhamento, motilidade espermática progressiva, vigor e morfologia, por meio de microscópio de contraste de fase⁵, com câmara de vídeo⁶, nas dependências do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente – SP. Os touros foram classificados em satisfatórios ou não satisfatórios, segundo as avaliações clínicas e espermáticas, para efeito de seleção para monta natural, segundo normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

As eletroforeses do plasma seminal foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da UNOESTE, conforme o seguinte protocolo: centrifugou-se⁷ o sêmen a 1500g por 15 minutos, separando e estocando 1mL do plasma seminal em tubos “eppendorf”, armazenando-os a -20°C até a extração e quantificação das proteínas, segundo a metodologia utilizada por Laemilli (1970); Bradford (1976), respectivamente. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cuba vertical⁸ ligada à fonte elétrica⁹ (50V x 50 mA por 30 minutos e 300 V x 16 mA por 12 horas). A revelação das bandas protéicas foi feita em solução a 2% de Coomassie blue R-250¹⁰, com posterior utilização de transminador¹¹ permitindo a captura, visualização e o processamento das imagens das bandas protéicas reveladas nos géis.

³ Eletroejaculador modelo EL Macho, Santa Lydia. Presidente Prudente – SP

⁴ Fita escrotal, Lagoa da Serra, Sertãozinho – SP

⁵ Microscópio Nikon, Japão

⁶ Câmara CCD LG – Brasil

⁷ Centrífuga Excelsa baby II – Modelo 206-R – FANEM® SP – Brasil

⁸ Mightysmall SE 250 / SE 260, cód. 80 – 6149 – 73

⁹ Electrophoresis – Power Supply – EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech

¹⁰ USB, 1173, Amersham Life Science

¹¹ Econo Image light cabinet, Alpha Innotech Corporation

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perante a avaliação do aparelho reprodutor, as médias obtidas para o PE foram de 35,54±2,96 cm no inverno e de 34,61±3,26 cm no verão, sendo as mesmas classificadas como boas para a faixa etária de 21 a 30 meses, segundo a classificação andrológica de touros *Bos taurus taurus* (CBRA, 1998). Observou-se desenvolvimento corporal satisfatório dos touros no presente experimento, concordando com as observações de Evans (1996) sugerindo que a maturidade sexual está mais intimamente relacionada ao peso do animal do que à idade, sofrendo influência de fatores como raça, heterose, balanceamento hormonal e manejo.

O índice de massa corpórea (IMC) para o inverno foi de 293,94 kg/m² e de 264,09 kg/m² no verão, similar ao descrito para a raça Nelore aos 48 meses no inverno, com valor médio de 290 kg/m² (SANCHEZ et al., 2004). Por outro lado, o IMC dos animais do presente estudo, no verão foi inferior aos das raças Nelore Padrão (302,62±5,87 Kg/m²) e Nelore Mocho com 284,19±5,15 Kg/m², na mesma faixa etária, conforme os resultados obtidos por Chacur et al. (2006).

O IMC revelou ser importante para a seleção de touros, com relação a altura da cernelha, tendo essa característica uma herdabilidade alta (0,56) na raça Brahman, entre 8 e 24 meses de idade, criados em clima tropical (FERNANDES, 1996). No presente trabalho, o IMC mostrou-se útil para a escolha de touros mais homogêneos, do ponto de vista corporal, evitando a presença de animais distoantes da média do rebanho.

Na análise do sêmen os volumes dos ejaculados foram de 5,10±0,60 mL (inverno) e 6,22±1,86 mL (verão), superiores ao descrito por Silva (2002) de 4,0 mL e inferior aos 12 mL citado por Martinez et al. (2000). Estando esse aspecto quantitativo sujeito à variações, principalmente frente ao método de colheita por meio da eletroejaculação. A coloração dos ejaculados mostrou-se branco-marmórea, com aspecto viscoso. O turbilhonamento apresentou médias e desvios-padrão de 3,00±0,31 para o inverno e 2,22±1,09 para o verão. A motilidade espermática com médias de 68,27±3,44% (inverno) e 61,11±24,72% (verão) foi similar às relatadas por Silva (1993) de 65,3% e Sarreiro (2002) com 62,7%. Para o vigor espermático, as médias foram de 3,52±0,20 (inverno) e 2,78±0,67 para o verão.

As médias e os desvios-padrão para a morfologia espermática nos períodos de inverno e verão, respectivamente foram de 20,96±3,26% e

8,2±5,5% para os defeitos maiores e de 6,18±3,24% e 21,80±12,20% para os defeitos menores. As médias dos defeitos maiores no inverno e dos defeitos menores no verão estão acima dos limites preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Sugere-se que a baixa temperatura ambiente possa ter sido a causa da alta incidência dos defeitos, maiores no período de inverno, uma vez que nas outras estações do ano a temperatura na região é elevada, estando os animais aclimatados ao calor, revelando no verão 8,2±5,5% para os defeitos maiores. A morfologia espermática supostamente é influenciada pelos constituintes do plasma seminal, sendo o mesmo um dos responsáveis pela fertilidade observada em touros Limousin descrito por Chacur et al. (2003 e 2004) e Nelore (CHACUR et al., 2006).

Diferenças individuais entre os perfis em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal foram observadas nos géis, estando presentes cadeias polipeptídicas com pesos entre 6,5 KDa e 205 KDa no inverno e de 14,9 KDa a 80 KDa no verão.

A osteopontina de 55 KDa foi identificada como uma das proteínas de fertilidade, presente no fluido das glândulas sexuais acessórias e associada com a fertilidade em touros de origem leiteira (MOURA et al., 2006). Essa proteína modula a função celular pelos receptores e modifica as características das membranas plasmáticas dos espermatozoides, favorecendo a fertilidade, além de participar da capacitação espermática (KILLIAN et al., 1993; MORANI, 1998; CANCEL, 1999; GERENA, 2000).

No presente estudo a banda de 55 KDa esteve presente em três (25%) dos 12 touros (F, G e J) no inverno e em dois (22,22%) (F e G) dos nove touros, no verão (Tabela 1). Com exceção dos touros E e F, que apresentaram um IMC superior a 300 kg/m² e percentagens de 33% e 28% de defeitos menores, respectivamente, os demais tinham quadro espermático satisfatório, segundo normas do CBRA (1998). Resultados esses similares aos descritos por Rabesquine et al. (2003) em touros Limousin, com IMC maior que 300 kg/m², associado à presença de altas percentagens de patologias, compatível com quadro espermático não satisfatório. O resultado do presente estudo, sugere ação benéfica da proteína de 55 KDa sobre a qualidade do sêmen, concordando com Moura et al. (2006).

Observou-se no presente experimento uma proteína de 66 KDa, conhecida como albumina (MORANI, 1998; KILLIAN, 1999), que conforme relatos de Jobim; Mattos (2002) auxilia na gameto-

Tabela 1. Percentagens de ocorrência de bandas protéicas específicas no plasma seminal de touros Limousin nas estações do inverno e verão, São José do Rio Preto – SP.

Touros	Bandas de proteínas	Inverno (n = 12)	Verão (n = 9)
F, G, J	55 KDa	3/12 (25%)	2/9 (22,22%)
A, C, E, H	55 KDa	ausente	4/9 (44,44%)
A, C, D, I	66 KDa	ausente	4/9 (44,44%)
A, C, E, I	80 KDa	ausente	4/9 (44,44%)
D	40 KDa	1/12 (8,33%)	ausente
A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L	20 KDa	12/12 (100%)	9/9 (100%)
B, C, D, E, F, G, H, K, L	26 KDa	6/12 (50%)	6/9 (66,66%)

gênese e no metabolismo das células de Sertoli. A mesma foi identificada em quatro (44,44%) dos nove touros (A, C, D e I) no verão. Nove (75%) dos 12 touros apresentaram quadro espermático satisfatório. Dos três animais restantes, cujos quadros seminais foram insatisfatórios verificou-se IMC superior a 300 kg/m² (touros D, E e F).

A eletroforese do presente estudo revelou a existência de uma proteína de 80KDa, provavelmente a lactoferrina encontrada comumente no plasma seminal de garanhões (INAGAKI, 2002). A lactoferrina atua como antioxidante, protegendo a membrana plasmática dos espermatozoides (FOUCHECOURT et al., 2002). Essa proteína esteve presente em quatro (44,44%) touros (A, C, E e I) no verão, de um total de nove, sendo três (A, C e I) com quadro seminal satisfatório e um (touro E) insatisfatório com IMC inferior a 300 kg/m². Dois touros (A e C) com quadro seminal satisfatório apresentaram simultaneamente as seguintes proteínas 55 KDa e 80 KDa no verão. Por outro lado, o touro E apresentou as bandas de 55 KDa e 80 KDa, com quadro seminal insatisfatório, com IMC > 300 kg/m², no verão.

Uma proteína de 40 KDa foi identificada no animal D no inverno, o qual apresentou quadro seminal insatisfatório. Essa proteína é responsável pela alteração lipídica da membrana espermática, inibindo a reação acrossômica (BRANDON, 1999).

A banda protéica de 20 KDa do plasma seminal pode ser responsável pela recuperação da permeabilidade da membrana espermática, depois de ser submetida ao choque térmico pelo frio, no qual se rompe a membrana (BARRIOS et al., 2000). Essa banda foi identificada em 100% dos touros, nas duas épocas do ano, inverno e verão.

A eletroforese revelou a presença de outra proteína marcadora de fertilidade no verão, supostamente a prostaglandina D, classe lipocalina de 26 KDa, nos touros B, C, D, E, F, G, H, K e L,

com 50% de ocorrência no inverno – primavera e 66,66% no verão. De acordo com Sorrentino et al. (1998) essa proteína possui função de transportar o ácido retinóico, necessário para manter a espermatogênese.

CONCLUSÕES

Em touros da raça Limousin, as estações de inverno e verão influenciaram diretamente na presença ou ausência de bandas específicas de proteínas no plasma seminal; as proteínas de 20 KDa, 55 KDa, 66 KDa e 80 KDa contribuíram positivamente com a qualidade do sêmen; a proteína de 20 KDa colaborou com a qualidade do sêmen no inverno e verão e nos touros com IMC superior a 300 kg/m², o quadro seminal foi insatisfatório mesmo na presença das proteínas de 55 KDa e 66 KDa.

Season year influence upon seminal plasma proteins in Limousin bulls

ABSTRACT

The objective of this work was evaluating the season year influence upon seminal plasma proteins in Limousin bulls. Semen samples of twelve animals with 2-years-old were collected with electroejaculation, during winter, at 7 days intervals in a total of 55 samples. In summer, nine of these bulls were re-evaluated through the andrology tests. Samples of semen were centrifuged at 1500 g / 15 min and conditioned in eppendorf tubes and stored at -20°C until further processing. The Proteins were extracted from 200 µL of each sample in 2 mL of extraction buffer composed by 0.625 M Tris-HCl; pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 20% of glycerol. The protein was quantified and the electrophoresis

was performed; the gels were fixed, and stained in the same solution with 2% of Coomassie Blue R250. In Bulls A, C, D, E and I the absence high molecular weight (HMW 55 KDa, 66 KDa and 80 KDa) proteins was verified in the winter and the one which suppose to be of low fertility (LF 40 KDa) absent in bull D, in summer. The bulls F, G e J showed presence of HMW (55KDa) in the winter. In bulls H, I and J HMW (55 KDa, 66 KDa or 80 KDa) proteins were present with a satisfactory semen condition. The bull I showed presence of HMW proteins (66 KDa and 80 KDa) in summer. It suggests that different seasons of the year may influence the presence or absence of proteins in seminal plasma.

Keywords: Season influence, spermatic defects, seminal plasma proteins, electrophoresis, bull, Limousin.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). **Manual de Inseminação Artificial**. São Paulo, 2003. 42p.
- BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGU, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage of ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, p. 1531-1537, 2000.
- BERGERON, A. Comparative study on the phospholipid-binding proteins in seminal plasma of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v. 1, p. 226.
- 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**, New York, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRANDON, C.I. Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 863-873, 1999.
- CANCEL, A.M. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**. New York, v. 60, p. 454-460, 1999.
- CHACUR, M.G.M.; RABESQUINE, M.M.; MACHADO NETO, N.B. Seleção da fertilidade em touros e proteínas do plasma seminal: correlação com o quadro espermático. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.185-186, 2003.
- CHACUR, M.G.M.; MACHADO NETO, N.B.; RABESQUINE, M.M. Season influence upon seminal plasma proteins in bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro, 2004 **Abstracts...** Belo Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004, v. 1, p. 236.
- CHACUR, M.G.M.; MARTINEZ, A.I.S.; MACHADO NETO, N.B. Perfil em SDS-PAGE do plasma seminal e sua relação com a qualidade do sêmen de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 87-93, 2006.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, Porto Seguro, 2004. **Abstracts...** Belo Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. v. 1, p. 196.
- EINSPANIER, R. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Gattingen, v. 179, n.2, p. 1006-1010, 1991.
- EVANS, A.C.O. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, London, v. 46, p. 345-357, 1996.
- FERNANDES, A. Estimativas de parâmetros genéticos e ambientais de medidas corporais e peso em bovinos da raça Brahman nos trópicos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, Fortaleza. 1996. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. p. 136-138.
- FIELDS, M.J. Age, season and breed effect of testicular volume and semen trails in young beef bull. **Journal of Animal Science**, London, v. 48, p. 1299-1304, 1979.
- FOUCHECOURT, S.; MÉTAYER, S.; LOCATELLI,

- A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Mammalian lipocalin-type prostaglandin D2 synthesis in the fluids of the male genital tract: Putative Biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, n. 3, p. 458-467, 2002.
- GASSET, M. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 250, p. 735-744, 1997.
- GERENA, R.L. Immunocytochemical localization of lipocalin. Type prostaglandin D, synthase in the bull testis and epididymis and on ejaculated sperm. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 62, p. 547-556, 2000.
- INAGAKI, M. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary Medicine Science**. London, v. 64, p. 75-77, 2002.
- KILLIAN, G.J.; The role of marker protein in reproductive efficiency. **Veterinary Science Extension**, Pennsylvania, v. 29, p.1112-1120, 1999.
- JOBIM, M.I.; MATTOS, R. C. Albumin and osteopontin – proteins seminal plasma related whit semen freezability. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, São Paulo, v. 26, p. 296-305, 2002.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWISKI, L.A. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Pennsylvania, v. 49, p. 1202-1207, 1993.
- LAEMILLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. **Nature**, London, v. 277, p. 680-685, 1970.
- MANJUNATH, P. Purification and biochemical characterization of three major acidic protein (BSP-A₁, BSP-A₂, and BSP-A₃) from bovine seminal plasma. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.241, p.685-692, 1987.
- MARTINEZ L.M.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; PAULA, L.R.O.; CRUZ, M.; CAMPOS, J.P.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, F.; BRUSCHI, J.H.; DURÃES, M.C. Correlações entre características da qualidade do sêmen e circunferência escrotal de reprodutores da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 1-15, 2000.
- MORANI, C.V. Polimorfismo da transferrina e albumina e as associações na precocidade sexual em bovinos da raça Nelore doadores de sêmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.33, n.6, p.1015-1021, 1998.
- MORTARINO, M. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis map of Bull seminal plasma proteins. **Electrophoresis**, Milano, v. 19, p. 797-801, 1998.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, New York, v. 27, p. 201-211, 2006.
- PINEDA, N.R.; FONSECA, V.O.; ALBUQUERQUE, L.G. Estudo preliminar da influência do perímetro escrotal sobre a libido em touros jovens da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 4-11, 2000.
- PINHO, T.G. Características seminais de touros jovens (Nelore) *Bos taurus indicus* de acordo com a biometria e morfologia testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, p. 187-189, 2000.
- RABESQUINE, M.M.; CHACUR, M.G.M.; GARCIA, J.P. Morfometria testicular, aspectos seminais e influência do peso corpóreo sobre a morfologia espermática na raça Limousin. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 118-120, 2003.
- RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H. 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**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 143-148, 1999.
- SANCHEZ, A.I.; CHACUR, M.G.M.; COUTINHO, N.V. Semen physical and morphological characteristics and corporal mass index of Nelore (*Bos taurus indicus*). In: INTERNATIONAL SARREIRO, L.C. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal, libido e características seminais de touros Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 602-608, 2002.

SILVA, A. **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidade e fatores que a influenciam**. Campo Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1993. (Relatório).

SILVA, A. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n. 3, p.1157-1165, 2002.

SMITH, M.F. Estimation of genetic parameters among soundness examination components and growth traits in pearling bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.67, p.2892-2896, 1989.

SORRENTINO, C.; SILVESTRINI, B.; BRAGHIROLI, L.; CHUNG, S.S.W.; GIACOMELLI, S.; LEONE, M.G.; XIE, Y.; SUI, Y.; MO, M.; CHENG, C.Y. Rat prostaglandin D₂ synthetase: its tissue distribution, changes during maturation and regulation in the testis and epididymis. **Biology of Reproduction**, New York, v.59, p.843-853, 1998.

THERIEN, I. Major protein of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, New York, v.59, p.768-776, 1998.